

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira – Béjaïa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire de fin de cycle

En vu de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE CHIMIQUE

Thème

**Conception d'un photobioréacteur
pour la culture de microalgues**

Présenté par :

M^{elle} HABCHI Samra

M^{elle} HIDJA Naima

Soutenu devant le jury :

Présidente : BELHADJ Nadra

Examineur : ZAMOUCHE Abdelmalek

Examinatrice : BOUDRAHEM Salima

Rapporteur 1 : HAMACHI Mourad

Rapporteur 2 : BERKANI Madjid

Promotion : Juin 2013

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant de nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de nous avoir donné de la santé et de la patience pour réaliser ce travail.

Nous remercions Nos promoteurs M^r M. HAMACHI et M^r M. BERKANI pour tout le temps et l'intérêt qu'ils nous ont consacré et pour leurs orientations et leurs conseils qu'ils nous ont prodigué tout au long de ce travail. Qu'ils trouvent ici nos sentiments de gratitude et de profonde reconnaissance.

Nous exprimons aussi nos meilleurs sentiments de gratitude aux honorables membres de Jury :

M^{me} N. BELHADJ d'avoir accepté de présider notre soutenance.

M^r A. ZAMOUCHE et M^{me} S. BOUDRAHEM d'avoir accepté de juger notre travail.

Nous remercions aussi tous les enseignants du Département de Génie des Procédés et les techniciens des laboratoires de bloc 11 qui nous ont aidé de réaliser ce travail.

Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.

Un grand merci s'adresse aussi

À l'attachée du laboratoire Biologie végétal M^{me} ZBOUGE pour son aide, ses conseils et sa disponibilité.

Merci à toute personne qui nous a aidé, encouragé et soutenu de près ou de loin durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail à

A la mémoire de mon cher père que la clémence de Dieu soit sur lui et l'accueille dans son vaste paradis, sa disparition m'a laissé un immense vide, que rien ne pourrait le remplacer. Mon cher père même si tu n'es pas là, ton existence est éternelle dans mon cœur.

Ma très chère mère, qui a consacré sa vie pour bâtir la mienne, qui a toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. Je lui exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

Je dédie ce travail aussi :

Mes très chers grands parents

A la mémoire de ma grande mère Louiza que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A mes très chers frères : Azzedine, Salim, Toufik et Nabil.

A mes très chères sœurs : Hadjila, Souad et Sassa.

A mon fiancé Ahmed et sa famille.

A mes très chers oncles et tantes.

A mon cher binôme Samra et sa famille

A tout le reste de la famille.

A mes copines de chambre et mes amies.

Dédicaces

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail à

Mes très chers parents, qui ont consacré leurs vies pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. Je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect

A la mémoire de mes grands parents.

Je dédie ce travail aussi :

A mes très chers frères : Farid et Lyes

A mes très chères sœurs : Dyhia, Sonia, Meriême et au soleil de notre maison wiza

A mon fiancé Youghorta et sa famille.

A ma grande mère Nouara

A mes très chers oncles et tantes.

A mon cher binôme Naïma et sa famille

A mes copines de chambre et mes amies.

Samra

Liste des figures

N°	Titres	page
1	Photobioréacteur de type plat	6
2	Photobioréacteur de type colonne	7
3	Photobioréacteur de type annulaire	8
4	Photobioréacteur tubulaire agencé horizontalement	9
5	Photobioréacteur « Biocoil »	11
6	Photobioréacteurs plats : photobioréacteur de 500 L construit au laboratoire de l'Institut Jacob Blaustein pour le projet "Desert Research	17
7	Photobioréacteurs tubulaires et en colonnes	17
8	Photos de différentes microalgues (Source : ARVAM)	19
9	Bassin raceway	21
10	Modélisation de la cinétique de croissance algale	24
11	Triglycéride : Glycérol ($C_3H_8O_3$) avec trois acides gras	31
12	Après filtration : on retient les débris cellulaires.	32
13	Rétention des débris cellulaires	32
14	Évaporateur rotatif	32
15	Après filtration sur verre	32
16	Illustration d'un aliment fonctionnel disponible en épicerie	35
17	Exemple de produit de santé naturel avec microalgues	36
18	Exemple de produit pour animaux de compagnie	39
19	Source de tous les nouveaux médicaments approuvés entre 1981-2002	40
20	Représentation schématique de processus global de la photosynthèseLe	44

21	Une scie sauteuse	45
22	Une fraiseuse	46
23	La perceuse électrique	47
24	Schéma du réacteur	48
25	Photographie du réacteur	48
26	Schéma du dispositif expérimental.	50
27	Les cyanobactéries (cyanophycées)	51
28	Filament vu au microscope (x10) montrant 3 cellules contiguës	52
29	Les spirogyres en reproduction	52
30	microscope binoculaire de type Zeiss	53
31	Microalgues avant purification	56
32	Microalgues après purification	56
33	Filtration	57
34	Miroalgues récupérées	57
35	Pesées des microalgues	58
36	Evolution de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps	59
37	Influence de l'agitation sur la culture des microalgues	60
38	Les spirogyres vertes	63
39	les spirogyres blanches	63
40	Influence de la température sur la culture des microalgues.	64

Liste des tableaux

N°	Titres	page
1	Comparaison des avantages et inconvénients des bassins de type raceway et des photobioréacteurs	22
2	Les différents types nutritionnels des microalgues	25
3	Evolution de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps	59
4	Influence de l'agitation sur la culture des microalgues.	60
5	Solutions stocks	62
6	Influence de la température sur la culture des microalgues.	64

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Généralités sur les photobioréacteurs

1. 1. Introduction.....	3
1.2.Qu'est ce qu'un photobioréacteur.....	3
1. 3. Le principe de fonctionnement d'un photobioréacteur.....	3
1. 4. La lumière et le photobioréacteur	4
1. 5. L'hydrodynamique au sein des photobioréacteurs.....	5
1. 6. Les formes géométriques les plus courantes.....	6
1. 6. 1. Les photobioréacteurs plats.....	6
1. 6. 2. Les photobioréacteurs cylindriques.....	7
1. 7. Caractéristiques des principaux types photobioréacteurs.....	11
1. 8. Techniques d'agitation et de mise en circulation.....	13
1. 8. 1. Description des systèmes d'agitation.....	13
1. 9. Techniques mises en œuvre pour l'optimisation des photobioréacteurs.....	14

1. 10. Quelques exemples d'applications académiques et semi-industrielles.....	15
1. 10. 1. Les photobioréacteurs plats.....	15
1. 10. 2. Les photobioréacteurs cylindriques et de leurs variantes.....	16

Partie 2 : les microalgues

2. 1. Introduction.....	18
2. 2. Définition et caractéristiques des microalgues.....	18
2. 3. Milieu de vie.....	20
2. 4. Techniques de mise en culture.....	20
2. 4. 1. Différents modes de production de biomasse micro-algale.....	20
2. 4. 2. Influence du milieu.....	23
2. 4. 3. Facteurs permettant d'augmenter la synthèse lipidique.....	24
2. 4. 4. Modes de nutrition des microalgues.....	24
2. 5. Classification des algues.....	25
2. 6. Les conditions de culture des algues.....	27
2. 7. Sélection des algues.....	30
2. 8. Extraction des lipides	30
2. 8. 1. La synthèse des lipides et leur extraction.....	30
2. 8. 2. Le protocole d'extraction.....	31
2. 8. 3. La tans-estérification.....	33
2. 9. Domaine d'application des microalgues	34
2. 9. 1. Bénéfices des algues comme biocarburant.....	34
2. 9. 2. Autres applications.....	34

Partie 3 : Croissance et modélisation des microalgues en présence de la lumière

3. 1. Les micro-organismes photosynthétiques.....	43
3. 2. Le processus global de la photosynthèse.....	43

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

1. Conception du réacteur en plexiglas.....	45
1. 1. Usinage.....	45
1. 2. Assemblage.....	47
2. Le dispositif expérimental.....	49
3. Matériel biologique.....	51
4. Les paramètres étudiés.....	53
5. Technique d'analyse des microalgues : la microscopie.....	53
6. Démarche expérimentale : la numération cellulaire.....	54

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Provenance des microalgues.....	55
2. Préparation du photobioréacteur.....	56
3. Etude de la croissance des microalgues.....	57
3. 1. Les microalgues vertes (zygnéma, spirogyra).....	57
3. 1. 1. Influence de la lumière sur la croissance des microalgues.....	57
3. 1. 2. Influence du temps d'exposition à la lumière.....	58
3. 1. 3. Influence de l'agitation sur la croissance des microalgues.....	60
3. 1. 4. Influence de l'ajout des nutriments sur la croissance des microalgues.....	61
3. 2. Les microalgues bleu-vert (cyanophycée).....	63
CONCLUSION.....	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67
ANNEXE	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques unicellulaires dotées d'une croissance rapide et ont la particularité de produire des métabolites à haute valeur ajoutée comme les pigments, les antioxydants, les polysaccharides, des acides gras essentiels ; pour réaliser des opérations de dépollution (métaux lourds, fixation de CO₂), voir pour produire de l'hydrogène.

Les microalgues peuvent être cultivées en bioréacteurs (enceintes dans lesquelles se déroulent des interactions biologiques). Ces photobioréacteur peuvent être construits avec des matériaux transparents laissant passer la lumière et autorisant les réactions de photosynthèse. L'éclairage se fait à partir de la lumière solaire ou artificielle avec des lampes ou des tubes fluorescents.

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de contrôler les conditions de culture (distribution et évacuation du CO₂, de l'O₂, contrôle du pH, de la température,...).

L'utilisation d'un bioréacteur contrôlé permet de maintenir la stérilité de la culture ; c'est à dire que l'on évite ainsi la contamination du réacteur par une autre souche que celle que l'on désire cultiver. En effet, il existe de très nombreuses souches de bactéries naturellement présentes dans notre environnement (inoffensives ou pathogènes) qui pourraient se développer dans le milieu de culture utilisé par la souche que l'on produit, occasionnant de graves dysfonctionnements. Pour se prémunir, on stérilise le bioréacteur et son milieu de culture

Deux autres paramètres extrêmement variables et importants, mais qui sont en général surveillés sont le pH et la température. En effet, un micro-organisme donné fonctionne de façon optimale dans des limites de pH et de température assez étroites (dépendant le plus souvent des conditions de son milieu naturel) : le maintien de la valeur de ces paramètres est nécessaire. L'agitation est également un paramètre important sur un bioréacteur, car il faut s'assurer qu'il existe un brassage suffisant des cellules et du milieu de culture de façon à éviter l'existence de gradients de concentration ou de zones peu agitées qui ne fonctionneraient pas de façon optimale dans le réacteur.

Dans ce travail, on se propose de cultiver des microalgues issues du barrage hydraulique de Tichy-Haf sis dans la commune de Bouhamza dans la wilaya de Béjaïa Algérie. Cette étude comporte la conception d'un photobioréacteur de type plat permettant d'étudier l'influence des différents paramètres physico-chimiques (temps d'exposition à la lumière, agitation, température...) sur la culture des microalgues. Ce travail est divisé en trois chapitres :

- Le *premier* est une étude bibliographique concernant les microalgues, les photobioréacteurs ainsi que la cinétique de croissance des microalgues.

- Le *deuxième* chapitre est relatif à la description du matériel et des méthodes expérimentales ayant permis la réalisation pratique de cette étude.

- Le *troisième* chapitre est consacré à la présentation de nos résultats expérimentaux et leurs discussions.

Enfin, nous terminons par une conclusion, résumant l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus et les perspectives pour la poursuite de ce travail.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Généralités sur les photobioréacteurs

1. 1. Introduction

La notion de photobioréacteur date déjà de quelques décennies. Il s'agit d'une enceinte confinée où des microorganismes photosynthétiques sont cultivés dans des conditions contrôlées (pH, température, pression, etc.). De nombreux photobioréacteurs ont été réalisés et expérimentés avec des formes géométriques diverses.

1. 2. Qu'est ce qu'un photobioréacteur ?

Un photobioréacteur (PBR) 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. A l'intérieur du PBR, 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.

1. 3. Le principe de fonctionnement d'un photobioréacteur

Le principe du fonctionnement des photobioréacteurs est le suivant : au sein d'une enceinte confinée, le bioréacteur, des microorganismes photosynthétiques sont cultivés, dans des conditions contrôlées, à l'aide des substrats nécessaires à leur croissance et d'un apport d'énergie lumineuse. Les interactions biologiques ayant lieu en milieu fermé, il est indispensable de maîtriser les conditions de cultures.

Il faut en particulier gérer le processus d'homogénéisation du milieu, et effectuer un suivi de la température, du pH et de lumière [1].

1. 4. 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 mortelle, pour les microalgues [1]. On peut distinguer deux grandes catégories de PBR suivant la source lumineuse : les PBR solaires et les PBR à lumière artificielle.

La première catégorie (PBR solaire) est généralement utilisée pour la production en masse, profitant ainsi de la ressource solaire pour la mise en place d'une production industrielle à grande échelle. On citera par exemple les géométries tubulaires utilisées pour les cultures de *Chlorella vulgaris* (alimentation humaine et animale), *Hametococcus pluviialis* (production d'astaxanthine) ou *Arthrospira platensis* (production de biomasse) [2].

Les PBR à lumière artificielle sont utilisés pour des productions à petite échelle. Les différents paramètres (température, pH, agitation etc...) en plus de la lumière peuvent alors être rigoureusement maîtrisés, ce qui rend particulièrement utiles les systèmes en lumière artificielle pour l'étude de la croissance des micro-organismes photosynthétiques et l'optimisation d'un ou plusieurs paramètres [2].

La croissance des microorganismes (microalgues), et donc 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 le 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.

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 et l'apparition de pigments accessoires.
- En profondeur, des effets d'auto-ombrage peuvent conduire à une photoalimentation 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 [1].

1. 5. 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.

Les différentes phases en présence 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).

L'hydrodynamique 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 [3]. 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 [3].

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

1. 6. Les formes géométriques les plus courantes

La géométrie du photobioréacteur c'est le critère dont dépend principalement la problématique de l'accès à la lumière.

Deux familles de photobioréacteurs se dégagent au point de vue géométrique : les photobioréacteurs plats (géométrie plane) et les photobioréacteurs tubulaires (géométrie cylindrique). Pour chacune de ces deux familles des variantes existent ; elles sont liées à des besoins spécifiques.

1. 6. 1. Les photobioréacteurs plats

Un photobioréacteur plat se compose de deux panneaux parallèles transparents pour laisser passer la lumière, de surfaces variables et entre lesquels réside une mince couche de culture d'une profondeur (épaisseur) de quelques centimètres (Figure 1).

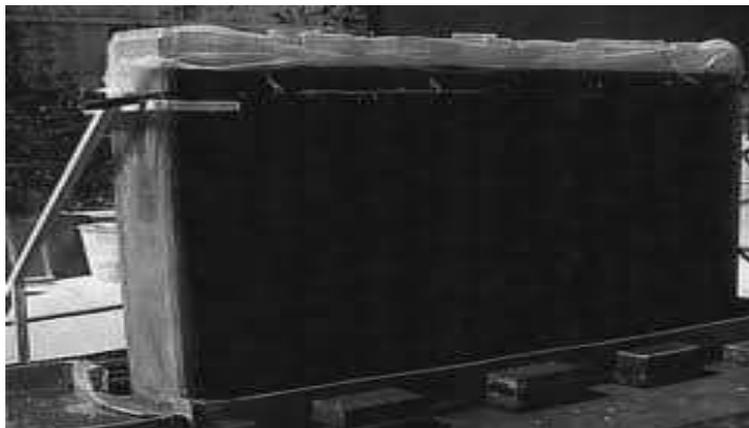


Figure 1 : Photobioréacteur de type plat

1. 6. 2. Les photobioréacteurs cylindriques

Un photobioréacteur cylindrique se compose d'un ou plusieurs tubes transparents, de diamètres et longueurs variables, de configurations diverses et au sein desquels circule la culture. Pour les photobioréacteurs cylindriques, les variantes de configuration sont multiples [4].

➤ Les photobioréacteurs de type colonne

Le photobioréacteur cylindrique de type « scobalit » est un système classique qui est très répandu dans l'aquaculture française. Ce photobioréacteur se compose d'une colonne verticale, dont la dimension varie tant en hauteur qu'en diamètre.

En général, les dispositifs utilisés dans les écloseries font 2 m de haut pour environ 30-50 cm de diamètre (Figure 2) et sont éclairés latéralement par des tubes fluorescents [5].

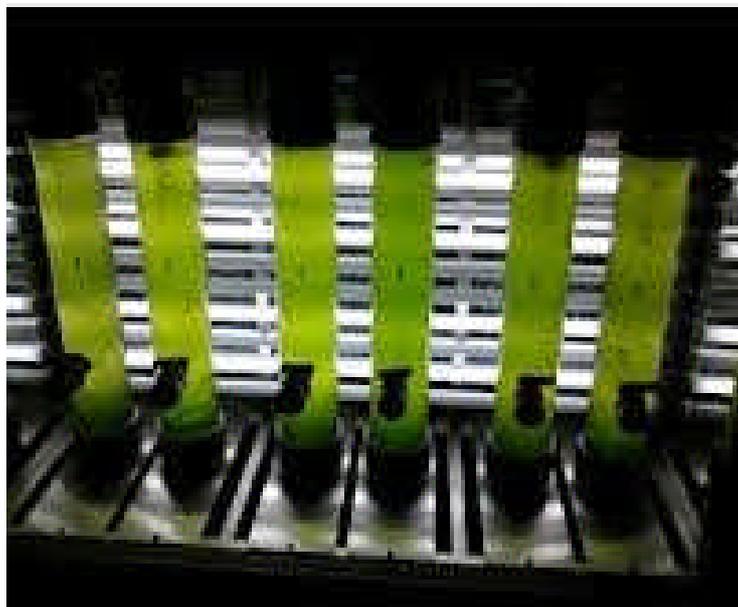


Figure 2 : Photobioréacteur de type colonne

➤ Les photobioréacteurs de type annulaire

Les photobioréacteurs annulaires sont des photobioréacteurs cylindriques agencés d'une manière particulière : ils sont fabriqués à partir de deux tubes de diamètres différents emboîtés l'un dans l'autre pour constituer ainsi un espace annulaire dans lequel circule la culture (Figure 3). La variante annulaire est intéressante du point de vue de la distribution de la lumière artificielle que l'on peut situer au centre du système de tubes. Cependant, ce type de géométrie est plutôt complexe et difficile à extrapoler car elle occupe une surface importante au sol pour un volume de culture restreint.



Figure 3 : Photobioréacteur de type annulaire

➤ Les photobioréacteurs tubulaires agencés horizontalement

La configuration tubulaire se présente sous forme de boucles, ou serpents, qui laissent passer la lumière entre les interstices des boucles (Figure 4) [6].

Dans les années 1980, Gudin et Chaumont, notamment, ont mis au point ce type de photobioréacteur en forme de serpent au sol, dont la culture circule à l'aide d'une pompe et

d'une zone airlift afin de limiter les dommages cellulaires [7]. Par la suite des améliorations y ont été introduites avec un système de balles en plastique permettant un auto-nettoyage des parois des tubes rigides. L'ensemble de ce photobioréacteur est d'un coût prohibitif et nécessite une maintenance trop importante pour pouvoir être aisément commercialisé [5].

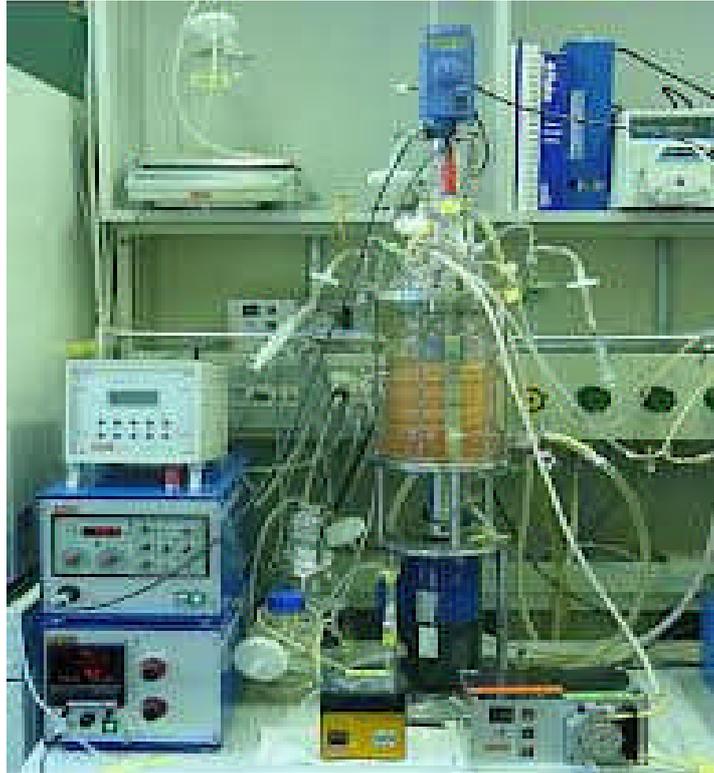


Figure 4 : Photobioréacteur tubulaire agencé horizontalement

➤ Les photobioréacteurs tubulaires agencés verticalement

Les photobioréacteurs tubulaires qui utilisent l'énergie solaire nécessitent de grandes surfaces au sol. Afin de restreindre cet encombrement, des photobioréacteurs à structure verticale ont été conçus : ils utilisent généralement des tubes de diamètre relativement faible (inférieur à 200 mm).

Le photobioréacteur « Biocoil » est un photobioréacteur tubulaire dont les tubes sont enroulés autour d'une structure verticale (Figure 5), ce qui offre l'avantage de pouvoir utiliser une grande longueur de tube (donc un grand volume de culture) tout en occupant une surface réduite [8].

D'autres photobioréacteurs cylindriques utilisent des tubes connectés les uns aux autres par des tubulures [9].

Les longueurs de tubes sont au cœur de la problématique des photobioréacteurs tubulaires agencés horizontalement ou verticalement. Dans les photobioréacteurs tubulaires horizontaux, le flux doit être maintenu régulier et uniforme pour permettre une circulation homogène de la culture le long des tubes : il est directement dépendant de la longueur et du nombre des tubes disposés en parallèle [10].

Malgré un gain de place indéniable, ces structures verticales ou horizontales (de serpentins à plat ou enroulés) sont sujettes à des problèmes d'encrassement et de limitations en terme de transferts gazeux [11].

Contrairement aux photobioréacteurs de type colonne, les échanges gazeux sont moindres: l'évacuation de l'oxygène produit par la culture est souvent problématique et peut s'avérer limitant voire inhibant [10]. L'accumulation d'oxygène dissous dans ces tubes horizontaux peut entraîner une inhibition de la croissance cellulaire et des dommages dus à la photooxydation [12]. D'après la littérature [4], cette concentration en oxygène peut atteindre 8 à 10 mg. l⁻¹.min⁻¹ dans des photobioréacteurs tubulaires de 1 cm de diamètre. Ce phénomène varie aussi en fonction de l'intensité de lumière [12].

La capacité de désorption de l'oxygène dissous est directement liée au coefficient volumique de transferts des gaz (K_{La}) : il est très faible dans ce type de géométrie [4]. Ainsi, les difficultés majeures rencontrées lors de l'utilisation de ces photobioréacteurs sont un mauvais mélange, une mauvaise distribution de la culture le long des tubes, un mauvais contrôle de la température, un encrassement des tubes et, en général, l'absence d'un système de pilotage approprié [5].



Figure 5 : Photobioréacteur « Biocoil »

1. 7. Caractéristiques des principaux types de photobioréacteurs

1. 7. 1. Eclairage

L'éclairage des photobioréacteurs, en extérieur, peut simplement être naturel en utilisant la lumière solaire : les panneaux sont alors généralement installés horizontalement ou de façon inclinée pour améliorer l'utilisation de l'irradiance solaire [13].

Une variante consiste, pour certains photobioréacteurs cylindriques, à placer les photobioréacteurs sur des surfaces réfléchissantes afin d'accroître, par réflexion, l'incidence du rayonnement [3].

A l'intérieur, les photobioréacteurs peuvent être placés sous serre, mais souvent des sources lumineuses artificielles sont utilisées, telles que des tubes fluorescents (de type : « cool white » ou

lumière du jour). Placés verticalement ou horizontalement, ils sont souvent agencés sous forme de murs de tubes horizontaux ou verticaux [5].

1. 7. 2. Régulation

L'utilisation d'un photobioréacteur contrôlé permet de contrôler les grandeurs caractérisant la croissance telles que le dégagement d'oxygène, la consommation de dioxyde de carbone, l'augmentation du pH. Cette régulation assure l'optimisation des cultures.

➤ Contrôle du pH

La régulation du pH de la culture est obtenue à l'aide de CO₂ distribué, quel que soit le système d'agitation. A noter que l'aération et le mélange du milieu de culture en scobalits (photobioréacteur à colonne) s'effectuent par un bullage simple d'air enrichi entre 2 et 5 % de CO₂.

➤ Contrôle de la température

Les moyens de contrôle et systèmes de régulation de la température des photobioréacteurs en extérieur comme en intérieur sont variés : ils peuvent être entourés d'une enveloppe d'eau froide placée à la base du procédé [14] où la régulation thermique pour les photobioréacteurs plat est réalisée par une circulation d'eau dans des compartiments adjacents aux panneaux de la chambre de culture [15] Une variante de ce système est l'utilisation de tubes à écoulement d'eau placés au sein même de la culture [16].

Plus particulièrement, à l'extérieur, des jets d'eau permettent le contrôle de la température par évaporation [4]. La régulation thermique peut se faire également en immergeant le photobioréacteur dans un bassin rempli d'eau [6], ou encore en aménageant autour de lui un système d'ombrage [5].

Quant à l'intérieur, les petits volumes sont généralement placés dans des pièces climatisées [17].

1. 8. Techniques d'agitation et de mise en circulation

I. 8. 1. Description des systèmes d'agitation

L'agitation est un paramètre important dans un photobioréacteur car il faut s'assurer qu'il existe un brassage suffisant des cellules et du milieu de culture de façon à éviter l'existence de gradients de concentration ou de zones peu agitées. Cependant, une agitation trop importante n'est pas forcément supportée par les micro-organismes, surtout s'ils sont pluricellulaires comme beaucoup de cyanobactéries ou de microalgues. L'agitation influence fortement l'efficacité du transfert gaz-liquide au sein du réacteur. Il existe plusieurs façons d'agiter un réacteur ; les réacteurs dits agités peuvent l'être par des moyens mécaniques (différents types de mobiles d'agitation sont mus par un moteur) ou pneumatiques (par injection de gaz).

➤ Injection de gaz

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.

Ces modes de fonctionnement permettent également d'aérer le milieu et ainsi de ne pas être limitant en termes de transferts gaz-liquide (apport du dioxyde de carbone et élimination de l'oxygène dissous).

Enfin, un système d'évacuation des gaz doit être prévu (évents). A noter qu'au niveau de la zone d'échappement du gaz, l'éclatement des bulles en surface peut entraîner une zone de salissure où s'accumulent les cellules mortes propices aux développements bactériens.

➤ Pompe

Les pompes sont des dispositifs externes de mise en circulation largement répandus. Elles sont insérées dans le circuit d'alimentation du photobioréacteur, généralement sur les canalisations. Il est important de souligner que ces dispositifs peuvent avoir un effet néfaste sur les cellules, en particulier celles sensibles aux stress hydrodynamiques [18].

➤ **Mobiles d'agitation**

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.

Ces dispositifs sont utilisés dans les photobioréacteurs cylindriques verticaux ou horizontaux, les photobioréacteurs plats ayant une chambre de culture d'épaisseur en général trop faible.

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 [19]. Cependant, pour les grands volumes (quelques dizaines de litres), il est nécessaire d'augmenter la vitesse de rotation des hélices pour vaincre les pertes de charges (photobioréacteur tubulaire) ce qui n'est pas toujours bien supporté par tous les microorganismes.

Des systèmes à hélices peuvent provoquer des cisaillements et des taux de turbulence élevés qui perturbent la physiologie des cellules de flagellés.

1. 9. Techniques mises en œuvre pour l'optimisation des photobioréacteurs

1. 9. 1. Optimisation de la lumière

Différentes pistes existent pour améliorer l'accès à la lumière par les microalgues et pour uniformiser l'éclairage sur l'ensemble de la surface. Cependant, dès qu'il s'agit de grandes surfaces (supérieures à 1 m²), ceci demeure encore délicat.

➤ **Les solutions pour améliorer l'exploitation lumineuse**

L'optimisation de l'utilisation de l'énergie lumineuse au sein des photobioréacteurs passe par la résolution des problématiques liées, d'une part, à la géométrie et au volume de l'enceinte, et, d'autre part, aux procédés et techniques mis en œuvre pour l'agitation et la mise en circulation de la culture.

La géométrie du photobioréacteur doit autant que possible privilégier une surface spécifique éclairée élevée.

On appelle surface spécifique éclairée α le rapport de la surface éclairée (en m²) divisée par le volume total du réacteur (en m³). Pour un réacteur rectangulaire éclairée d'un coté, α est tout simplement égale à l'inverse de l'épaisseur e du réacteur : $\alpha = E_{\text{clairée}}/t_{\text{total}} = 1/e$ (m²/m³).

Les procédés et techniques d'agitation de mise en circulation des microorganismes au sein de la culture se doivent de favoriser au maximum l'accès de chacune des cellules algales à une irradiance adéquate (alternance maximale entre zones éclairées et zones sombres) et de minimiser la formation de dépôts sur les parois (biofilm), très négatif pour la pénétration de la lumière dans le milieu.

➤ Epaisseur de la culture

L'intérêt d'une couche de culture de faible épaisseur se justifie si le flux incident de lumière est maîtrisé afin d'éviter tout phénomène de photoinhibition [4].

Lors de l'utilisation de photobioréacteurs plats, une faible épaisseur de culture (quelques centimètres) améliore l'exploitation de la lumière par la culture, en limitant la zone d'atténuation [20]. Pour Molina Grima et al. [21], les photobioréacteurs cylindriques, de petits diamètres sont à privilégier car ils permettent une bonne distribution de la lumière.

1. 10. Quelques exemples d'applications académiques et semi-industrielles

1. 10. 1. Les photobioréacteurs plats

Les photobioréacteurs plats sont généralement de production modeste (Figure 6) et sont donc bien adaptés aux études dédiées à l'expérimentation en laboratoire, tout particulièrement si ces dernières sont liées aux transferts radiatifs [5].

I. 10. 2. Les photobioréacteurs cylindriques et de leurs variantes

Les photobioréacteurs cylindriques ont des applications en laboratoire pour des études en conditions contrôlées et en production de tailles modestes.

Ils peuvent aussi permettre la production massive de biomasse algale (de centaines de milliers de tonnes de matières sèches par an), ou des productions intermédiaires (quelques grammes de biomasse par litre de culture) plus coûteuses dont la finalité est l'exploitation des molécules d'intérêt excrétées par les algues [4].

Des études relatives aux transferts de matières gazeuses sont réalisées en photobioréacteurs cylindriques de type colonne : l'influence des conditions d'injection d'air sur les performances des cultures y sont étudiées [14]. A l'aide d'un dispositif de ce type (bullage), Eriksen et al [14] ont démontré que la libération de bulles de petites tailles permet d'obtenir une plus grande surface de contact avec le milieu de culture et qu'ainsi le transfert du CO₂ est plus efficace.

Récemment, Zittelli et al. [17] ont utilisé des photobioréacteurs de type annulaire pour des études de transferts radiatifs (zones sombre et éclairée) et leurs influences sur la productivité.

Le photobioréacteur de la société Yamaha Motor Co. « Pipe Photobioreactor » est un autre exemple de photobioréacteur annulaire destiné à des cultures de microalgues (*Chaetoceros gracilis* et *Chlorococum littorale*) pour l'aquaculture et la bioremédiation du CO₂ des gaz de combustion.

Le système Hydrobiologica SA Plant (Argentine) est un photobioréacteur tubulaire agencé horizontalement, dédié à la culture d'*Arthrospira platensis*, où la concentration est maintenue à 1 g. l⁻¹ pour une productivité de 0,2 g. l⁻¹.j⁻¹ [4].

Ce système consiste en 96 tubes de polyéthylène, placés au sol horizontalement et en parallèle. Chaque tube mesure 120 m de long et 25,5 cm de diamètre et est partiellement rempli, donnant un volume total de culture de 600 m³. La circulation est réalisée à l'aide d'une pompe (900 m³.h⁻¹) à la vitesse de 6 à 10 cm.s⁻¹(Figure 7) [4].

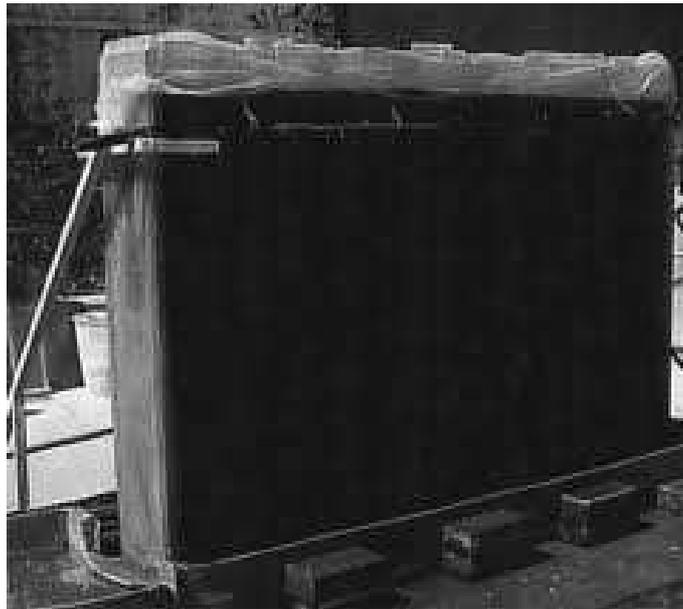


Figure 6 : Photobioréacteurs plats : photobioréacteur de 500 L construit au laboratoire de l'Institut Jacob Blaustein pour le projet "Desert Research" (Richmond 2000) [8].



Figure 7 : Photobioréacteurs tubulaires et en colonnes

Partie 2 : les microalgues

2. 1. Introduction

Il existe plusieurs espèces de microalgues possédant un métabolisme hétérotrophe. Celles-ci se distinguent toutefois de par leurs caractéristiques nutritionnelles et leur capacité à produire des acides gras pouvant servir à la production de biodiesel. Ces caractéristiques seront donc présentées dans cette section. Les nombreuses méthodes de culture, de récolte et d'extraction seront également discutées afin de permettre une compréhension générale des techniques de production utilisées [1]).

2. 2. Définition et caractéristiques des microalgues

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques unicellulaires dotées d'une croissance rapide et de la particularité de produire des métabolites industriellement intéressants (polysaccharides, pigments, lipides). On utilise le terme «micro» car la taille d'une micro algue varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Pour les étudier, il est nécessaire de les observer au microscope optique ou au microscope électronique, ce qui permet de voir plus de détails, en particulier relatifs à leur morphologie. Elles constituent un matériel photosynthétique de choix pour capturer du CO₂ et fabriquer de la biomasse.

Les microalgues appartiennent à différentes familles qui ont chacune leurs propres caractéristiques, mais elles ont aussi des points communs en particulier dans leur ultra structure et leur métabolisme. Les organismes photosynthétiques sont regroupés en trois catégories distinctes: les bactéries photosynthétiques, les algues et les plantes terrestres. Le terme algue regroupe des individus chlorophylliens vivant essentiellement dans l'eau et qui ne sont pas des embryophytes. Les contraintes du milieu aquatique ont conduit à des convergences structurales et physiologiques comme l'existence d'une paroi souple. Les organismes ainsi regroupés sont pourtant bien éloignés phylogénétiquement: comme les Rhodobiontes (algue rouge), Chlorobiontes, Straménopiles (algue brune), Haptophytes. Algues rouges et algues brunes sont des groupes monophylétiques c'est-à-dire se reconnaissent comme partenaires sexuels et donnent une descendance féconde. Par contre les algues vertes sont paraphylétiques et donc des groupes dont l'ancêtre commun est aussi partagé avec d'autres groupes (Figure 8).

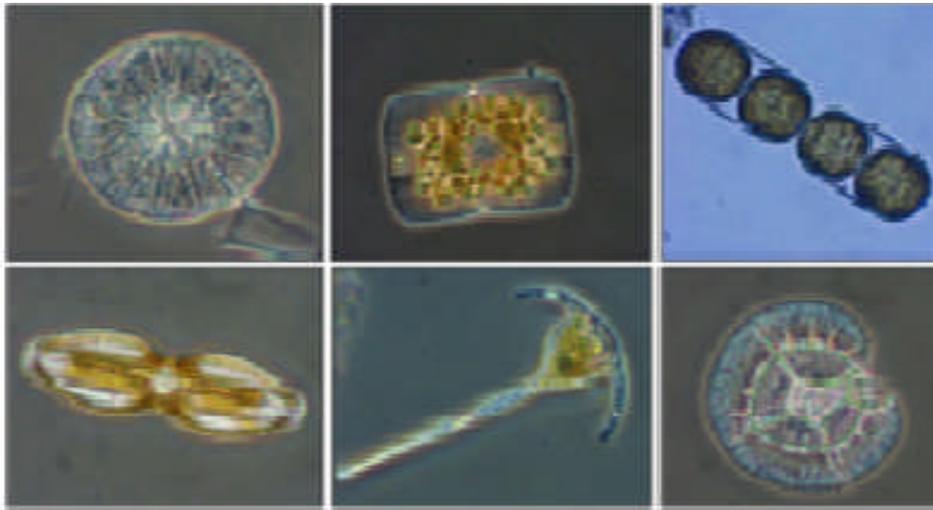


Figure 8 : Photos de différentes microalgues (Source : ARVAM)

Les microalgues peuvent vivre sous forme libre ou en colonie. Ce sont des micro-organismes appartenant à deux groupes: les eucaryotes et les procaryotes. Les microalgues eucaryotes possèdent une structure cellulaire végétale classique compartimentée, avec ou sans paroi cellulosique, et, avec des pigments photosynthétiques renfermés dans des plastes. Les microalgues procaryotes, appelées aussi cyanobactéries, ont une structure bactérienne classique sans compartiment, les pigments photosynthétiques étant contenus dans des membranes lamellaires.

En ce qui concerne la multiplication des microalgues, elles ne grandissent pas. Par contre, certaines d'entre elles, comme les diatomées, peuvent voir leur taille diminuer. Comme toutes les microalgues, elles colonisent leur milieu en se divisant par mitose, rapidement et activement, si les conditions physico-chimiques et nutritives sont favorables. Lors de cette reproduction asexuée, leur taille diminue jusqu'à ce qu'elles ne puissent plus se diviser.

2. 3. Milieu de vie

Les microalgues vivent dans les milieux fortement aqueux. Il existe 1100 genres de microalgues dont 14000 espèces d'eau douce et 14000 d'eau salée. Ce sont des êtres photosynthétiques, c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire de la matière organique à partir d'éléments minéraux grâce aux processus d'assimilation photosynthétique. Dès lors qu'elles disposent de la lumière, elles vont assimiler les éléments minéraux nutritifs comme le potassium, le sodium, le calcium et le magnésium, des oligo-éléments (molybdène, zinc, cuivre) et le CO₂ dissous dans l'eau pour produire leurs constituants cellulaires. Dans leur cytoplasme, elles possèdent des chloroplastes, organites renfermant des pigments chlorophylliens. Ces pigments assurent le captage de l'énergie lumineuse, qui est ensuite utilisée pour synthétiser la matière organique nécessaire à la cellule, à partir des éléments minéraux nutritifs. Les microalgues sont donc des êtres autotrophes par photosynthèse mais il est possible que certaines d'entre elles, comme les euglènes, deviennent hétérotrophes lorsqu'elles sont placées dans des conditions défavorables de survie. Par exemple, si des microalgues sont placées dans le noir, elles perdent leurs chloroplastes et deviennent dépigmentées : elles vont s'alimenter alors grâce à la matière organique présente dans le milieu. Notons que certaines microalgues, en majorité les cyanobactéries filamenteuses, sont capables de fixer l'azote de l'air, grâce à des structures spécialisées appelées hétérocystes, qui contiennent une enzyme la nitrogénase. Cette hétérocyste n'est pas capable de photosynthèse mais il est en relation avec les cellules somatiques adjacentes qui lui fournissent les matières carbonées en échange de composés azotés.

2. 4. Techniques de mise en culture

2. 4. 1. Différents modes de production de biomasse micro-algale

Les deux principales méthodes de production à grande échelle de biomasse micro algale sont les systèmes ouverts (bassins) et les photobioréacteurs.

➤ Système de production ouvert : bassin de type « raceway »

Les cultures d'algues à l'air libre représentent 10000 tonnes par an de matière sèche. A grande échelle, la production de masse se fait principalement à l'aide de bassins de type

« raceway », de toutes tailles (entre 1000 et 5000 m²), en eau douce ou salée. Ils sont constitués de bassins clos, de quelques dizaines de cm de profondeur, circulaires ou formant des boucles imbriquées les unes contre les autres (Figure 9).



Figure 9 : Bassin raceway

➤ Photobioréacteurs

Les microalgues peuvent être également cultivées en bioréacteurs (enceintes dans lesquelles se déroulent des interactions biologiques, utilisées pour la production de biomasse, d'un métabolite, pour la conversion d'une molécule,...). Dans le cas des algues, on utilise des photobioréacteurs, construits dans des matériaux transparents laissant passer la lumière et autorisant les réactions de photosynthèse. L'éclairage se fait à partir de la lumière solaire ou artificielle avec des tubes fluorescents. Il peut être optimisé avec un certain angle d'inclinaison du réacteur.

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de contrôler les conditions de culture (distribution et évacuation du CO₂, de l'O₂, contrôle du pH, de la température,...), et aussi de maintenir la stérilité de la culture.

Comparaison entre les deux systèmes de culture

La culture utilisant l'énergie solaire comme le système « raceway » nécessite des infrastructures plus simples et un investissement financier moins important que le photobioréacteur. Les bassins de type « raceway » présentent toutefois des points faibles non négligeables : ces bassins étant à ciel ouvert, la productivité peut être affectée par des contaminations non désirées et la perte d'eau par évaporation peut jouer un rôle significatif. De plus, le volume de biomasse produite y est moindre (plus de 13 fois supérieure dans un photobioréacteur). Les systèmes ouverts présentent de nombreux défauts en comparaison avec les systèmes fermés. Néanmoins, ces contraintes peuvent être réduites si l'on souhaite cultiver une espèce extrémophile, et si les conditions extérieures sont propices à la culture. La comparaison entre les deux systèmes de culture est représentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des avantages et inconvénients des bassins de type raceway et des photobioréacteurs [24].

Systèmes	Bassin de type « raceway »	Photobioréacteur
Paramètres		
Risque de contamination	Fort, sauf pour les espèces extrémophiles	très faible si le procès est maîtrisé
Impacts des conditions extérieures	Important	Faible
Dimensions des réacteurs	Illimitée	Limitée
Concentration en biomasse	Faible	Elevée, jusqu'à 10 g. l ⁻¹
Rapport S/V	Faible (1 à 8)	Elevé (de 20 à 100)
Perte en CO₂	Importantes	Maîtrisables
Concentration en O₂	Faible	Elevée
Eclairage	Dépendance totale aux conditions climatiques	Possibilité d'éclairage en continu mais la source lumineuse est gourmande en énergie
Agitation	Nécessaire	Nécessaire
Coût	Elevé	Faible à modérée

Refroidissement	Non nécessaire (évaporation)	Nécessaire
------------------------	---------------------------------	------------

2. 4. 2. Influence du milieu

La croissance d'une culture de microalgues est contrôlée par un très grand nombre de facteurs dont les plus importants sont la lumière (intensité et photopériode), le pH, les nutriments, les concentrations en CO₂ et O₂ et l'état physiologique. De ce fait, la recherche d'une production de biomasse algale doit passer par une modélisation de la croissance au cours du temps, en fonction de différents paramètres d'étude.

La cinétique de croissance algale

Les microalgues sont capables de se multiplier de manière rapide dans des conditions favorables. Par conséquent, la maîtrise de la cinétique de croissance est un paramètre important (Figure 10). La croissance en culture des microalgues suit un développement en 4 phases :

Phase de démarrage : c'est une phase de latence, qui se traduit par une adaptation aux nouvelles conditions de culture.

Phase de croissance exponentielle : pendant cette phase les cellules se multiplient au maximum de leur capacité. Elles présentent au cours de celle-ci leur meilleur profil nutritionnel.

Phase stationnaire : durant cette phase les microalgues ont épuisé un ou plusieurs éléments nutritionnels ou ont relâché des composés limitant la multiplication cellulaire.

Phase de décroissance : c'est une phase de décroissance rapide, où la culture vient à mourir du fait de la pollution du milieu; on parle de « crash ».

D'un point de vue pratique, il convient donc de garder la culture en phase de croissance exponentielle le plus longtemps possible. Ceci permet de bénéficier d'un matériel biologique en abondance sans que la mortalité cellulaire ne soit importante.

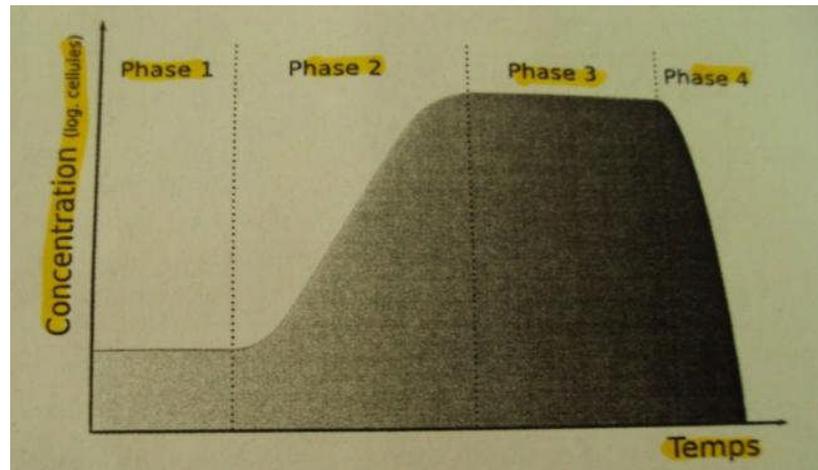


Figure 10 : Modélisation de la cinétique de croissance algale

2. 4. 3. Facteurs permettant d'augmenter la synthèse lipidique

Chez certaines espèces, il est possible d'augmenter significativement la production de lipides par un stress. Les stress identifiés peuvent être de différentes natures.

Les conditions de carence en azote sont connues pour stimuler la production de lipides. Pour les diatomées, une limitation par la silice conduit également à la production de lipides. L'augmentation soudaine de l'intensité lumineuse produit un effet similaire. Enfin, un choc thermique, de même qu'un choc osmotique stimule également la production de lipides, mais il semble que ces deux derniers stress favorisent davantage les lipides polaires (phospholipides et glycolipides) associés aux membranes cellulaires.

2. 4. 4. Modes de nutrition des microalgues

Les microalgues sont principalement connues comme étant des organismes photo-autotrophes. L'autotrophie est un mode de nutrition des microalgues leur permettant d'utiliser les rayons solaires afin de synthétiser leur énergie. Les microalgues de métabolisme autotrophe utilisent également une source de carbone inorganique comme le CO_2 et le HCO_3 pour la synthèse du carbone organique [25]. Ce carbone organique est essentiel à la synthèse de toutes les composantes organiques nécessaires à leur survie. Par ailleurs, plusieurs microalgues ont un

métabolisme hétérotrophe de nutrition et celles-ci n'ont pas besoin de l'énergie solaire. Elles utilisent plutôt une source de carbone organique pour la production de l'énergie et des composants organiques.

Les microalgues de métabolisme mixotrophe peuvent, soit avoir un métabolisme autotrophe, ou encore hétérotrophe. En effet, en absence d'énergie lumineuse, lorsqu'une source de carbone organique est disponible, le développement des chloroplastes est inhibé et ces microalgues métabolisent leur énergie en mode hétérotrophe [25]. Le tableau 2 présente les différents types nutritionnels des algues.

Tableau 2 : Les différents types nutritionnels des microalgues

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

2. 5. Classification des algues (la production de biodiésel à partir des microalgues)

Les microalgues sont très rarement regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques [26]. Il existe donc différentes classes taxonomiques de microalgues dont les principales sont les cyanophycées, les chrysophycées, les rhodophycées, les euglenophycées, les chlorophycées et les bacillariophycées.

2. 5. 1. Les Cyanophycées (algues bleues-vertes)

Les cyanophycées ou algues bleues-vertes sont des algues procaryotes très répandues ne possédant aucun noyau dont environ 7 500 espèces sont connues à ce jour [27]. Elles sont habituellement de petites tailles, soit 10 µm ou moins, et peuvent être retrouvées dans pratiquement tous les habitats (eaux fraîches, eaux salées, eaux saumâtres et sols) étant donné leur aptitude à résister à des températures extrêmes et leur résistance à la dessiccation [28].

Cependant, la majorité des algues bleues-vertes ont des températures optimales de croissance de 32 à 35 °C [28]. La principale restriction des cyanophycées provient du fait que ces dernières nécessitent la présence de lumière pour leur croissance et sont donc principalement des organismes autotrophes obligatoires. Les cyanophycées emmagasinent principalement leur énergie sous forme d'amidon (amylose et amylopectine) ou encore sous forme d'huiles [27].

2. 5. 2. Les Chrysophycées (algues dorées)

Les chrysophycées ou algues dorées sont généralement présentes dans les eaux douces. Cette classe est représentée par 150 genres et environ 800 espèces. Le mode de nutrition de ces algues est très varié, mais certaines d'entre elles possèdent un mode de nutrition hétérotrophe comme *Ochromonas danica* qui comprend un pourcentage de 27,4 % en acides gras et dont la source de carbone assimilée est le glucose [27].

2. 5. 3. Les Rhodophycées (algues rouges)

Il existe près de 4 000 espèces d'algues rouges qui sont retrouvées dans les eaux saumâtres et salées et très rarement dans les eaux douces. Comme les phaeophycées, cette classe ne comprend aucune algue de métabolisme hétérotrophe et la plupart d'entre elles sont photoautotrophes ou photoorganotrophes [27]. Bien que certaines espèces contiennent des acides gras, leur utilisation pour produire du biodiesel en absence de lumière ne semble pas envisageable.

2. 5. 4. Les Euglenophycées

Il existe plus de 800 espèces d'euglenophycées qui sont retrouvées généralement dans les eaux saumâtres et douces. Les principales réserves de ces algues sont constituées de paramylon, une substance glucidique, et d'huiles. Les études réalisées à partir des euglenophycées démontrent que celles-ci possèdent une nutrition complexe et qu'il est difficile de définir des besoins nutritionnels communs pour plusieurs espèces. Une espèce en particulier, *Euglena gracilis*, peut croître en mode autotrophe et hétérotrophe [27]. Lorsque cultivée en absence de lumière, un substrat contenant de l'acétate, des acides organiques, de l'alcool ou des sucres peut être utilisé. Cette espèce possède d'ailleurs un intérêt particulier quant à la production d'acides gras.

2. 5. 5. Les chlorophycées (algues vertes)

Les chlorophycées sont retrouvées dans tous les types d'habitat et l'amidon et l'huile constituent leurs principales réserves énergétiques. Parmi ce groupe, plusieurs microalgues possèdent un métabolisme photo autotrophe, photo hétérotrophe et chemohétérotrophe. L'espèce la plus étudiée possédant un métabolisme chemohétérotrophe est *Chlorella vulgaris*. Cette espèce est très intéressante pour la production de biodiesel en raison de la quantité d'acides gras qu'elle renferme. Les principales sources de carbone assimilables le sont sous forme de sucres et d'acide acétique. D'autres espèces faisant partie de cette classe ont un potentiel intéressant pour la production d'algocarburants dont notamment l'espèce *Chlorella protothecoides*.

2. 5. 6. Les bacillariophycées (diatomées)

Les diatomées représentent souvent le groupe dominant de micro algues parmi les populations de phytoplancton et sont extrêmement répandues dans tous les types d'habitat.

En effet, plus de 100 000 espèces sont connues et il en existerait plus de un million [28]. Celles-ci sont unicellulaires et mesurent de 2 mm à 1 mm [28]. Les diatomées emmagasinent leurs réserves sous forme de chrysolaminaran, un polysaccharide, ainsi que d'huiles. Elles sont d'ailleurs reconnues pour leur contenu en acides gras et pendant plusieurs années, les scientifiques croyaient que les lipides représentaient le seul composé de réserve [29]. Les composants majeurs de ces lipides sont les triglycérides. Les microalgues telles que *Nitzschia sp.* et *Navicula pelliculosa* sont intéressantes pour la production de biodiesel en mode hétérotrophe étant donné l'importance du pourcentage en acides gras qu'elles contiennent.

2. 6. Les conditions de culture des algues

Les microalgues sont des plantes, elles réalisent la photosynthèse. Cette réaction est complexe et il faut que les conditions de culture soient favorables pour qu'elle puisse se réaliser.

2. 6. 1. La lumière :

• Source

Pour les cultures extérieures en grands volumes (plusieurs dizaines de m³), il est raisonnable d'utiliser l'énergie lumineuse du soleil. Par contre, dans les salles d'algues climatisées la lumière est souvent artificielle. Les installations les plus utilisées sont des tubes fluorescents classiques ou encore des lampes haute pression aux iodures métalliques. Ainsi pour les tubes néons, on préférera les tubes classiques, du genre "lumière du jour" ou "blanc industriel".

• Intensité

L'intensité lumineuse dépend beaucoup de la profondeur et de la densité des cultures. Ainsi pour un petit volume (erlenmeyer, ballons), un éclairage de 1000 lux peut suffire. Par contre, l'éclairage nécessaire pour des bacs ou des gaines de plus de 100 litres est d'au moins 5000 lux.

Les tubes fluorescents classiques ont une efficacité lumineuse d'environ 90 lumens/Watt, alors que les lampes HPS (vapeur de sodium haute pression) ont une efficacité d'environ 130 Lumens/Watt. Un tube néon de 36 W produit donc un flux lumineux d'environ 3240 Lumens, mais ce flux n'est pas réparti régulièrement dans l'espace.

• Durée d'éclairage

Les espèces cultivées en aquaculture se développent très bien en éclairage continu. De plus, les tubes fluorescents s'abîment moins en restant constamment allumés.

2. 6. 2. La température :

La croissance des principales microalgues se déroule normalement à des températures entre 17 et 23 °C. Il existe cependant des différences entre les espèces (*Pavlova lutheri* supporte mal les températures supérieures à 20 °C) et même entre les souches (ainsi la souche "*Tahiti*" de *Isochrysis galbana* préfère des températures plus élevées).

Les tubes fluorescents produisant de la chaleur, il est donc nécessaire de refroidir les cultures ou l'air de la salle d'algue. Les climatiseurs de cave peuvent être utilisés pour les petites salles.

On notera qu'en cas de panne de la climatisation il est préférable d'éteindre l'éclairage dans la pièce car la température peut s'élever dangereusement pour les cultures, qui peuvent par contre supporter plus de 12 heures d'obscurité.

2. 6. 3. Les sels minéraux :

Les sels minéraux les plus importants pour les microalgues sont les mêmes que pour les plantes supérieures : Azote et Phosphore. Il faut aussi fournir aux microalgues des oligo-éléments comme le fer, le manganèse, le cobalt, le cuivre et le molybdène.

Par contre, pour les diatomées, il est nécessaire de rajouter de la silice sous forme dissoute (méta silicate de sodium) au milieu de culture. Ce sel se dissout très mal dans l'eau de mer, il faut toujours préparer une solution de stock dans de l'eau déminéralisée.

Il existe de nombreuses "recettes" de milieux de culture, certaines sont adaptées à des microalgues particulières ou à des conditions particulières (eau douce, eau de forage, etc...) mais les principaux milieux de cultures utilisés en aquaculture sont le Conway, le f/2 de Provasoli ou encore le milieu de Walnes. Les dilutions intermédiaires que l'on doit préparer dans ces recettes servent à faciliter les dosages.

2. 6. 4. Le pH :

Les microalgues consomment le CO₂ dissous pour la photosynthèse. Il en résulte une augmentation du pH du milieu de culture par une modification de l'équilibre carbonaté de l'eau. Le pH des cultures concentrées peut ainsi dépasser 9,5. Ce pH peut devenir le facteur limitant, il est donc possible d'augmenter la densité des cultures en jouant sur ce paramètre. La méthode la plus simple à mettre en œuvre est l'ajout de dioxyde de carbone (gazeux) dans l'air qui sert à remuer les cultures. Une proportion de 0,5 à 1 % peut être conseillée. Il est aussi possible d'utiliser de l'acide chlorhydrique dans les cultures continues.

2. 7. Sélection des algues

Une espèce d'algues doit répondre à certaines caractéristiques [30] :

- être robuste et capable de survivre aux contraintes de stress dans les photobioréacteurs
- être en mesure de dominer les souches sauvages dans les bassins ouverts de production
- avoir une haute capacité de capture du CO₂
- avoir des besoins limités en nutriments
- tolérer des écarts de température résultant du cycle diurne et des variations saisonnières
- pouvoir fournir des coproduits de grande valeur
- avoir un cycle de productivité rapide
- avoir une haute efficacité photosynthétique
- faire preuve de capacités d'auto-floculation

Afin d'utiliser des microalgues comme biocarburant, elles doivent également posséder un pouvoir calorifique élevé et doivent être capable de croître dans de grands volumes. La principale contribution au pouvoir calorifique des cellules est la teneur en glucides, protéines et lipides. Les microalgues cultivées dans des conditions normales possèdent un pouvoir calorifique de 18-21 kJ/g, tandis que celui du pétrodiesel est de 42 kJ/g. Un milieu de culture avec une faible teneur en azote induit une accumulation de lipides qui augmente le pouvoir calorifique des algues. Par exemple, le pouvoir calorifique de *C. vulgaris* peut atteindre 28 kJ/g [31].

2. 8. Extraction des lipides

2. 8. 1. La synthèse des lipides et leur extraction

De nombreuses recherches sont orientées vers la production de biocarburants à partir des microalgues, mais celles-ci comptent encore de nombreux défis à relever. L'un des premiers challenges consiste à identifier les microalgues les plus riches en lipides parmi les millions d'espèces existantes. En effet, actuellement beaucoup de travaux ont été réalisés dans le domaine de la sélection de souches de microalgues les plus efficaces pour la production de lipides (triglycérides). Les triglycérides sont le composant principal de l'huile végétal.

Ils sont formés d'une molécule simple de glycérol, combinée avec trois acides gras sur chacun des groupes OH (Figure 11). Un second défi à prendre en compte est l'optimisation de l'extraction des lipides. Cette étape est la plus délicate du procédé de production biocarburant.

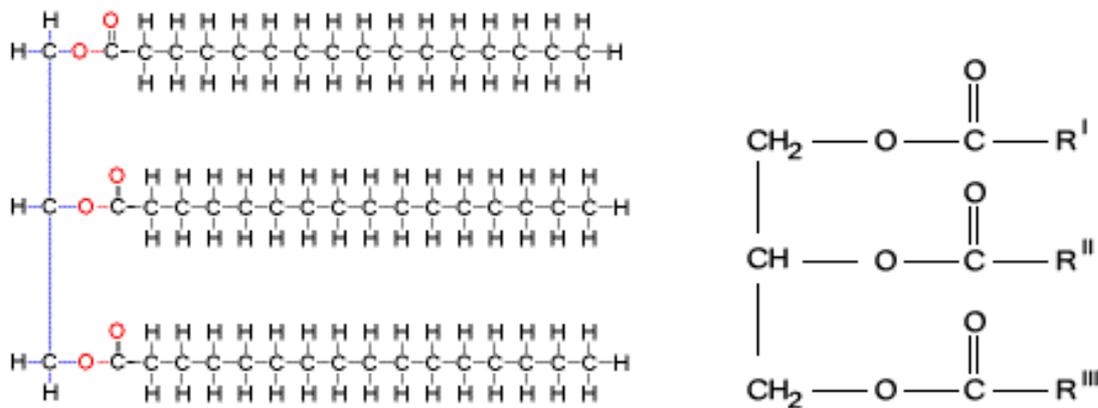


Figure 11 : Triglycéride : Glycérol ($C_3H_8O_3$) avec trois acides gras à longue chaîne (chaîne carbonée) : 15 atomes de carbone par acide gras.

2. 8. 2. Le protocole d'extraction

La récolte des microalgues peut se faire soit par centrifugation, soit par filtration (Figure 12 et 13). La centrifugeuse est la technique la plus utilisée, à 8500 tr/min pendant 5 min. Ensuite les microalgues sont lavées une fois avec de l'eau distillée puis séchées. En effet, si la matière à extraire est humide, il sera difficile d'extraire les lipides car le dichlorométhane (qui sera ajouté pour séparer les lipides) est insoluble dans l'eau.

Après séchage, les échantillons sont broyés dans un mortier et extraits par un mélange de chloroforme: méthanol (2:1, v/v). Les échantillons sont ensuite soumis à une agitation mécanique pendant 5 h et à ultrasons pendant 30 min puis ces premiers sont centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 min. La phase solide est séparée avec soin en utilisant un papier filtre. La phase solvant est évaporée dans un évaporateur rotatif sous vide à 60 °C (Figures 14 et 15).

La procédure est répétée trois fois jusqu'à ce que la totalité des lipides soit extraite ou bien on ajoute le dichlorométhane à l'échantillon séché pour faire séparer les lipides. Sachant que le dichlorométhane est volatile, on le laisse s'évaporer afin d'obtenir, au final, des triglycérides. L'analyse des différents types d'acides gras est réalisée par Chromatographie en Phase Gazeuse.



Figure 12 : Filtration

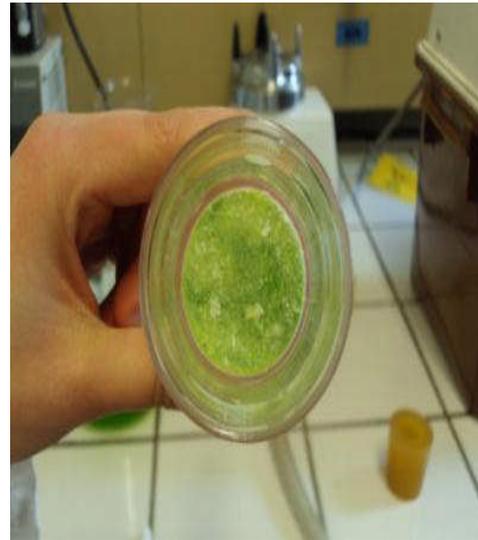


Figure 13 : Rétention des débris cellulaires



Figure 14 : Évaporateur rotatif

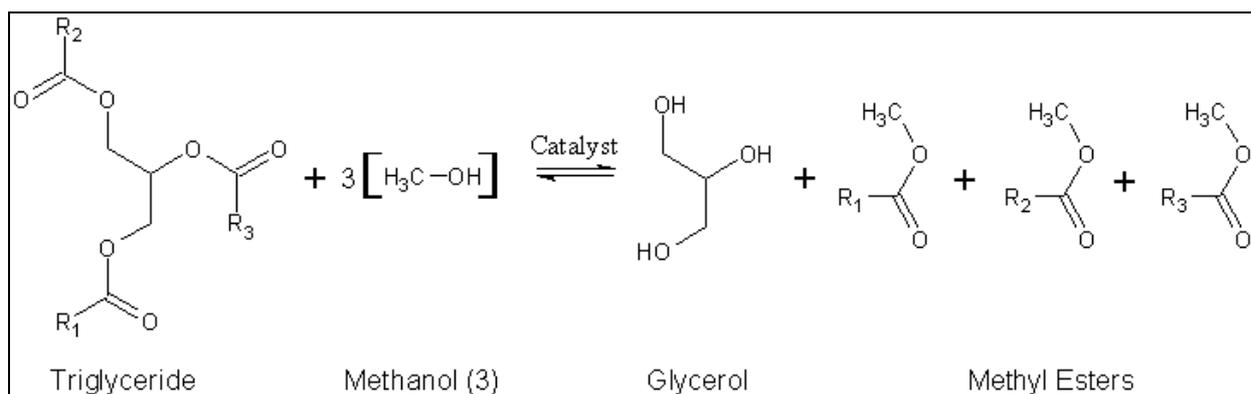


Figure 15 : Après filtration sur verre

2. 8. 3. La tans-estérification

Il existe plusieurs réactions permettant de transformer l'huile extraite en carburant. La technique la plus utilisée étant la tans-estérification, qui fait réagir l'huile avec un alcool (méthanol ou éthanol), afin d'obtenir de l'EMHV (Esters Méthyliques d'Huiles Végétales) ou le Biodiesel. Une tonne d'huile avec 0,1 tonne de méthanol produit une tonne d'EMHV et 0,1 tonne de glycérine en présence d'un catalyseur alcalin. L'algo-carburant obtenu est utilisé seul dans les moteurs ou mélangé avec du diesel issu du pétrole. L'équation chimique de la réaction de trans-estérification est la suivante :

1 mol de triglycéride + 3 mol de méthanol → 3 mol d'EMHV + 1 mol de glycérol.



Cette technique est aussi utilisée pour transformer d'autres huiles végétales en biocarburants, elle permet de réutiliser le méthanol et d'extraire le glycérol qui a de nombreux usages notamment en cosmétique. Le biodiesel utilisé pour les transports et les huiles de chauffage ne doivent pas dépasser un indice d'iode respectivement de 120 et 130. Les huiles de micro-algues peuvent être traitées par hydrogénation catalytique.

2. 9. Domaine d'application des microalgues :

2. 9. 1. Bénéfices des algues comme biocarburant

La demande énergétique mondiale ne cesse d'augmenter. Pourtant, en 2003, la consommation des réserves pétrolières était déjà 105 fois trop importante par rapport à ce que la nature peut créer [32]. De plus, l'inconvénient majeur de l'utilisation de carburant à base de pétrole est la pollution atmosphérique générée par sa combustion. Celle-ci est source de gaz à effet de serre et d'autres contaminants de l'air comme les NO_x, SO_x, CO et les composés organiques volatiles [33]. De ce fait, les gouvernements ont fixé des objectifs pour diminuer la consommation de combustibles fossiles. Ils veulent développer la production d'énergie issue de sources renouvelables pour le carburant de transport.

Les biocarburants liquides peuvent être une alternative séduisante aux carburants de transport à base de pétrole. Il existe deux types de biocarburant : le biodiesel et le bioéthanol. Ils sont produits par ce qu'on appelle la biomasse ou source énergétique renouvelable. Ils peuvent remplacer, respectivement, le diesel et l'essence dans les voitures, directement ou après de légères modifications sur le moteur [34].

2. 9. 2. Autres applications

Les microalgues peuvent être commercialisées sous forme de biomasse sèche ou sous forme d'extraits. Il est évident que plusieurs utilisations et secteurs de marchés sont à développer ou à inventer. Actuellement, le plus gros marchés des microalgues est certes celui de la consommation humaine. A lui seul, il représente plus de 75 % de la production mondiale annuelle des microalgues [35]. Voici un tour d'horizon des marchés qui s'ouvrent à la culture des microalgues.

2. 9. 2 .1. Nutrition humaine et soins corporels

➤ Suppléments alimentaires

Les microalgues sont à la base d'une longue chaîne alimentaire et contiennent à elles seules des propriétés nutritionnelles impressionnantes. Plusieurs microalgues sont tout à fait

appropriées pour la consommation humaine. Par exemple, quelques programmes ont été mis sur pied pour tester les bienfaits de la spiruline sur la croissance d'enfants dans des régions défavorisées du globe.

Les microalgues les plus souvent retrouvées sur le marché de l'alimentation humaine sont les spirulines (*Spirulina sp*) du groupe des cyanophycées et les chlorelles (*Chrorella sp*) une algue verte. Récemment, en 2002, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a autorisé l'utilisation en France d'une diatomée marine, *Odontella aurita*, à des fins de consommation humaine, comme supplément alimentaire. La spiruline est reconnue comme une source complète de protéines en plus de contenir plusieurs vitamines et minéraux. La spiruline est composée à 62 % d'acide aminés. Les cyanophycées sont reconnues comme étant beaucoup plus digestibles que la plupart des autres types des microalgues.

De plus en plus de produits contenant des microalgues font leur apparition sur le marché de l'alimentation. Il est possible de retrouver des pâtes alimentaires, des biscuits et des jus avec des microalgues comme ingrédients. Ces produits alimentaires enrichis de microalgues sont présentés comme des aliments fonctionnels possédant des bienfaits pour la santé des consommateurs (Figure 16).

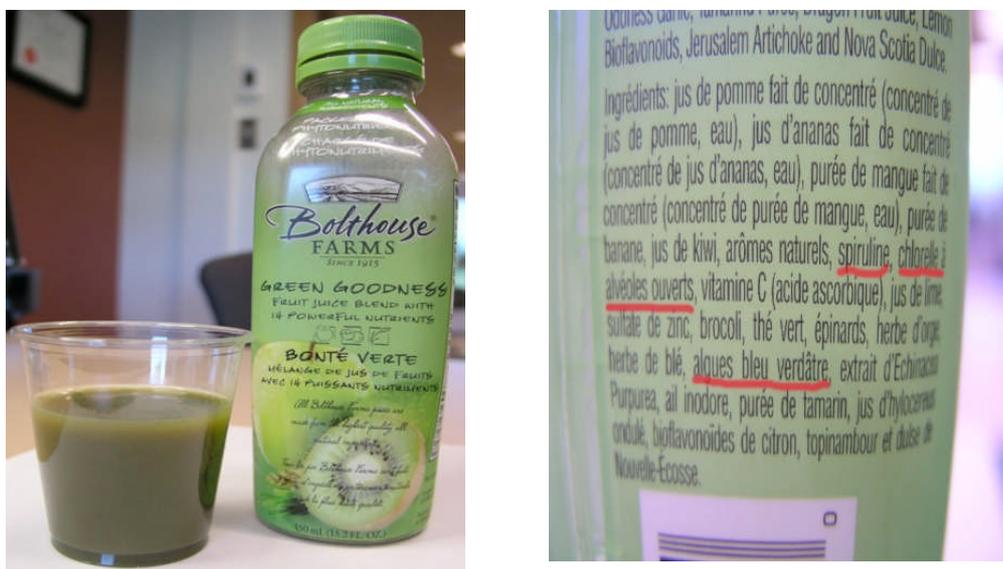


Figure 16 : Illustration d'un aliment fonctionnel disponible en épicerie

Le jus Bolthouse "Bonté Verte" est un bon exemple d'aliment auquel des microalgues ont été ajoutées pour revendiquer un effet santé. Dans celui-ci, nous retrouvons de la chlorelle aux parois cellulaires éclatées, de la spiruline et des algues bleu-vert.

➤ Produits de santé naturels-nutraceutique

Plusieurs producteurs ou vendeurs de produits à base de micro algues prêtent d'énormes bienfaits à leurs produits.

« Pouvoir rajeunissant », « combat le cancer », « renforce le système immunitaire » sont des affirmations qu'il n'est pas rare de lire sur les étiquettes des produits. Au-delà de ces prétentions, plusieurs études ont été réalisées sur certaines microalgues dont la spiruline. Mais cette dernière n'est pas considérée comme un médicament par les autorités de santé publique et les études sur le sujet sont encore insuffisantes (Figure 17).



Figure 17 : Exemple de produit de santé naturel avec microalgues

La spiruline et la chlorelle sont des composantes qui font souvent partie de la gamme des produits de type « Greens », très populaires et commercialisés par plusieurs compagnies.

Il est aussi pertinent de noter que des gras oméga-3 peuvent être extraits de micro algues et qu'ils constituent donc une alternative intéressante pour les végétariens à la recherche de ce type de supplément. Une compagnie des Etats-Unis, Martek, à réussi une véritable percée sur le marché des formulations de lait maternisé avec les oméga-3 et 6 extraits d'une espèce de micro algue. Ses formulations concentrées en Acide Docosahexaénoïque (DHA) et en acide arachidomique (ARA) font l'objet d'entente particulière avec des producteurs de lait maternisé qui représentent 70 % de ce marché. Le DHA et l'ARA favoriseraient le développement cérébral et visuel des fœtus et des nourrissons. Aussi des études publiées par le journal de l'association Alzheimer's montre que le DHA extrait d'algues, améliore la mémoire et la capacité d'apprentissage chez les adultes en bonne santé de 55 ans et plus.

Des extraits de micro algues riches en astaxanthine (*Haematococcus pluvialis*) ou en β -carotène (*Dunaliella salina*) sont commercialisés comme colorants alimentaires ou comme composés antioxydants dans les produits de santé naturels (PSN).

➤ **Cosmétique**

Plusieurs extraits de micro algues se retrouvent déjà sur le marché de la cosmétique. Par exemple, l'astaxanthine a été reconnue pour avoir des propriétés protectrices contre les rayons ultraviolets et elle a été ajoutée à certains produits. Les cosmétiques à base de lipides (crèmes et lotion) peuvent bénéficier d'extraits de micro algues pour ses propriétés nutritives et protectrices de la peau [35]. De plus, des extraits de micro algues sont utilisés pour pigmenter les produits cosmétiques [36].

2. 9. 2 .2. Nutrition animale

➤ **Aquaculture : alimentation et pigmentation**

En aquaculture, les micro algues sont utilisées comme aliments et comme source de pigments caroténoïdes d'intérêt (Astaxanthine, β -carotène, lutéine, zéaxanthine, etc.). Les microalgues font parties intégrante de la chaîne alimentaire aquatique et sont donc indispensables à la croissance des mollusques bivalves celle des jeunes stades de poissons et de crevettes.

De plus, elles représentent la nourriture exclusive des larves de plusieurs espèces de mollusques, crustacés et poisson. Les microalgues entrent en compétition sur ce marché des aliments aquicoles avec les pigments caroténoïdes de synthèse, des levures et des nourritures artificielles micro-encapsulées.

Les consommateurs recherchent aujourd'hui d'avantages des aliments dits naturels, libérés de produits chimiques (pigments synthétiques). La production de micro algues tend à se spécialiser pour répondre aux besoins nutritionnels précis de différentes espèces animales issus de l'aquaculture. Certaines microalgues cultivées de façon plus importante sont aussi introduites davantage dans l'alimentation d'espèce aquicoles afin de bénéficier des effets positifs observés sur les animaux (stimulation du système immunitaire des poissons, obtention d'une coloration « naturelle », ajout de facteurs de croissance).

➤ **Agriculture : suppléments nutritionnels**

La grande popularité des acides gras Omega-3 a fait naître une gamme de produits d'origine animale à base de ce supplément. Le lait s'affichant avec des Omega-3 est produit de deux façons, soit en ajoutant à l'usine de transformation un supplément, soit en donnant une alimentation riche en Omega-3 aux vaches laitières. Au Québec, le lait et les œufs riches en Omega-3 ont fait leur apparition sur les tablettes des supermarchés. En France, on retrouve même des charcuteries avec un supplément d'Omega.

Seuls les acides gras de type Omega-3 à longues chaînes possèdent un véritable effet de protection pour la santé du système cardiovasculaire. Etant donné la grande popularité des produits alimentaires enrichis en Omega-3, une utilisation plus vaste des microalgues comme source d'EPA et de DHA pourrait être développée. L'ajout de micro algues très riche en Omega-3 (EPA et DHA) dans l'alimentation des animaux de ferme pourrait s'avérer une avenue commerciale très intéressante afin d'obtenir des œufs et du lait enrichis en Omega-3 présentant un effet potentiel réel sur la santé des consommateurs [37]. De plus, plusieurs microalgues (chlorella, scenedesmus et spirulina) sont non seulement une source d'acides gras polyinsaturés mais possèdent aussi des bienfaits reconnus sur la santé des animaux en stimulant leur système immunitaire [35].

➤ **Animaux de compagnie et aquariophilie : suppléments alimentaires**

Les nombreux bienfaits des microalgues semblent attirants même pour le marché des animaux domestiques. En effet, les propriétaires d'animaux de compagnie ne s'intéressent pas seulement à la santé de leur animal mais aussi à leur aspect esthétique (poils brillants, belles plumes colorées, etc.). PULIZ et GROSS rapportent que des études sur des lapins et des visons ont démontré ce type de bienfaits par l'ajout de micro algues à leurs aliments [35]. Des gaufrettes à base de chlorelle sont vendues comme supplément alimentaire pour les animaux de compagnie. Pour 60 gaufrettes, le consommateur paiera en moyenne 32 \$ sur le site de Sun Chlorella (Figure 18).



Figure 18 : Exemple de produit pour animaux de compagnie

➤ **Recherches biomédicales et biopharmaceutiques**

Les microalgues sont une source intéressante de pigments fluorescents utilisés pour certains tests diagnostics médicaux. Quelques grandes compagnies de microalgues, telles Martek et Cyanotech, mettent sur le marché les phycobiliprotéines, produites par les cyanophycées. Selon la littérature, il s'agit d'un marché petit, mais stable [34]. Le criblage d'extraits de microalgues par les entreprises de biotechnologie afin d'identifier des molécules actives et des médicaments potentiels est aussi un secteur en expansion.

Bien que la compréhension des mécanismes physiologiques de ce groupe très diversifié ne soit encore qu'à ses débuts, le potentiel des microalgues dans ce domaine est très important simplement par le nombre gigantesque d'espèces et de souches du groupe. De plus, le contrôle des conditions de culture des micro algues permet d'infléchir, de maximiser ou d'optimiser la production de composés ciblés (production « bio dirigée »). Les microalgues peuvent alors agir comme de véritables usines à biomolécules d'intérêt.

➤ Les sources naturelles de médicaments

La majorité des médicaments sur le marché sont dérivés de produits naturels (f 4) ce qui peut être un bon présage pour la recherche sur les microalgues. En effet, 64 % des nouveaux médicaments approuvés entre 1981 et 2002 provenaient de sources naturelles ou bien de produits naturels modifiés tandis que seulement 33 % émanaient de produits totalement synthétiques, comme par exemple une librairie de la chimie combinatoire classique (Figure 19) [36].

Dans le cas du cancer, la proportion de nouveaux médicaments issus de sources naturelles est encore plus grande soit 69 % (f 5).

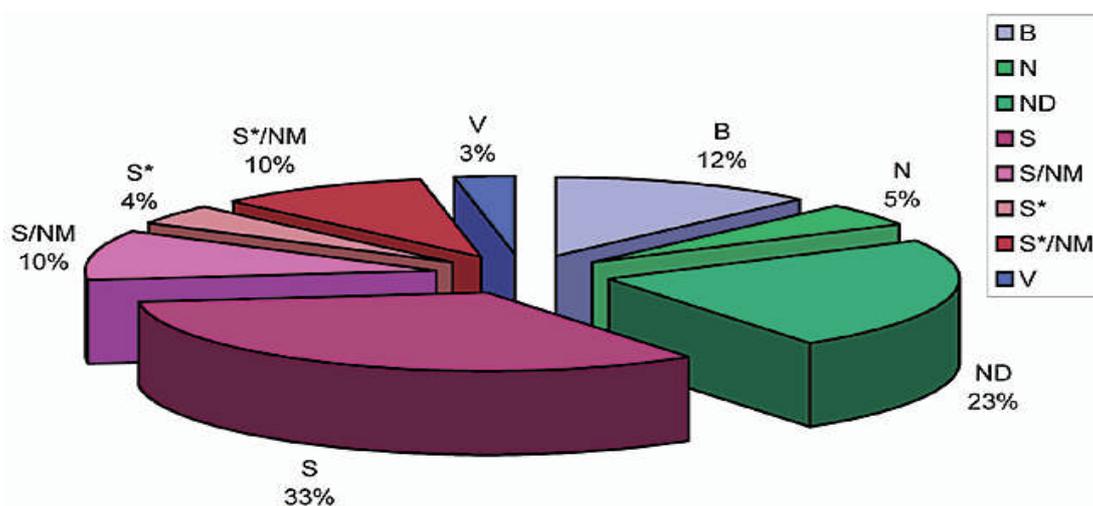


Figure 19 : Source de tous les nouveaux médicaments approuvés entre 1981-2002 [36]

B : biologique (peptide ou protéine isolé d'un organisme) N : produit naturel
 ND : dérivé d'un produit naturel (modification synthétiques) V : vaccin
 S' : produit de synthèse mais le pharmacophore provient d'un produit naturel
 S : totalement synthétique

Malgré l'augmentation significative de la capacité de l'industrie pharmaceutique à générer de petites molécules synthétiques (robotisation des laboratoires de synthèse organique, chimie combinatoire, etc.), il semble que la nature demeure la meilleure source d'inspiration et de diversité dans l'élaboration d'une librairie de produits originaux pour lutter contre les maladies.

2. 9. 2 .3. Environnement des algues

Les cultures d'algues nécessitent beaucoup moins d'eau que les cultures terrestres. Une étude a été menée pour quantifier l'utilisation de l'eau et des nutriments dans le cycle de vie de la production de biodiesel à partir de microalgues [38]. Si de l'eau douce est utilisée sans recyclage, 3 726 kg d'eau est nécessaire pour générer 1 kg de biodiesel. Les résultats ont indiqué que l'utilisation de l'eau de mer ou des eaux usées peut réduire l'utilisation d'eau douce à hauteur de 90 %. Cependant, une quantité importante d'eau douce (environ 400 kg par kg de biodiesel) doit être au minimum utilisée pour la culture des algues, peu importe si l'eau de mer ou les eaux usées servent de milieu de culture. Ensuite, un autre avantage est la capacité de cultiver les algues sur des terres abandonnées ou improductives en utilisant de l'eau saumâtre, salée, ou les eaux usées au lieu d'eau douce [39].

En effet, il s'avère que les algues sont tolérantes à de fortes concentrations en sel du milieu permettant ainsi l'utilisation de tout type d'eau pour l'agriculture [40]. De plus, les microalgues utilisent l'azote et le phosphore comme nutriments. Les systèmes d'aquaculture impliquant la production de microalgues et le traitement des eaux usées semblent donc être assez prometteurs. Par exemple, *C. vulgaris* a été utilisée pour supprimer l'azote et le phosphore des eaux usées avec une efficacité d'élimination moyenne de 72 % pour l'azote et 28 % pour le phosphore [41].

Enfin, le dernier avantage, et non le moindre, est l'opportunité de capter le CO₂. L'utilisation continue de carburant pétrolier est maintenant largement reconnue comme non viable en raison de la contribution à l'accumulation de CO₂ dans l'environnement. Les algues sont apparues comme l'une des sources les plus prometteuses pour la production de biodiesel parce qu'elles peuvent contribuer à résoudre les problèmes majeurs de pollution de l'air résultant de la teneur élevée en CO₂ de l'atmosphère. En fait, l'utilisation de micro algues pour la production de

biodiesel peut réduire considérablement les émissions des gaz à effet de serre car le CO₂ libéré lors de la combustion sera égal au CO₂ fixé lors de la photosynthèse et la croissance des algues [34]. Une étude a rapporté que l'utilisation d'une culture extérieure de *Chlorella sp.*, dans un photobioréacteur de 55 m² avec des fumées contenant 6-8 % en volume de CO₂, permet l'atténuation de 10 à 50 % de la teneur en CO₂ (décarbonatation des fumées), le NO₂ et NO résiduels dans les gaz de combustion n'affectent pas la croissance des algues [42].

Conclusion

Les biocarburants apparaissent comme une source d'énergie de transport indispensable à court terme. Les algues sont capables de produire du biodiesel et du bioéthanol qui peuvent être utilisés dans différents types de moteur. Il est à noter que ce sont les microalgues qui possèdent le potentiel le plus intéressant pour se destiner à la production de biocarburant du fait de leur haute efficacité photosynthétique et de leur capacité à produire une grande quantité de lipides.

Il existe de nombreux avantages à l'utilisation des algues comme matière première pour la production d'énergie de transport. Les algues sont capables de se développer avec des eaux usées comme milieu de culture. Ainsi, elles utilisent des nutriments présents dans le milieu et permettent, à cette occasion, le traitement des eaux usées. L'avantage principal est l'utilisation du dioxyde de carbone pour la croissance des algues. Ceci est dû à l'activité photosynthétique des Cellules algales. La capture du CO₂ atmosphérique permet la réduction de la pollution environnementale en minimisant l'effet des gaz à effet de serre. Théoriquement, la quantité de CO₂ émise lors de la combustion du biocarburant issu des algues sera minimisée par le fait que ces mêmes algues auront capté du CO₂ pour leur croissance. Enfin, la culture des algues pourra également permettre la production intensive de coproduits intéressants pour d'autres industries telles que l'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique ou l'industrie nutraceutique. Ces coproduits de haute valeur sont un atout pour la diminution du coût de production de biocarburant à partir de la biomasse des algues.

En fait, l'inconvénient majeur est que la commercialisation des algues comme biocarburant reste pour l'instant irréalisable. En effet, le coût de production est trop élevé et la croissance des algues demande l'utilisation de quantités importantes d'engrais azotés issus notamment du pétrole. Néanmoins, grâce aux recherches actuelles et à l'utilisation du génie génétique, de nombreuses améliorations seront bientôt possibles dans le but de rendre le

biocarburant issu des algues commercialement viable. Les microalgues alors ont la capacité de consommer du CO₂ pour produire de la matière organique grâce au processus de la photosynthèse, durant laquelle l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique.

Partie 3 : Croissance et modélisation des microalgues en présence de la lumière

3. 1. Les micro-organismes photosynthétiques

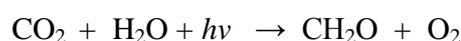
On entend par le terme «micro-organismes photosynthétiques», les cyanobactéries, les microalgues et les bactéries photosynthétiques. Les microalgues et les cyanobactéries sont des organismes végétaux qui constituent le phytoplancton aquatique et marin. En tant que micro-organismes procaryotes, les cyanobactéries ne possèdent pas de noyau, contrairement aux microalgues de nature eucaryotique. Chez les microalgues, la photosynthèse se déroule dans le chloroplaste qui est un organite cellulaire présent chez les plantes supérieures et certaines algues, et c'est dans les mitochondries que la respiration a lieu.

Dans le cas des cyanobactéries dépourvues de chloroplaste, la même chaîne de transporteur d'électrons est impliquée dans la respiration et la photosynthèse.

Dans les paragraphes suivants, nous expliquons en détails les processus de photosynthèse et de respiration dans le cas des microalgues. Ces deux processus, à la base de l'énergétique cellulaire, sont essentiels à la compréhension de la croissance de ces organismes et donc à l'établissement des modèles mathématiques la traduisant.

3. 2. Le processus global de la photosynthèse

La spécificité des microalgues provient de leur capacité à assimiler les sources de carbone et à faire leur propre matière organique grâce au processus de la photosynthèse, durant laquelle l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique. La photosynthèse est ainsi représentée globalement par l'équation :



La photosynthèse est le seul processus biologique capable de capter l'énergie lumineuse (solaire ou artificielle) pour la transformer en énergie chimique en fixant simultanément le dioxyde de carbone CO_2 et en libérant le dioxygène O_2 (Figure 19).

L'élément de base de la photosynthèse est le photosystème qui permet l'assimilation de l'énergie lumineuse (les photons) et son utilisation pour le fonctionnement de la chaîne photosynthétique. Un photosystème est constitué de deux parties: l'antenne collectrice formée des pigments accessoires (caroténoïdes, chlorophylle b et chlorophylle a), et le centre réactionnel contenant les pigments actifs (chlorophylle a).

Le processus mis en jeu au niveau de la chaîne photosynthétique est représenté sur la figure suivante (Figure 20)

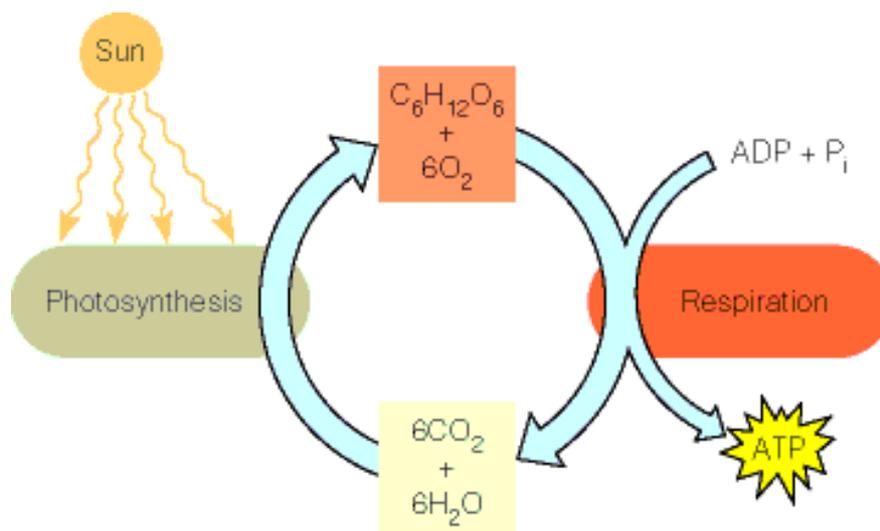


Figure 20 : Le processus global de la photosynthèse

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

EXPERIMENTALES

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

1. Conception du réacteur en plexiglas

Le plexiglas constitue la matière première pour la fabrication du réacteur. Nous avons effectué une série de transformation passant par plusieurs étapes : de l'usinage à l'assemblage des plaques en plexiglas (au Halle de technologie).

1. 1. Usinage

➤ La scie sauteuse

A l'aide d'une scie sauteuse nous avons découpé, dans un premier temps, les plaques en plexiglas (Figure 21).



Figure 21 : Une scie sauteuse

Les différentes plaques ainsi découpées sont utilisées pour concevoir un réacteur type plat en plexiglas de dimension (25×20×12 cm)

➤ La fraiseuse

La fraiseuse permet de tailler les plaques de plexiglas pour avoir des dimensions exactes du réacteur désiré. La fraiseuse étant une machine-outil utilisée pour usiner tous types de pièces mécaniques, à l'unité ou en série, par enlèvement de matière à partir de blocs ou parfois d'ébauches estampées ou moulées, à l'aide d'un outil nommé fraise.

La fraise munie de dents est mise en rotation et taille la matière suite à son déplacement ou au déplacement de la pièce en direction de ladite fraise. Les caractéristiques physiques de la fraise, sa fréquence de rotation, son avance, dépendent de la matière à usiner, de la profondeur de travail et de la coupe complexe (Figure 22).

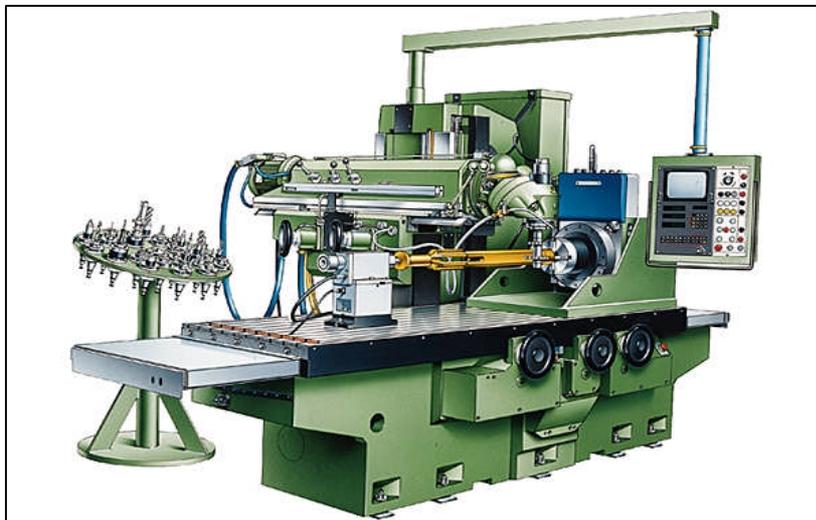


Figure 22 : Une fraiseuse

La fraiseuse comporte essentiellement une table porte-pièce et une broche (commandée par un moteur et une boîte de vitesses), qui entraîne la fraise en rotation, mobiles l'une par rapport à l'autre suivant trois axes orthogonaux. La table est portée par une console, elle-même supportée par le bâti. La broche est le plus souvent à axe horizontal. Elle peut entraîner un arbre porte-fraise ; il s'agit alors d'une *fraiseuse horizontale*. On peut également remplacer cet arbre par une tête universelle, qui permet de donner à l'axe de la fraise une direction quelconque ; il s'agit dans ce cas d'une *fraiseuse universelle*.

➤ La perceuse

La perceuse électrique nous a permis de percer deux trous pour placer deux injecteurs d'air ou d'oxygène, en dessous du réacteur (Figure 23).



Figure 23 : La perceuse électrique

1. 2. Assemblage

L'assemblage des plaques de plexiglas a été réalisé à l'aide de l'araldite (une colle à deux composants, constituée d'une résine époxyde et d'un agent polymérisant). Le réacteur fabriqué de type plat est représenté sur les figures 24 et 25.

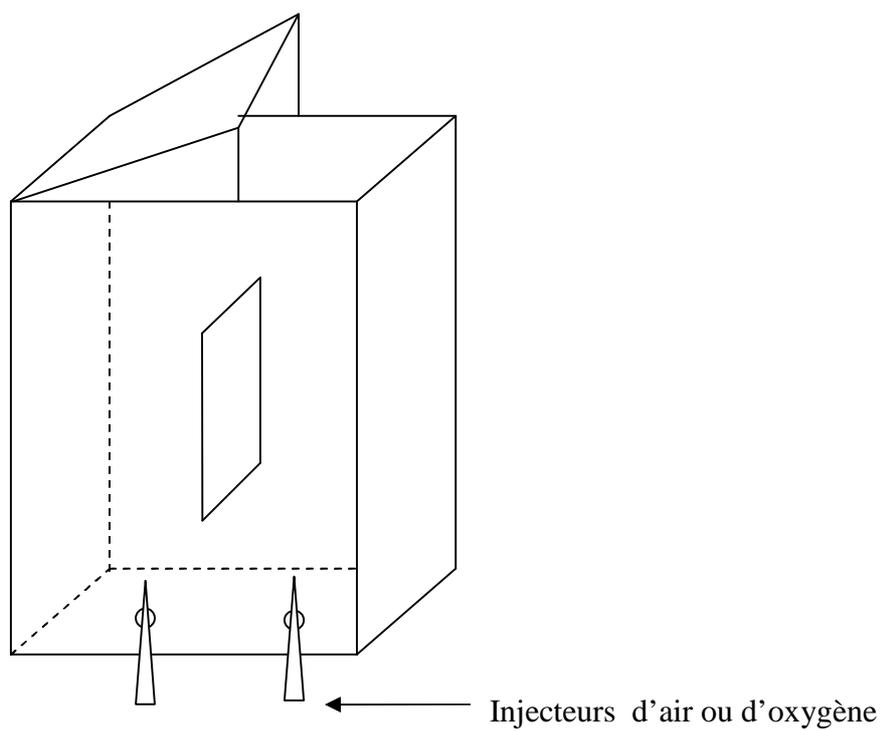


Figure 24 : Schéma du réacteur



Figure 25 : Photographie du réacteur

2. Le dispositif expérimental

L'installation complète, constituant le photobioréacteur, pour la culture des microalgues a été ainsi réalisée au laboratoire (figure 26). Les parties principales de cette installation sont :

- 1 – Le réacteur en plexiglas
- 2 – Les circuits gazeux.
- 3 – Le système d'éclairage
- 4 – Le pH mètre et thermomètre

1 - Le réacteur en plexiglas :

Le réacteur en plexiglas de type plat est disposé verticalement et permet de contenir un milieu de culture pouvant atteindre 2 litres. La biomasse d'algues est plongée dans le réacteur pour une durée de culture déterminée.

2 - Les circuits gazeux :

Le maintien du milieu de culture sous agitation permet d'accélérer le développement des microalgues. A cet effet, de l'oxygène est injecté par deux orifices en dessous du réacteur via des circuits en plastique. La pression et le débit d'arrivée d'oxygène circulant dans la chambre réactionnelle sont bien contrôlés. Les circuits gazeux sont reliés par l'intermédiaire de vannes à la bouteille d'oxygène.

3 – Le système d'éclairage :

L'éclairage artificiel est réalisé par une lampe basse consommation de 10 Watts de type PHILIPS. La lampe est disposée verticalement à une distance de 10 cm du réacteur. L'irradiance reçue par le milieu de culture est fonction de l'intensité lumineuse.

4 – Le pH mètre et thermomètre :

Le contrôle du pH et de la température du milieu de culture se fait de façon ponctuelle toutes les 20 minutes. Le contrôle de ces deux paramètres est primordiale car, d'une part la consommation du dioxyde de carbone a une incidence directe sur le pH du milieu de culture et d'autre part, l'augmentation de la température au delà d'une valeur seuil ralentit le développement des microalgues.

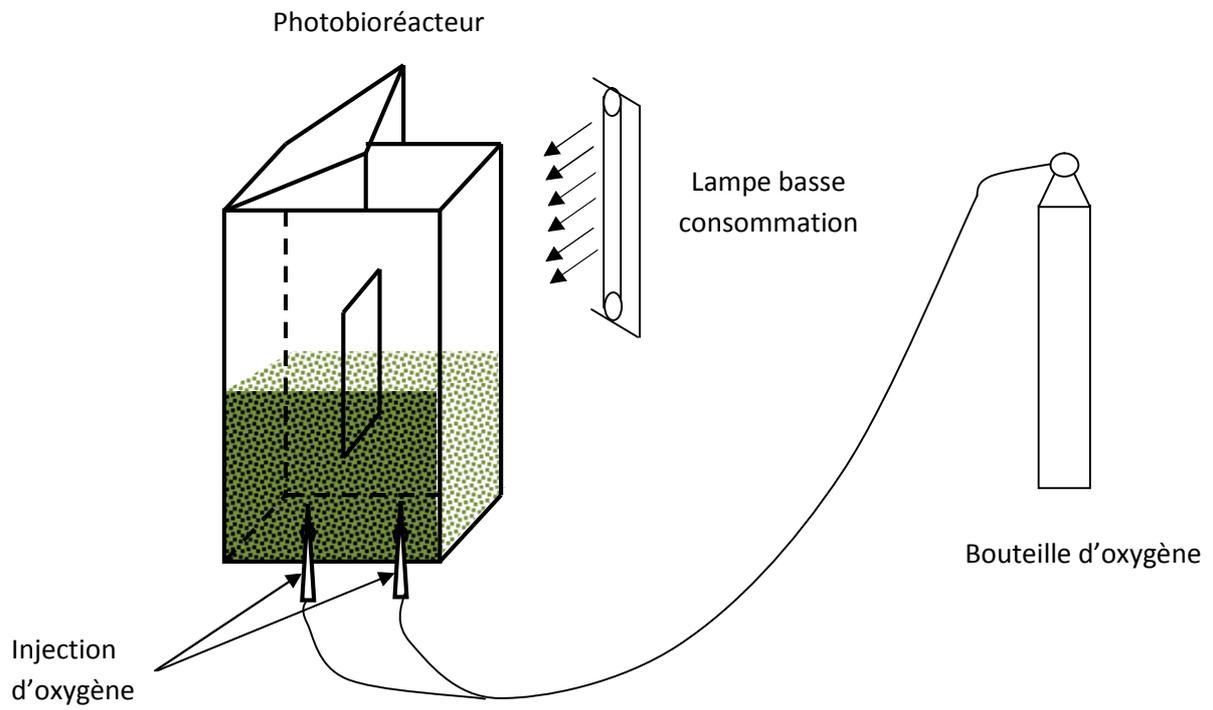


Figure 26 : Schéma du dispositif expérimental.

3. Matériel biologique

Dans ce travail, on se propose de cultiver des microalgues issues du barrage hydraulique de Tichy-Haf sis dans la commune de Bouhamza dans la wilaya de Béjaïa Algérie. Les échantillons de départ prélevés du barrage ont été introduit dans une boîte de pétri. Nous avons pu isoler et purifier deux types de microalgues : les microalgues bleu-vert (cyanophycée) et les microalgues vertes (zygnéma, spirogyre).

➤ Les microalgues bleues-vertes (cyanophycées)

Les cyanobactéries, ou cyanophycées, ou encore algues bleues (leurs anciens noms), sont des bactéries photosynthétiques, c'est-à-dire qu'elles tirent parti, comme les plantes, de l'énergie solaire pour synthétiser leurs molécules organiques. Pour capter cette lumière, elles utilisent différents pigments : des phycocyanines (de couleur bleu-vert) ou la chlorophylle (Figure 27). Leur photosynthèse, comme celle des plantes, produit du dioxygène. Les cyanobactéries vivent aujourd'hui un peu partout, dans l'océan, les eaux douces mais aussi sur la terre ferme.

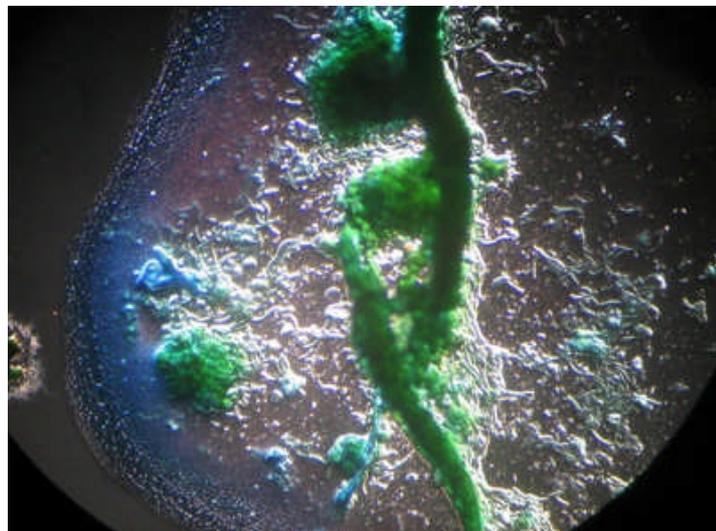


Figure 27 : Les cyanobactéries (cyanophycées)

➤ Les microalgues vertes (spirogyre)

Les spirogyres sont formées de filaments coloniaux désordonnés et ne possèdent qu'un ou deux chloroplastes rubanés en forme de spirale (d'où le nom *Spirogyre*). Les cellules cylindriques, disposées en files, sont pourvues d'une paroi cellulosique transparente externe leur assurant une certaine rigidité. Adhérent à cette paroi, du côté interne, se trouve une mince membrane cytoplasmique, tout aussi transparente et invisible aux faibles grossissements des photos. Près de cette membrane, dans le cytoplasme, se situe le chloroplaste (ou les chloroplastes selon les espèces). Leur chlorophylle, exposée à la lumière, permet la photosynthèse ; les spirogyres accumulent ainsi de l'amidon stocké autour paranoïdes. Les spirogyres fournissent un bon exemple de conjugaison : elles se reproduisent, de façon sexuée, en échangeant de l'ADN entre deux cellules. Certains filaments, dans un ensemble de filaments parallèles, jouent le rôle de femelle et d'autres celui de mâle. Des cellules contiguës de filaments adjacents développent des extensions tubulaires qui croissent l'une vers l'autre et fusionnent finalement pour former un tube continu entre les deux cellules. Dans le même temps, le contenu de chaque cellule a formé une sphère (Figures 28 et 29).



Figure 28 : Filament vu au microscope (x10) montrant 3 cellules contiguës

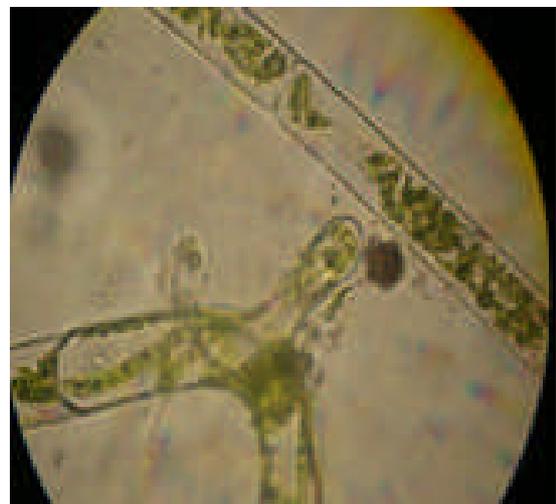


Figure 29 : Les spirogyres en reproduction

4. Les paramètres étudiés

Afin d'étudier l'influence de certains paramètres physico-chimiques sur la culture de microalgues, nous avons sélectionné quelques paramètres qui semblent faciles à contrôler. Nous avons ainsi choisi les paramètres suivants :

- L'influence de la lumière sur la croissance des microalgues
- L'influence du temps d'exposition
- L'influence de l'agitation
- L'influence de l'ajout des nutriments sur la croissance des microalgues
- La température

5. Technique d'analyse des microalgues : la microscopie

Le microscope binoculaire de type Zeiss a été utilisé pour analyser les microalgues issues du milieu de culture. Les parties essentielles du microscope sont représentées sur la figure 30.

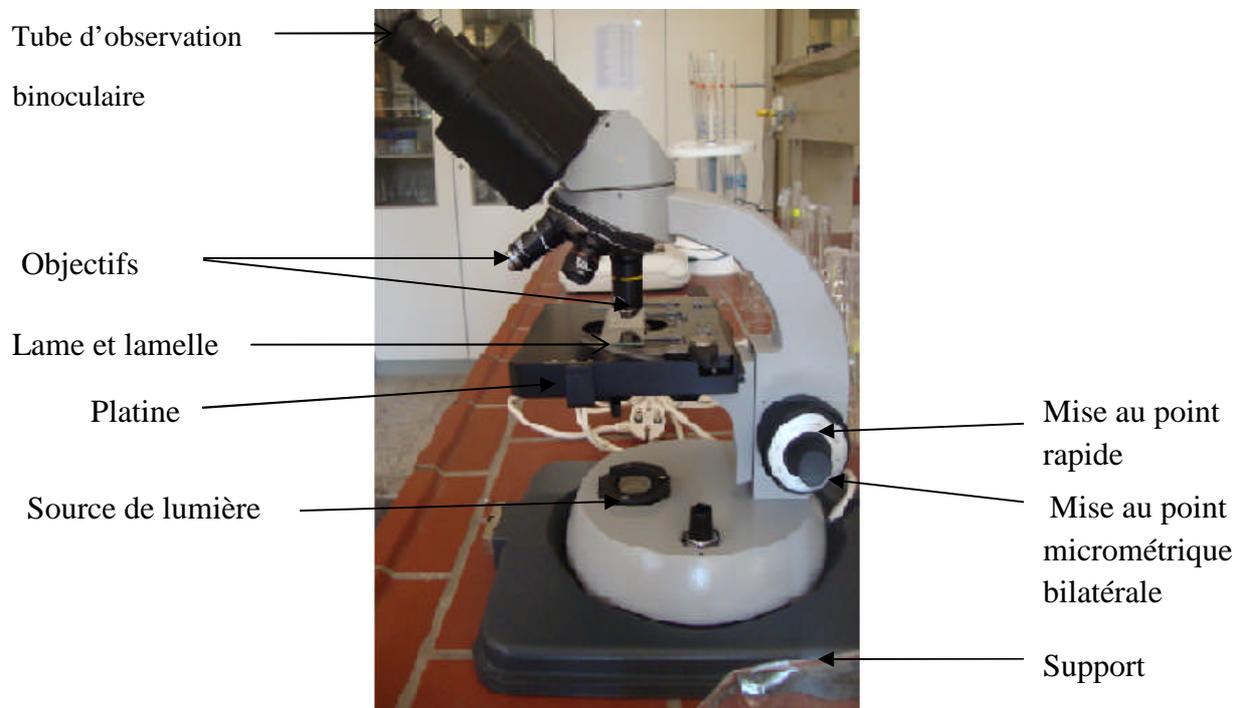


Figure 30 : Le microscope binoculaire de type Zeiss

Démarche à suivre pour effectuer une observation à travers le microscope

Une fois que tous les échantillons sont prêts à être observés à travers le microscope, il faudra les poser sur un verre transparent (lame) et les couvrir avec un autre verre transparent plus fin (lamelle). Les échantillons sont posés dans le microscope pour effectuer l'observation. Pour obtenir une image désirée des échantillons il faut combiner les objectifs avec l'oculaire. Ensuite, pour focaliser les échantillons il faut le faire avec la vis micrométrique pour affiner la mise au point et obtenir ainsi une vision parfaite des échantillons. Quant la mise au point des échantillons est parfaitement réalisée, les objectifs se changeront jusqu'à trouver le grossissement nécessaire. Pour obtenir une observation parfaite de la source de lumière des microscopes, il est possible de la régler avec le diaphragme jusqu'à obtenir une illumination adéquate à l'observation.

6. Démarche expérimentale : la numération cellulaire

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre. La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale.

Dans l'étude de la croissance des cyanobactéries, un prélèvement de 3 gouttes est pris dans le photobioréacteur à l'aide d'une pipette 1 ml
Le comptage est réalisé sous microscope pour chacun des échantillons prélevé tout les deux heures d'intervalle. Il est à noter que 1ml est équivalent à 35 gouttes d'eau donc 3 gouttes sont équivalentes à 0,09 ml.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude de la croissance des microalgues a été réalisée sur deux types : les microalgues bleu-vert (cyanophycée) et les microalgues vertes (zygnéma, spirogyra). L'influence des paramètres physico-chimiques ci-dessous sur la culture des microalgues choisies a été étudiée.

- L'influence de la lumière sur la croissance des microalgues
- L'influence du temps d'exposition
- L'influence de l'agitation
- L'influence de l'ajout des nutriments sur la croissance des microalgues
- La température

1. Provenance des microalgues

Dans ce travail, des échantillons de microalgues issues du barrage hydraulique de Tichy-Haf sis dans la commune de Bouhamza dans la wilaya de Béjaïa Algérie ont été cultivés dans le photobioréacteur.

Les échantillons de départ prélevés du barrage ont été introduit dans une boite de pétri (Figure 31). Nous avons pu isoler et purifier deux types de microalgues : les microalgues bleu-vert (cyanophycée) et les microalgues vertes (zygnéma, spirogyre) (Figure 32).



Figure 31 : Microalgues avant purification

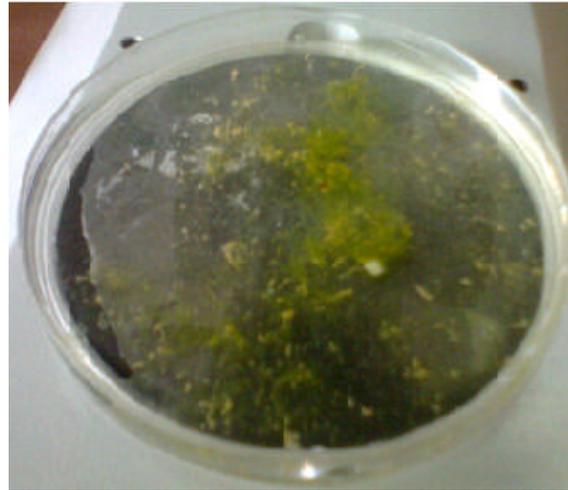


Figure 32 : Microalgues après purification

2. Préparation du photobioréacteur

Avant toute manipulation, le réacteur est désinfecté puis nettoyé avec de l'eau de javel et de l'eau distillée. On introduit quelques microalgues dans le réacteur contenant 0,5 à 1,5 litre d'eau distillé. On ouvre le robinet de la bouteille d'oxygène et on allume la lampe. L'ensemble de l'installation est isolé de la lumière du jour par un couvercle.

Dans l'étude de la croissance des cyanobactéries, un prélèvement de 3 gouttes est pris dans le photobioréacteur à l'aide d'une pipette de 1 ml. Le comptage est réalisé sous microscope pour chacun des échantillons prélevé tout les deux heures d'intervalle. Il est à noter que 1 ml est équivalent à 35 gouttes d'eau donc 3 gouttes sont équivalentes à 0,09 ml.

3. Etude de la croissance des microalgues

3. 1. Les microalgues vertes (zygnéma, spirogyre)

3. 1. 1. Influence de la lumière sur la croissance des microalgues

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'influence de la lumière sur le développement des microalgues.

Mode opératoire

- Dans le photobioréacteur (PBR) contenant 500 ml d'eau distillée ($T = 21\text{ °C}$, $\text{pH} = 7$), on introduit une masse donnée m_0 de l'échantillon étudié.
- L'agitation est assurée par injection d'oxygène dans le PBR pendant une durée de 5 heures. La lampe n'étant pas allumée (obscurité).
- L'ensemble de l'installation étant évidemment isolé de la lumière du jour.
- A la fin de l'expérience, les microalgues sont récupérées par filtration (Figures 33 et 34) et pesées à l'aide d'une balance électrique (Figure 35).



Figure 33 : Filtration



Figure 34 : Microalgues récupérées



Figure 35 : Pesées des microalgues

Au bout de 5 heures d'agitation et sans exposition à la lumière, pour une masse de 0,46 g introduite initialement dans le PBR, nous ne recueillant que 0,30 g.

La masse des microalgues a nettement diminué avec le temps. Ce résultat confirme la nécessité d'exposition des microalgues à la lumière.

3. 1. 2. Influence du temps d'exposition à la lumière

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à la variation de la masse des microalgues en fonction de leur temps d'exposition à la lumière (lampe).

Deux expériences ont été réalisées avec deux masses de microalgues différentes servant à la culture de celles-ci selon le mode opératoire décrit précédemment.

Les microalgues cultivées au bout de 5 heures sont récupérées par filtration et pesées à l'aide d'une balance électrique.

Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le tableau 3 et représentés graphiquement (Figure 36).

Tableau 3 : Evolution de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps

Temps d'exposition (heure)	0	5
Expérience 1 : Masse des microalgues (g)	0,37	0,94
Expérience 2 : Masse des microalgues (g)	0,68	0,91

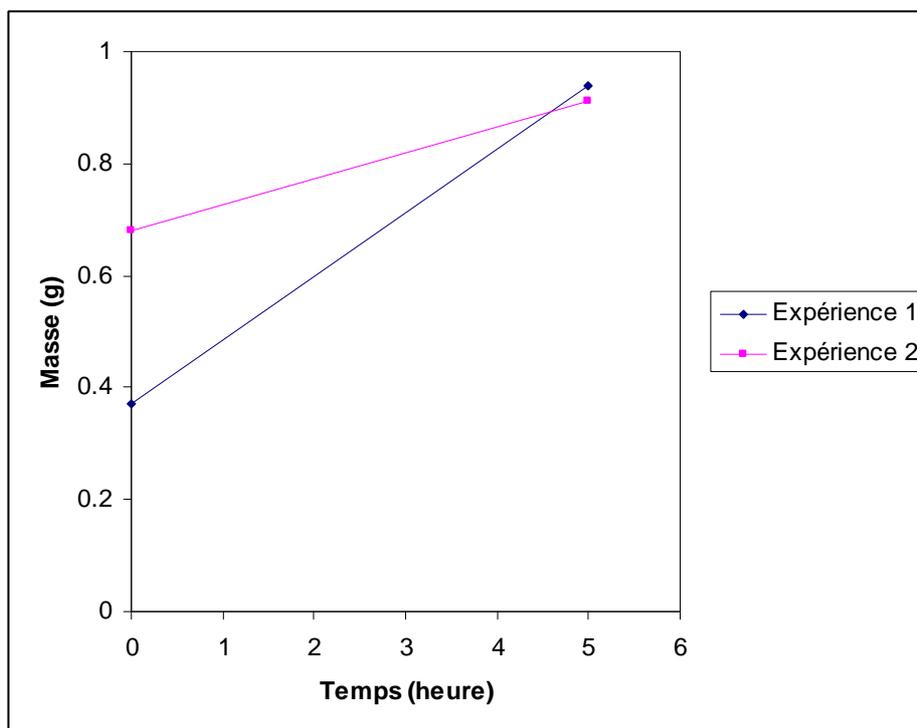


Figure 36 : Evolution de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps

Ces résultats montrent une augmentation de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps d'exposition à la lumière. La cinétique de croissance semble plus rapide dans le cas où la masse initiale de la culture est faible. Ceci peut être liée à la faible quantité de gaz carbonique disponible dans l'eau.

3. 1. 3. Influence de l'agitation sur la croissance des microalgues

Dans cette partie, on cultive une masse $m_0 = 0,46$ g de spirogyre dans le PBR, rempli de 500 ml d'eau distillée ($T = 23$ °C, $\text{pH} = 7,5$), en présence de la lumière.

Deux expériences ont été réalisées avec cette même masse : l'une avec agitation et l'autre sans agitation suivant le même mode opératoire décrit précédemment.

Les microalgues cultivées au bout de 5 heures sont récupérées par filtration et pesées à l'aide d'une balance électrique.

Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le tableau 4 et représentés graphiquement (Figure 37).

Tableau 4 : Influence de l'agitation sur la culture des microalgues.

Temps (heure)	0	5
Masse de l'échantillon avec agitation (g)	0,46	0,54
Masse de l'échantillon sans agitation (g)	0,46	0,49

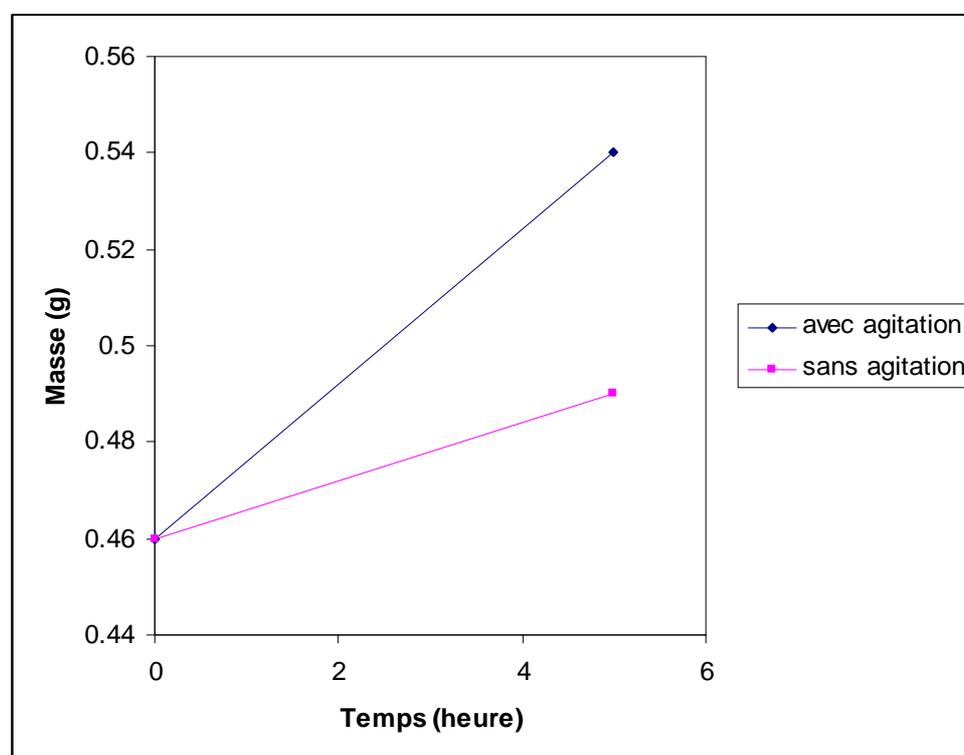


Figure 37 : Influence de l'agitation sur la culture des microalgues.

Ces résultats montrent l'importance de l'agitation sur la culture des microalgues. En effet, on remarque que l'agitation permet d'exposer la majorité des microalgues à la lumière conduisant ainsi à une cinétique de culture plus rapide.

3. 1. 4. Influence de l'ajout des nutriments sur la croissance des microalgues

L'influence des paramètres étudiés précédemment sur l'évolution des cultures des microalgues suppose que nous avons assez de nutriments, en particulier du CO₂, dans les eaux servant à la culture de ces microalgues.

Dans cette partie nous nous proposons de préparer un milieu de culture dans lequel nous allons étudier l'évolution d'une quantité de microalgues pendant 5 jours.

Il existe de nombreuses "recettes" de milieux de culture, certaines sont adaptées à des micro-algues particulières ou à des conditions particulières (eau douce, eau de forage, etc...) mais les principaux milieux de cultures utilisés en aquaculture sont le Conway, le f/2 de Provasoli ou encore le milieu de Walnes. Les dilutions intermédiaires que l'on doit préparer dans ces recettes servent à faciliter les dosages.

Dans notre cas, le milieu de culture adapté est celui de Bold car c'est le milieu qui est utilisé pour les algues vertes unicellulaires.

Dans cette expérience, nous avons tenté d'étudier l'influence de l'ajout des nutriments sur la croissance des spirogyres. Nous avons préparé dans un premier temps un milieu de culture, appelé milieu de Bold. Le milieu de Bold est d'usage général pour algues vertes unicellulaires.

Première étape : préparation de 10 solutions stocks (tableau 5)

Tableau 5 : Solutions stocks (milieu de Bold) [43].

N° de la solution	Produit	Masse (g)	Mode préparation
1	NaNO ₃	25	masses à dissoudre dans un litre d'eau distillée
2	CaCl ₂ , 2H ₂ O	2,5	
3	K ₂ HPO ₄	7,5	
4	KH ₂ PO ₄	17,5	
5	MgSO ₄ , 7H ₂ O	7,5	
6	NaCl	2,5	
7	EDTA	50	masses à dissoudre dans un litre d'eau distillée
	KOH	31	
8	FeSO ₄ , 7H ₂ O	4,98	masse à dissoudre dans un litre d'eau acidifiée (1 ml d'acide sulfurique et 999 ml d'eau distillée)
9	H ₃ BO ₃	11,42	masse à dissoudre dans un litre d'eau distillée
10	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,82	masses à dissoudre dans un litre d'eau acidifiée
	MnCl ₂ , 4 H ₂ O	1,44	
	MoO ₃	0,71	
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	1,57	
	Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	0,49	

Deuxième étape : préparation du milieu de culture

Pour préparer 500 ml de milieu de culture à partir des 10 solutions stocks préparées à l'avance, mélanger 5 ml de chacune des solutions 1 à 6, 0,5 ml de chacune des solutions 7 à 10 et compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.

Dans cette expérience, on cultive une masse $m_0 = 0,46$ g de spirogyre, en présence de la lumière, dans le PBR, rempli de 500 ml d'une solution de fertilisant (milieu de Bold 1967), préparée préalablement selon la méthode décrite précédemment ($T = 23$ °C, $pH = 7,5$).

Au bout de 5 jours d'agitation, pour une masse de 0,46 g introduite initialement dans le PBR et exposée à la lumière (lampe), nous ne recueillant que 0,29 g.

La masse des microalgues a nettement diminué avec le temps. L'analyse des microalgues au microscope montre que les spirogyres ont perdu leur couleur verte initiale (Figure 38). Elles sont devenues blanches (morte) (Figure 39). L'apport en nutriments semble très faible par rapport à la durée de culture assez longue (5 jours) et peut être n'est pas favorable pour cette espèce (spirogyre)

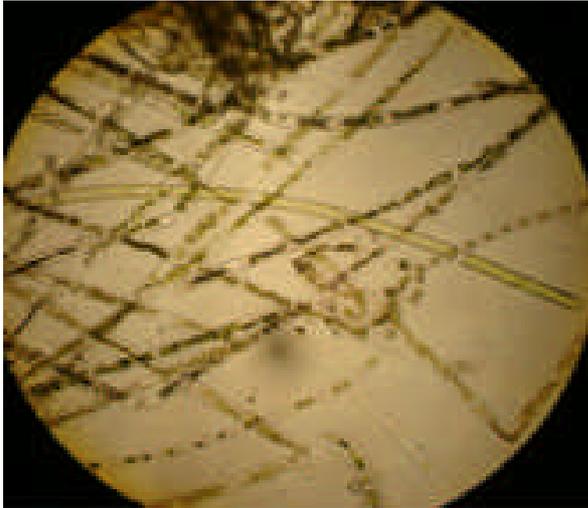


Figure 38 : Les spirogyres vertes

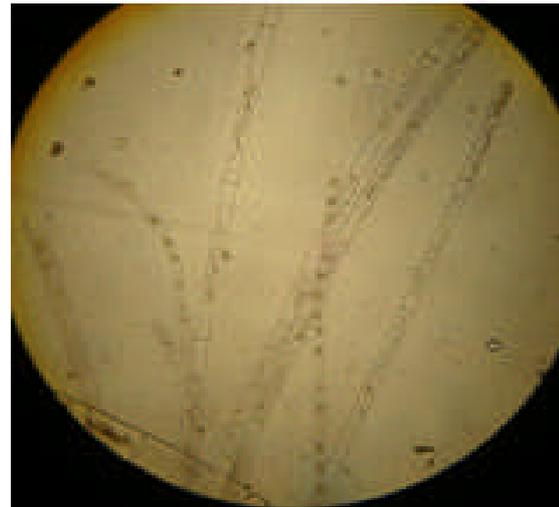


Figure 39 : Les spirogyres blanches

3. 2. Les microalgues bleu-vert (cyanophycée)

Dans l'étude de la croissance des cyanobactéries, on cultive une masse $m_0 = 0,46$ g de cyanophycée dans le PBR, rempli de 500 ml d'eau distillée (pH = 7,5), en présence de la lumière.

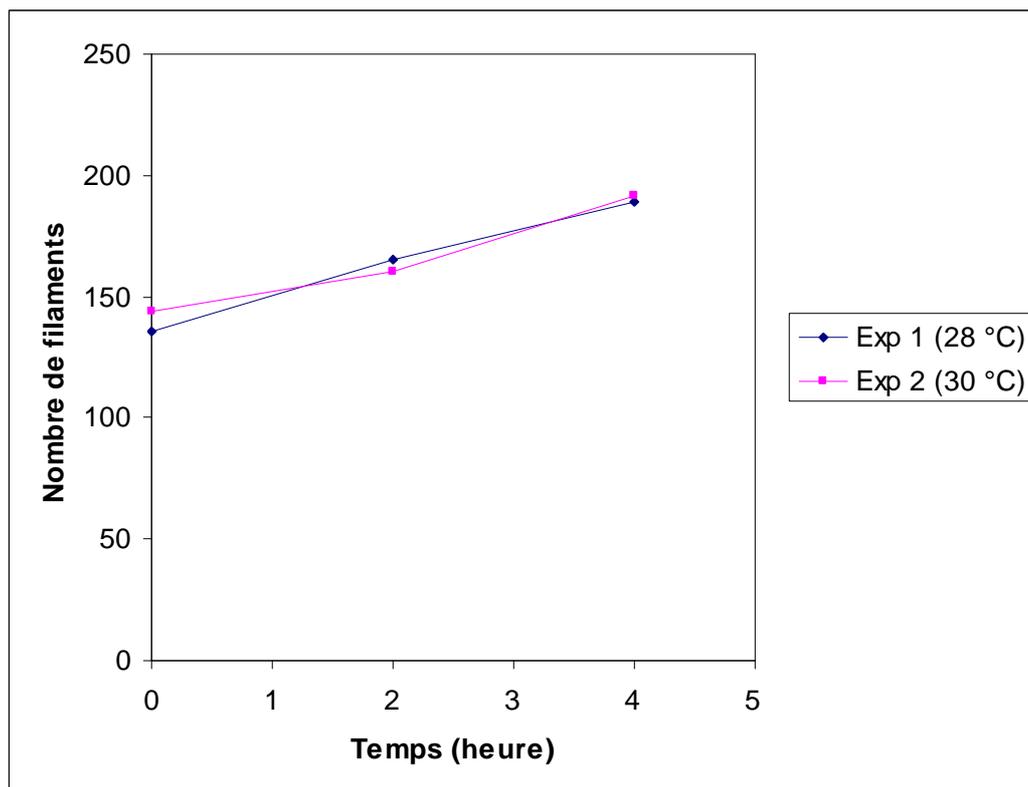
Deux expériences ont été réalisées avec cette même masse : l'une à une température de 28 °C et l'autre à une température de 30 °C. L'agitation est assurée par injection d'oxygène dans le PBR pendant une durée de 5 heures.

Un prélèvement de 3 gouttes est pris dans le photobioréacteur à l'aide d'une pipette de 1 ml. Le comptage est réalisé sous microscope pour chacun des échantillons prélevé tout les deux heures.

Les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le tableau 6 et représentés graphiquement (Figure 40).

Tableau 6 : Influence de la température sur la culture des microalgues.

	T (°C)	Temps (heure)	Prélèvement	Nombre des filaments / 3 gouttes
Expérience 1	28	0	1	136
		2	2	165
		4	3	189
Expérience 2	30	0	1	144
		2	2	160
		4	3	192

**Figure 40 :** Influence de la température sur la culture des microalgues.

Ces résultats montrent que la température expérimentale de 28 °C semble favorable au développement des cyanobactéries.

CONCLUSION

CONCLUSION

Ce travail a pour objectif la conception d'un photobioréacteur pour la culture des microalgues issues du barrage hydraulique de Tichy-Haf (Bouhamza - Béjaïa).

Cette étude comporte la mise en place d'une installation complète pour la culture des cyanophycées et des spirogyres. L'ensemble des expériences réalisées sont réparties en deux groupes, celles supposant que nous avons assez de nutriments dans les eaux servant à la culture de ces microalgues et celles utilisant une préparation de nutriments.

L'influence des différents paramètres physico-chimiques (temps d'exposition à la lumière, agitation, température...) sur la culture des microalgues a été ainsi étudiée dans ce mémoire.

Nous avons pu constater au cours des différentes expériences menées que les conditions de culture ont effectivement une influence sur la croissance des microalgues.

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus montrent une augmentation de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps d'exposition à la lumière. Par ailleurs, l'agitation permet d'exposer la majorité des microalgues à la lumière conduisant ainsi à une cinétique de culture plus rapide. La température de 28 °C semble favorable au développement des cyanobactéries. En revanche, l'étude de la croissance des spirogyres en présence d'une solution de fertilisant (milieu de Bold) n'a pas donné des résultats satisfaisants.

La productivité peut être obtenus en améliorant les conditions de fonctionnement (utilisation de la commande).

En termes de perspectives, il serait intéressant de réaliser un contrôle continu du pH et de la température car ces deux paramètres doivent être maintenus constants afin d'optimiser la culture de ces microalgues.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Erell Olivo., Thèse de Doctorat « Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en écloséries aquacoles », Université de Nantes, France (2007).
- [2] HOSNI Takache, Thèse de Doctorat « Caractérisation, modélisation de la croissance photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur et mise en évidence du couplage à l'hydrodynamique », Université de Nantes, France (2010).
- [3] Sanchez Miron, A., Gomez, A. C., Camacho, F. G., Molina Grima, E. and Chisti, Y. « Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae » *Journal of Biotechnology* **70** (1-3), 249-270, (1999).
- [4] Tredici, M. R. «Mass production of microalgae: Photobioreactors». *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A., Blackwell. 178-214 (2004).
- [5] Tredici, M. R. «Bioreactors, photo. » *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Flickinger, M. C. and Drew, S. W. New York, USA, John Wiley & Sons. 395-419 (1999).
- [6] Acien Fernandez, F. G., Sevilla, J. M. F., Perez, J. A. S., Grima, E. M. and Chisti, Y. « Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. » *Chemical Engineering Science* **56** (8). 2721-2732 (2001).
- [7] Gudin, C. and Chaumont, D. «Solar biotechnology study and developpment of tubular solar receptors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. » in: *Proceedings of the workshop and EC contractors's meeting*, Capri, Italy, Reidel Publ.Co., Dordecht (1983).
- [8] Richmond, A. «Micro algal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. » *Journal of Applied Phycology* **12** (3-5). 441-451. (2000).
- [9] Pulz, O. «Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. » *Applied Microbiology and Biotechnology* **57** (3). 287-293. (2001).
- [10] Tsygankov, A. A. «Laboratory Scale Photobioreactors. » *Applied Biochemistry And Microbiology* **37** (4). 333-341. (2001).

- [11] Tredici, M. R. and Zittelli, G. C. «Efficiency of sunlight utilization: Tubular *versus* flat photobioreactors. » *Biotechnology and Bioengineering* **57**. 187-197. (1998).
- [12] Montecino, V., Molina, X., Martinez, G., Olmedo, M. I., Retamal, L., Hannach, G. and Orellana, M. V. «Ecophysiological strategies in response to UV-B radiation stress in cultures of temperate microalgae isolated from the Pacific coast of South America. » *Revista Chilena De Historia Natural* **74** (2). 293-311. (2001).
- [13] grobbelaar, J. U. and Kurano, N. "Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation." *Journal of Applied Phycology* **15** (2-3). 121-126. (2003).
- [14] Sanchez Miron, A., Camacho, F. G., Gomez, A. C., Molina Grima, E. and Chisti, Y. "Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture." *AIChE Journal* **46** (9). 1872-1887. (2000).
- [15] Grobbelaar, J. U. and Kurano, N. «Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. » *Journal of Applied Phycology* **15** (2-3). 121-126. (2003).
- [16] Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I. and Miyachi, S. "Ultrahigh cell density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor." *Applied Microbiology and Biotechnology* **49** (6). 655 - 662. (1998b).
- [17] Zittelli, G. C., Pastorelli, R. and Tredici, M. R. "A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis sp* under artificial illumination." *Journal of Applied Phycology* **12** (3-5). 521-526. (2000).
- [18] Jaouen, P., Vandanjon, L. and Quemeneur, F. «The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps. » *Bioresource Technology* **68** (2). 149-154. (1999).
- [19] Chisti, Y. and Moo-Young, M. «Bioreactors Encyclopedia of Physical Science and Technology» Meyers, R. A. New York, USA, Academic Press. 247-271. (2001).
- [20] Pulz, O. and Scheibenbogen, K. «Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. » *Advances in Biochemical engineering* **59**. 123-152. (1998).
- [21] Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Sanchez Perez, J. A., Acien Fernandez, F. G. and Fernandez Sevilla, J. M. «Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. » *Enzyme and Microbial Technology* **21** (5). 375-381 (1997a).
- [22] Pulz, O. and Gross, W. "Valuable products from biotechnology of microalgae." *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**. 635–648. (2004).

- [23] Eriksen, N. T., Poulsen, B. R. and Iversen, J. J. L. "Dual sparging laboratory scale photobioreactor for continuous production of microalgae." *Journal of Applied Phycology* **10** (4). 377-382. (1998).
- [24] Lecurieux-Belfond Laura, Dimensionnement d'une raffinerie de biodiesel, Production à partir de *Dunaliella salina* sur le site des salins de Giraud, Rapport technique (03/11/2009).
- [25] Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L. (1996).
- [26] Fogg, G.E. *The metabolism of algae*. London, Methuen, 149 p. (Collection Methuen's monographs on biological subjects). (1953).
- [27] Wikipédia (2009a). Cyanobacteria. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria>
- [28] Lechevalier, Hubert A. *Volume II Fungi, Algae, Protozoa, and Viruses*. 2ème édition, Floride, Laskin, Allen I., 874 p., CRC handbook of microbiology. (1977).
- [29] Wikipédia (2009b). Bacillariophyta. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Bacillariophyta>
- [30] Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14:557–77 (2010).
- [31] Scragg A.H. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*. (2002). 23(1):67–73.
- [32] Netravali A.N., Chabba S. Composites get greener. *Materials Today*. (2003). 6(4):22–29.
- [33] Klass L.D. Biomass for Renewable Energy, Fuels and Chemicals. *Academic Press, New York*. (1998). 1- 2
- [34] Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (2010). 14(1):217–232.
- [35] Pulz O and W .Gross. Valuable product from biotechnology of Microalgae. *Appl. Microbiol Biotechnol*. Vol 65 pp.635-648. (2004).
- [36] Dufossé , L. et al . Microorganisms and microalgae as source of pigments for food use : a scientific oddity or an industrial reality ? *Trends in Food Science & Technology*, (sous press). (2005).
- [37] CHOUINARD, Y. Utilisations des acides gras oméga 3 en production laitière et bovine, présentation dans le cadre de la rencontre technologique « Additifs et suppléments alimentaire en production animale : innovations et tendances ». Rencontre technologique organisée par le CQVB, 7 juin 2005, Saint-Hyacinthe. (2005).
- [38] Yang J., Xu M., Zhang X., Hu Q., Sommerfeld M., Chen Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*. 102:159–65. (2011).

- [39] Levine R.B., Pinnarat T., Savage P.E. Biodiesel production from wet algal biomass through in situ lipid hydrolysis and supercritical transesterification. *Energy Fuels*. 24:5235–43.(2010).
- [40] Satyanarayana K.G., Mariano A.B., Vargas J.V.C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*.. 35(4):291-311.(2011).
- [41] Aslan S., Kapdan I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*.. 28(1): 64–70.(2006).
- [42] Doucha J., Straka F., Livansky K. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella sp.*) in an outdoor open thinlayer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*.. 17:403–412.(2005).
- [43] <http://www.didier-pol.net/3ftalgue.htm>.

ANNEXE

La numération cellulaire

I - **Principe** : La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération).

II - Technique de numération cellulaire

1 - **Dilution préalable** Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, lorsque la suspension est trop concentrée (grand nombre de cellules par unité de volume), il est difficile de compter les cellules.

2 - Utilisation de la cellule de numération

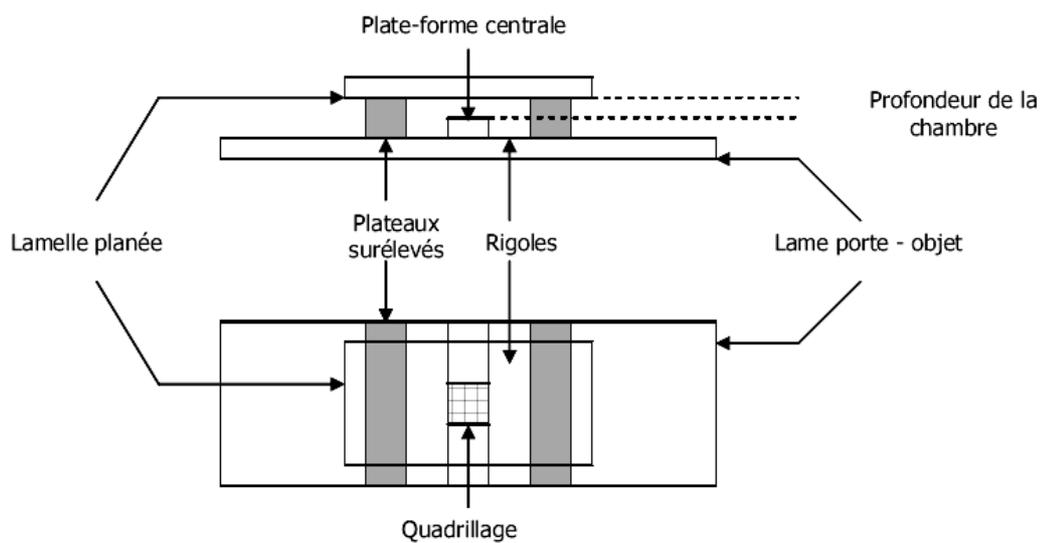
a - Présentation des cellules de numération

Il existe deux grands types principaux de cellules de numération :

-Cellule de Thoma.

-Cellule de Malassez (la plus courante).

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée *une chambre de comptage de volume connu*. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage :

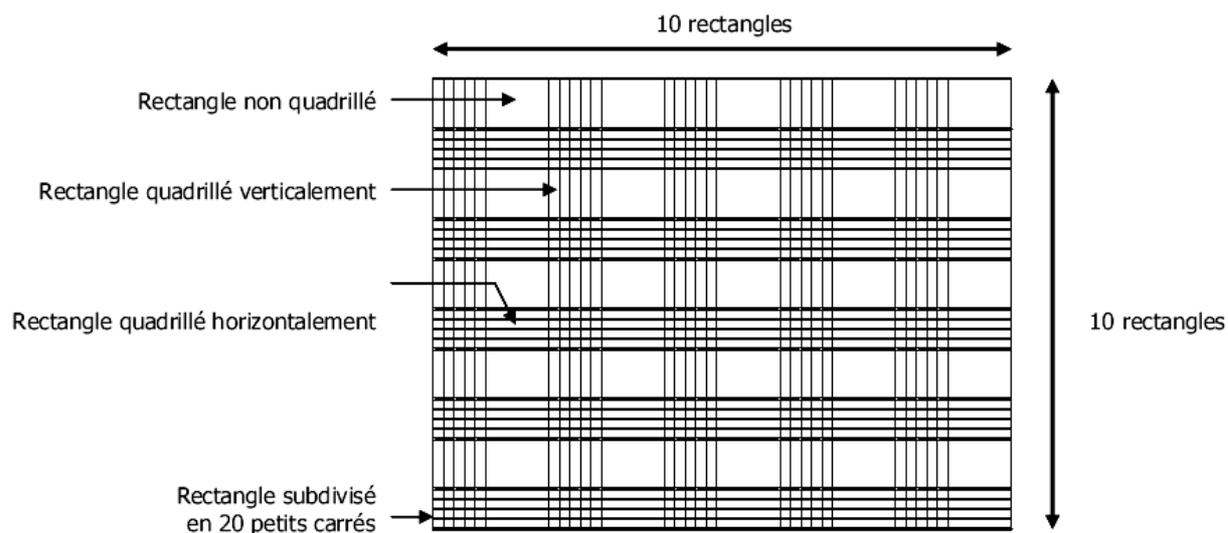


Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame.
- la profondeur de la chambre.

b-La cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

→ le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$

→ chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

c -Remplissage de la cellule de numération

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

→ Le remplissage doit être fait *en une seule fois, sans bulles d'air*, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

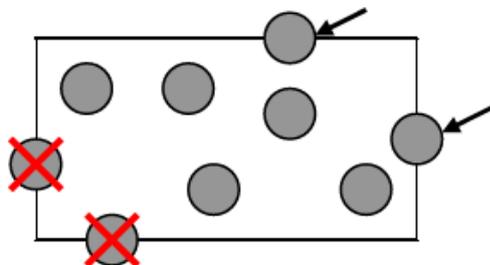
3-Numération

- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).

- Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).

- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



**Numération sur le
rectangle = 7 cellules**

4-Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soient : n : nombre de cellules comptées.

V : volume de comptage.

f : facteur de dilution.

N : nombre de cellules par litres.

Si on a n cellules dans V litres, alors on a N cellules dans un litre :

Soit : $N = n / V$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Résumé

La valorisation des microalgues est en plein essor depuis quelques années. En effet, ces micro-organismes trouvent des applications dans divers domaines: production de biomasse, nutrition humaine directe ou indirecte, production de molécules spécifiques (chimie verte), production d'énergie (lipides, hydrogène) et applications environnementales (dépollution d'effluents). La spécificité des microalgues provient de leur capacité à assimiler les sources de carbone et à faire leur propre matière organique grâce au processus de la photosynthèse.

La culture de ces microorganismes dans des systèmes clos appelés photobioréacteurs, permet de maîtriser et d'optimiser la productivité contrairement aux systèmes ouverts.

Dans ce travail on a conçu un photobioréacteur plat en plexiglas au niveau de Hall de Technologie (Université A-Mira Bejaia) pour la culture des microalgues issues du barrage hydraulique de Tichy-Haf (Bouhamza - Béjaïa). Ce photobioréacteur nous a permis d'étudier l'influence de certains paramètres opératoires (temps d'exposition à la lumière, agitation, température...) sur la culture des microalgues vertes (spirogyre) et les microalgues bleues-vertes (cyanophycées).

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus montrent une augmentation de la masse de la culture des microalgues en fonction du temps d'exposition à la lumière. Par ailleurs, l'agitation permet d'exposer la majorité des microalgues à la lumière conduisant ainsi à une cinétique de culture plus rapide. La température de 28°C semble favorable au développement des cyanobactéries.

Mots clés : photobioréacteurs, culture de microalgues, cyanobactéries, spirogyre, numération cellulaire