

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*وزارة التعليم العالي والبحث العلمي*



*Ministère de l'Enseignement Supérieure et la Recherche Scientifique*



*جامعة بلحاج بوشعيب – عين تموشنت*

*Université BelhadjeBouchaib –Ain Témouchent*

*كلية علوم الطبيعة والتكنولوجيا*

*Faculté des sciences de la Nature et de la Vie*

*Département Agro-Alimentaire*

*Filière Science Agronomiques*



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

*En vue de l'obtention du diplôme de Master en protection des végétaux*

**Thème**

---

***Optimisation des méthodes d'extraction et caractérisation de la phycocyanine extraite à partir de la spiruline Algérienne et sa concervation***

---

*Présenté par :*

- **SEKLAL ATIKA**
- **BEN AISSA RAHAL SOUAD**



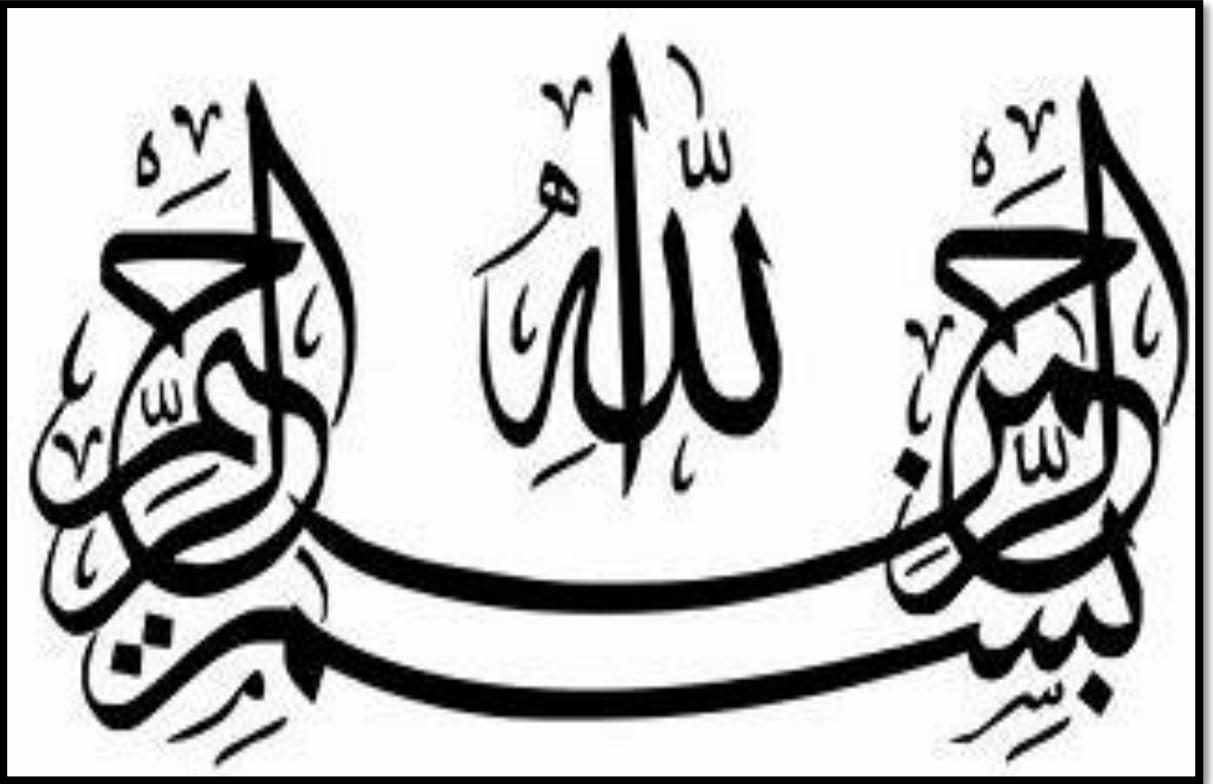
DEVANT DE JURY :

Président :Mme..BELHACINI.FDr.Université Ain Temouchent

Encadreur :MmeLAFRI.IDr.Université Blida

Examineur :Mme KERZABI.R M.R. Centre de recherche en Agro-Pastoralisme.

***Date De SoutenanceLe , 18. Juin. 2023***



# DEDICACES

*Jedédiele fruit de mon travail :*

*A mes chères parents :qui on allumés la première route pour cette réussite, Maman la source de mes joies,etPapa le secret de ma force, je vous souhaite à tout les deux une bonne santé.*

*A mes chers sœurs et freres .*

*A ma petite princesse "Emie".*

*Atout mes amies :Roumaissa, Dounia, Hadil, Djou.*

*A tous mes proches, pour leur soutien, et leur encouragements.*

*A tous ceux qui me connaissent .*

*Enfin, j'espère que cette mémoire sera une bougie qui eclaire la route de tous ceux qui ont sacrifié leur vie dans la recherche scientifique .*

*ATKA*

# DEDICACES

*Pour mes merveilleux parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé, qui ont fait de leur mieux pour me donner les meilleures chances dans la vie.*

*Vous êtes mes héros et mes inspirations, et je vous garde dans mon cœur à tout jamais. Et je vous serai éternellement reconnaissant à tous les deux.*

*à mon cher frère Mounir et mes chères sœurs Amina et Soujoud.*

*À tous les membres de ma famille, pour leur soutien constant et leur encouragement à poursuivre mes rêves.*

*À mes amis qui sont toujours à mes côtés .*

*À tous les enseignants qui ont partagé leur savoir avec moi, pour leur patience, leur dévouement et leur passion pour l'éducation.*

*À tous mes camarades de classe, pour les moments de compétition amicale et les moments de partage qui ont enrichi cette expérience universitaire.*

*À tous mes proches, pour leur soutien, leur patience et leurs encouragements.*

*À moi-même, pour avoir travaillé dur, persévéré et atteint cet objectif .*

*souad*

## REMARCIEMENTS

*Nos remerciements vont tout d'abord à **ALLAH** le tout puissant pour nous avoir donné la force et la capacité pour continuer à réaliser notre travail.*

*Nos remerciements à notre encadreur Dr. Lafri. Imène, pour son aide précieuse et ces conseils judicieux.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.*

*Tous nos remerciements à le directeur du laboratoire Mr. Hammou d'avoir accepté de notre demande de stage dirigé par Dr. Bouchikhe. Amina pour ces conseils précieux au cours de tout le travail.*

*Nos remerciements à tous les professeurs qui nous ont aidés à réaliser nos recherches*

*Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# SOMMAIRE

Dédicace	
Remerciment	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction .....	02

## Partie 1 :Synthèse Bibliographique

### Chapitre 1 : Généralités sur la spiruline

1. La spiruline .....	05
1.1.Définition et principales caractéristiques .....	05
1.2.Histoire des spirulines.....	05
1.3.Morphologie .....	06
1.4.Taxonomie.....	07
1.5.Reproduction.....	08
2. la culture de la spiruline .....	09
2.1. Conditions physiques et chimiques de croissance.....	09
3. Etablissement Et Installation D'une Ferme De Culture.....	09
3.1. Choix du terrain.....	09
3.2. Influence du climat.....	10
a) Température.....	10
b) Pluviométrie.....	10
c) Saisonnalité.....	10
4. Composition biochimique et les valeurs nutritives de la spiruline....	11
1. Protéines.....	11
2. Lipides .....	13
3. Glucides .....	14
4. NucléiquesAcides.....	14
5. Vitamines .....	14
6. Minéraux et oligoéléments .....	16

7. Enzymes.....	17
8. Pigments.....	17
9. Les caroténoïdes.....	17
10. La chlorophylle.....	17
5. Applications de la spiruline.....	19
5.1. Domaine Agro alimentaire .....	19
5.1.1. Adjuvants de régime amaigrissant .....	19
5.1.2. Utilisation de la <i>Spiruline</i> pour usage animal .....	20
5.2. Domaine de l'industrie cosmétique .....	20
5.3. Domaine de la santé .....	21

## **Chapitre 2 : La phycocyanine**

1. Les principaux constituants fonctionnels de la spiruline .....	24
2. Définition de la phycocyanine .....	25
3. Les méthodes d'extraction de phycocyanine .....	26
4. Les utilisations de la phycocyanine .....	26
5. Propriétés physico-chimiques de la Phycocyanine .....	27

## **Partie 2 : Etude Expérimentale**

### **Chapitre 1 :Materiel Et Methodes**

1. Extraction de phycocyanine à partir de la spiruline provenant de la station de Bnisafe au sein de l'école de la pêche.....	31
2. Matériels et méthodes.....	31
3. Caractérisation de la phycocyanine extraite par la meilleure méthode d'extraction en termes de rendement.....	35

### **Chapitre 2 : Résultats et Interpritation**

1. Extraction de phycocyanine.....	38
2. Extraction par macération avec le glycerol .....	39
3. Caractérisation de phycocyanine .....	40
4. Appendice A.....	41
5. Appendice B.....	48
6. Appendice C.....	49
<b>CONCLUSION</b> .....	50
<b>Références Bibliographique</b> .....	52

## Liste des figures

Figure 01 : La <i>Spiruline</i> (Jourdan,2012).....	05
Figure 02 : Différentes formes prises par la <i>Spiruline</i> .....	06
Figure 03 : Cycle biologique de la spiruline.....	09
Figure 04 :Compositionbiochimique et valeurs nutritifs de la <i>Spiruline</i> .....	11
Figure05 : La culture d'une souche mère de la <i>Spiruline</i> .....	18
Figure 06: Représentation schématique d'un phycobilisome classique.....	24
Figure 07 : Formule de la phycocyanine.....	26
Figure 08 : Matérielvégétale et les déffirents réactives biochimiques .....	31
Figure 09:Extrationpar l'eau .....	32
Figure 10 : Extarationpar congélation .....	33
Figure 11 : extraction par glycerol.....	34
Figure 12 : Conservation de phycocyanine.....	36
Figure 13:Concentrations et pourcentages de pureté de la phycocyanine de la souche de spiruline.....	38
Figure 14 : Extraction par congélation .....	39
Figure 15 : Extraction par l'eau .....	39
Figure 16:Extrationpar macération avec le glycerol.....	40

# Liste des tableaux

Tableau 01 : les diverses appellations de la spiruline.....	07
Tableau 02 : classification de spiruline.....	08
Tableau 03 : Teneur moyenne et principales fonctions des minéraux et des oligoéléments de la spiruline.....	12
Tableau 04 : Composition en acides gras de la spiruline.....	13
Tableau 05 : Teneur moyenne dans 10g de spiruline et les principales fonctions des vitamines hydrosolubles.....	15
Tableau 06 : Teneur moyenne et principales fonctions des minéraux et des oligoéléments de la spiruline .....	16
Tableau 07: Caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiées.....	25
Tableau 8 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline et en fonction du mode d'extraction.....	38
Tableau 9 : Les Caractérisation de phycocyanine.....	40

# Resumé

*Spiruline.platensis*, plus couramment appelée, est une cyanobactérie filamenteuse faisant partie des algues bleu-vert, grâce à la chlorophylle (vert) et la phycocyanine (bleu) contenue dans les phycobilisomes .

Nos travaux ont porté tout d'abord sur la caractérisation de la souche de *Spiruline* algérien (region de bnisaf). puis, nous avons évalué plusieurs méthodes d'extraction pour obtenir une bonne masse de la phycocyanine

Six méthodes d'extraction ont été testées sur la souche de *Spiruline* Algérienne considérées : pareau, congélation, solvant, sonification, séparation aqueuse à double phase et macération avec le glycérol a montré que l'extraction par séparation aqueuse à double phase a donné un bon concentration (1.8mg/ml).

La deuxième partie de nos travaux a porté ainsi sur une comparaison du rendement d'extraction de la souche de l'ouest tout en préservant d'une part, ses qualités intrinsèques, et d'autre part, de pouvoir déduire après, la méthode optimale en termes de rendement.

Enfin, notre étude nous a permis de comparons entre les méthodes d'extraction de phycocyanine à partir de la *Spiruline* produite dans l'ouest de l'Algérie en vue d'une optimisation.

**Mots clés** : *Spiruline*, méthode d'extraction, phycocyanine, caractérisation.

# ABSTRACT

*Spirulina.platensis*, more commonly called *Spirulina*, is a blue-green algae by the presence of chlorophyll (green) and phycocyanin (blue) contained in phycobilisomes.

Our work focused first of all on the characterisation of *Spirulina* strains in Algeria (region of Bouisaf). Then, we evaluated several methods of extraction to obtain a good mass of phycocyanin.

Six methods were tested on the *Spirulina* strains considered: by water, freezing, solvent, sonification, double phase aqueous separation and maceration with glycerol. It was shown that the extraction by double phase aqueous separation gave a good concentration (1.8 mg / ml).

The second part of our work focused on the comparison of the extraction yield of the western strain while preserving, on the one hand, its intrinsic qualities, and on the other hand, to be able to deduce afterwards, the optimal method in terms of yield.

Finally, our study allowed us to compare between the methods of extraction of phycocyanin from *Spirulina* produced in western Algeria with a view to optimization.

**Key words** : *Spirulina*, extraction method, phycocyanin, characterisation.

## ملخص

(سبيرولينا بلاتنسيس)، هي طحالب خضراء زرقاء، وذلك بفضل وجود الكلوروفيل (الأخضر) والفيكوسيانين (الأزرق) الواردة في *phycobilisomes*.

ركز عملنا أولاً على توصيف سلالة سبيرولينا القادمة من منطقة بني صاف (غرب الجزائر)، ثم قمنا بتقييم العديد من طرق الاستخراج بهدف الحصول على كمية جيدة من الفيكوسيانين .

تم اختبار ستة طرق استخراج على سلالة سبيرولينا: الماء ، التجميد ، المذيبات ، الصوتنة ، الفصل المائي ثنائي الطور ، النقع بالجليسول ، أظهر أن الاستخلاص بالفصل المائي ثنائي الطور أعطى تركيز جيد (1.8 مجم / مل).

ركز عملنا في المقام الثاني على مقارنة إنتاجية الاستخراج سلالة الغرب الجزائر من أجل حماية النوعية من جهة ؛ و من أجل معرفة طريقة الاستخراج المثلى من جهة أخرى.

أخيراً، سمحت لنا دراستنا بمقارنة طرق استخراج الفيكوسيانين من سبيرولينا المنتجة في غرب الجزائر بهدف التحسين.

الكلمات المفتاحية سبيرولينا ، طريقة الاستخراج ، فيكوسيانين ، التوصيف.

# **INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction Générale

Les microalgues sont des organismes unicellulaires photosynthétiques, à la base de la chaîne alimentaire en milieu aquatique. De par leur biodiversité de leur grande faculté d'adaptation, elles sont présentes sur l'ensemble des surfaces du globe des océans (soit  $\frac{2}{3}$  de la surface terrestre) aux glaces arctiques, en passant par les lacs hyper-salés, les neiges éternelles, les forêts humides et les murs de nos maisons.(**Derdouridjihane et al, 2022**).*Spirulina platensis* est une micro algue bleue verte, à mi chemin entre l'espèce végétale et l'espèce animale. Elle appartient à la famille des cyanobactéries comestibles, et est extrêmement riche en protéines (60 à 70% de poids sec), acides gras essentiels, vitamines et divers oligo-éléments(**Amed Ali Mlaraha 2011**). Les phycobiliprotéines, que l'on regroupe généralement sous le terme phycocyanines, phycoérythrine et allophycocyanines constituent des protéines pigmentaires photosynthétiques présentes chez certaines algues (algues rouges et cryptophycées) et chez toutes les cyanobactéries. Actuellement, ces pigments connaissent un regain d'intérêt. Cette tendance s'explique d'une part, par l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels eu égard aux impératifs sanitaires, écologiques et de protection de l'environnement et d'autre part, par l'évolution de la législation qui vise à favoriser les produits naturels par rapport à ceux de synthèse. La phycocyanine est une protéine colorée trouvée exclusivement chez les algues bleues. Elle n'est pas synthétisable par voie chimique. Elle est largement indiquée pour colorer en bleu certains produits alimentaires (glacés ou sucrés du genre boissons glacés, crèmes glacées, pâtes, gâteaux et biscuits). Trois gramme de *Spiruline* à plus d'activité antioxydante et antimicrobienne que cinq portions de légumes variés. Aussi, elle peut être introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires. Elle remplace avantageusement les pigments de synthèse considérés comme suspects(**Mehrez amel.2021**).

L'objet de nos travaux est d'une part, d'obtenir de grandes quantités de phycocyanine extraite de la *Spiruline* provenant de la station de Bnéf l'Ouest Algérien. Par conséquent, dans ce travail, nous nous référons à une comparaison des rendements d'extraction des souches occidentales afin de pouvoir en déduire des méthodes optimales en termes de rendement d'autre part tout en conservant leurs propriétés uniques d'une autre part. Cette étude se divise en deux parties principales: Le premier est la synthèse bibliographique est divisé en trois chapitres: Chapitre I est les Généralités sur la *spiruline* .

Chapitre II est la *phycocyanine*.

La deuxième partie (étude expérimentale) comprend deux chapitres : le première intitulé matériel et méthodes et le deuxième chapitre est consacrée aux résultats et interprétation puis les caractérisation de la phycocyanine et à la fin de ce travail ,nous terminent par une conclusion.

**PARTIE 01 :**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE 1 :**

# **GENERALITES SUR LA**

# **SPIRULINE**

## 1. La Spiruline :

### 1.1. Définition et principales caractéristiques

La *Spiruline* est une cyanobactérie filamenteuse, faisant partie des algues bleu-vert de type procaryote. Reconnaisable à la caractéristique morphologique du genre, cette micro-algue à caractère multicellulaire, se multiplie dès que la température de l'eau dépasse 30 °C. C'est un organisme symbiotique, autotrophe, qui se nourrit uniquement de minéraux contenus dans son milieu aqueux (Vonshak, 2002).



Figure 01 : La Spiruline (Jourdan, 2012).

### 1.2. Histoire de Spiruline

Les Aztèques peuple original du Mexique avaient de faibles ressources agraires, leur aliment principal étant le maïs, ce peuple a réussi de survivre pendant des siècles avant l'arrivée des colons espagnols. Farrar en 1966 s'est interrogé sur les moyens qui ont permis à cette population de survivre. Le poisson et les oiseaux du lac Texcoco fournissent un apport protéique pas assez suffisant pour combler leurs besoins. Il suggéra que la source complémentaire de protéines émanait d'une ressource qui provenait du lac, appelée Tecuitlatl (Paniagua-michel et al, 1993). De nombreux ouvrages de l'époque coloniale espagnole citaient déjà une certaine substance bleu-vert que les Aztèques utilisaient. Le tecuitlatl est une sorte de purée considérée par les colons comme minéral, une terre, un limon, consommée par les paysans après avoir été séchée et broyée. En réalité le tecuitlatl est un gâteau de spirulines, extrêmement riches en protéines, appartenant à l'espèce *Spirulina maxima*. (Paniagua-michel et al, 1993).

Cependant, 125 ans après la colonisation, le développement de l'agriculture et de l'élevage du bétail a relégué le tecuitlatl au rang du souvenir. Bien que déjà décrite par Wittrock et Nordstedt en 1844 (Fox R.D, 1999), l'algue ne fut vraiment redécouverte que quelques 450 ans après par le botaniste belge J. Léonard lors d'une expédition belgo-française basée au Tchad (1964 - 1965). Ce dernier a en effet constaté que les Kanembous du sud Kanem écumaient la surface des mares environnant le lac Tchad, mares riches en carbonates de sodium, à la recherche de

la fameuse algue abondante sur ce lac et récoltée sous forme d'une purée bleu-verte. Cette purée était ensuite utilisée dans la préparation de gâteaux vendus dans la région et appelé « dihé » (Girardin-Andéani, 2005). Un phycologue français Dangeard (1947) avait examiné ces gâteaux dès 1940 et avait constaté qu'ils étaient faits d'une algue bleue comestible. Compère constata, en étudiant des échantillons qu'il avait ramenés de son expédition, qu'en effet les gâteaux contenaient essentiellement l'algue bleue *Spirulina platensis*. Les chercheurs belges démontrèrent qu'ils sont extrêmement riches en protéines (Leonard, 1967).

Peu après, l'Institut Français du pétrole rendit compte de leurs travaux sur la *Spiruline*. Ces chercheurs ont isolé des souches de *Spirulines*, ils les ont purifiées, puis cultivées et en fin analysées. L'analyse a prouvé que les spirulines, qui en constituent la masse essentielle du « dihé », ont un contenu fabuleux : 50 à 60 % de protéines de bonne qualité alimentaire, 6 % de graisses et 15 à 20 % de sucres, ajouté à cela une multitude de vitamines et une série d'autres molécules rares, fort utiles à une nutrition saine et complète. La valeur alimentaire des *Spirulines* a été clairement établie dès 1976.

### 1.3. Morphologie :

La *Spiruline* est une micro-algue uni ou multicellulaire et filamentaire. C'est une bactérie grâce à sa structure procaryote qui possède une membrane pluristratifiée de 4 couches. Son nom dérivé de la configuration physique spiralée et hélicoïdale de ses filaments, en latin "*Spira*" signifie enroulement (Manet, 2016). Ce filament est appelé "trichome" à une longueur variable (généralement de 50 à 500  $\mu\text{m}$ ) et un diamètre proche de 3 à 12  $\mu\text{m}$ , mais les dimensions des cellules, le degré d'enroulement et la longueur des filaments varient selon les espèces (Habib et al. 2008).

On distingue plusieurs morphologies "spirales", "ondulées" et "droites" figure (01) (Tsarahevitra, 2005), cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat. (Charpy et al., 2008)

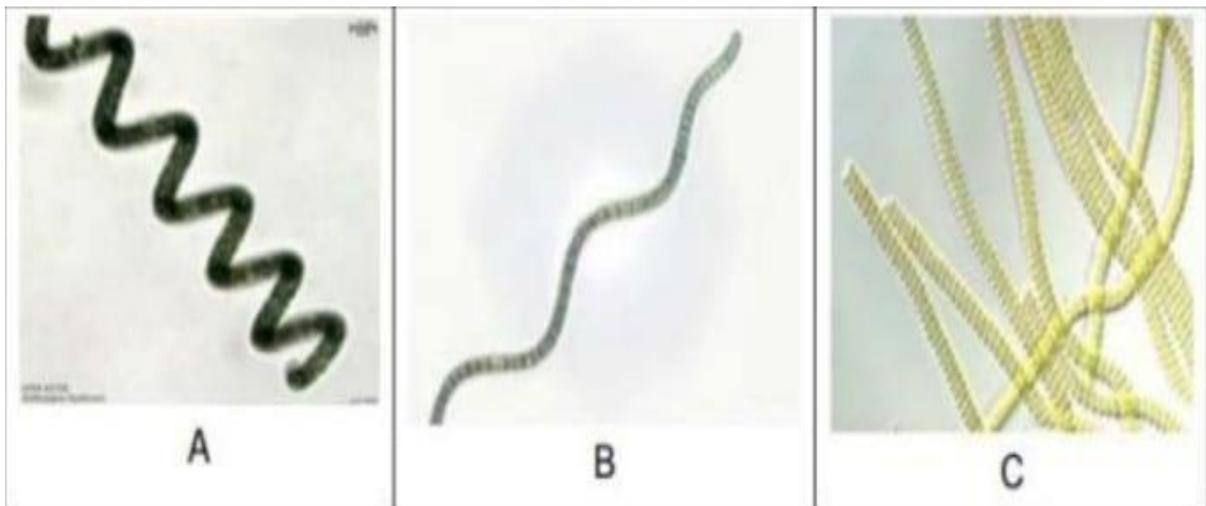


Figure 02 : Différentes formes prises par la *Spiruline*. (A) spiralee, (B) ondulee, (C) droite (Charpy et al. 2008)

### 1.4. Taxonomie :

La *Spiruline* était à l'origine considérée comme une algue. Cependant, en 1960 une Claire distinction entre procaryote et eucaryote a été définie, basée sur la différence d'organisation cellulaire : les procaryotes regroupent les organismes dépourvus de Compartiment cellulaire, tandis que les nucléoles et des mitochondries (**Durand, 1999**).

En 1992, (**Scanier and vassiel, 1962 ; Stanier, 1974**) constataient que cette algue bleu-vert était dépourvue de compartiment cellulaire, et donc faisait partie des procaryotes ; ils proposaient de désigner ce microorganisme 'cyanobactérie'. Cette nouvelle désignation est finalement acceptée et figurée pour la première fois au 'Bergy Manual of Déterminative Bactériologie en 1974 (**Stanier, 1974 ; Durand, 1993**).

La *Spiruline* est une cyanobactérie. Elle appartient donc au domaine des bactéries (Bacteria) et se classe parmi les bactéries gram négatives. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthétiser avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires.

La *Spiruline* appartient à l'ordre des Nostocales (*Oscillatoriales*), la famille des *Oscillatoriaceae*, le genre *Oscillatoria* et le sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira* (**Charpy et al. 2008**). Avant de développer l'état actuel des connaissances scientifiques sur la *Spiruline*, il convient de préciser une terminologie confuse (tableau 1).

**Tableau 01 : les diverses appellations de la *Spiruline* (Andréani, 2005)**

Les appellations de la <i>Spiruline</i>	Définitions
<i>Spiruline</i>	Nom commercial d'une cyanobactérie appartenant toujours au genre <i>Arthrospira</i>
<i>Spirulina</i>	Nom commercial anglais de la même Cyanobactérie
<i>Spirulina</i>	Nom scientifique et taxonomique d'une autre cyanobactérie fort éloignée des <i>Arthrospira</i> . Aucune à ce jour n'a été étudiée sous l'angle de l'alimentation humaine. Et aucune n'est commercialisée à cette fin.
<i>Arthrospira</i>	est le nom scientifique et taxonomique d'un groupe de cyanobactéries auxquelles appartient notre <i>Spiruline</i> alimentaire.

**Tableau 02 : classification de *Spiruline***

On la classe donc selon **Fox (1999a)** dans :

<b>Règne</b>	<b>Monera</b>
<b>Groupe ou sous règne</b>	Procaryotes
<b>Embranchement</b>	Cyanophyta
<b>Ordre</b>	<i>Nostocales (Oscillatoriales)</i>
<b>Famille</b>	<i>Oscillatoriaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Oscillatoria</i>
<b>Sous genre</b>	<i>Spirulina</i> <i>Arthrospira</i>

Les *Nostocales* sont des cyanophycées filamenteuses unisériées, ramifiées (fausses Ramification simples ou géminées) ou non ramifiées. Elles se multiplient le plus souvent Parhormogonies pluricellulaires et parfois par akinètes.

Les *Oscillatoriaceae* se caractérisent par : des trichomes cylindriques, unisériées, Simples, qui sont atténués parfois à l'apex par une courbure ou par la présence d'une Coiffe, mais jamais en poils articulés. Les trichomes sont nus ou pourvus d'une gaine. Les trichomes sont libres, solitaire et dépourvus de gaine. Ils sont droits ou flexueux et Parfoistordus en une hélice régulière. (Charpy et al, 2008).

On peut considérer *Spirulina* comme sous genre d'*Oscillatoria*, car elle diffère Seulement par l'enroulement hélicoïdal du trichome. Chez *Spirulina*, les trichomes sont Régulièrement enroulés en hélice plus ou moins serrée et leurs cloisons sont plus ou moins visibles.

Le trichome est de grande taille et les cloisons sont bien marquées. Cette micro algue change de forme en fonction des caractéristiques physiques et Chimiques du milieu dans lequel on la trouve. Mais on remarque que dans un même milieu On trouve des variétés des formes (figure 2). C'est peut-être là l'origine de la confusion Entre les termes *Spirulina* et *Arthrospira* (Fox, 1999a).

### 1.5. Reproduction :

La *spiruline* se développe de 25% chaque jour, sa quantité doublant en 4 jours. Sa reproduction est végétative (asexuée) et s'effectue par scission simple, fission binaire ou multiple, par bourgeonnement ou fragmentation au hasard.

Les 3 étapes fondamentales de son cycle de vie sont :

- la fragmentation des trichomes
- puis les cellules s'élargissent, le trichome mature, et se divise en filaments par fission binaire, ces filaments prenant une forme hélicoïdale (Lounici, 2010).

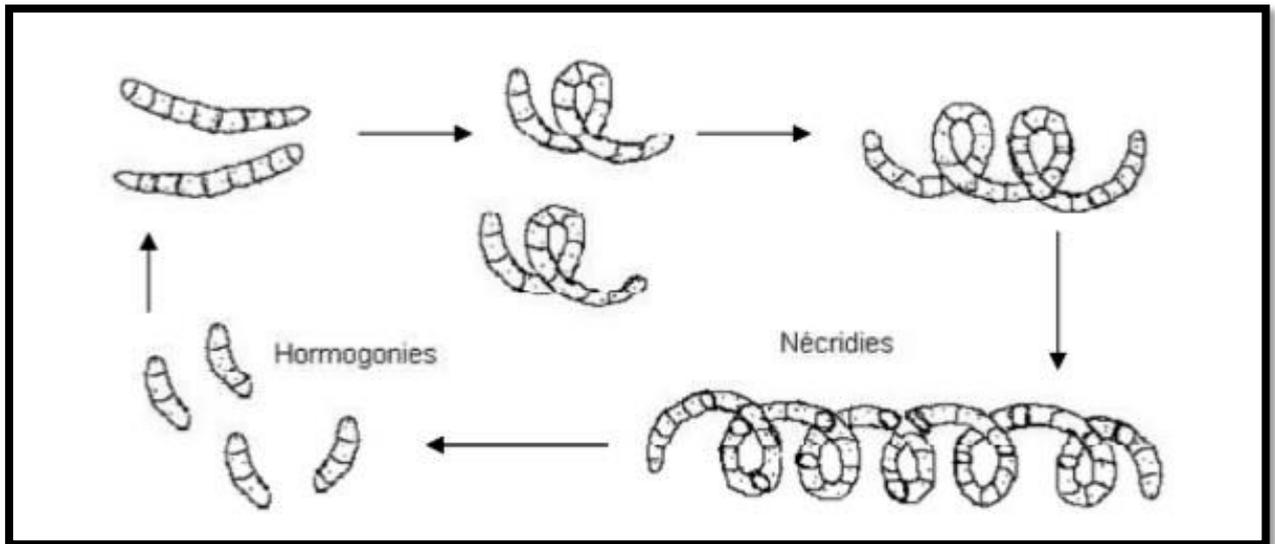


Figure 03 : cycle biologique de la *Spiruline* selon Balloni et al. 1980 in Ravelo, 2001.

## 2. la culture de la *Spiruline*

### 2.1. Conditions physiques et chimiques de croissance

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

La *Spiruline* croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines ( $8 < \text{pH} < 11,5$ ) et natronées (fortement concentrées en carbonates et bicarbonates) de la zone intertropicale. En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer, sont les éléments limitant de la production phytoplanctonique dans les milieux aquatiques. Dans les gisements naturels, ces éléments sont apportés par les bassins versants. La *Spiruline* se développe dans des eaux chaudes (28 à 40°C) et bénéficie d'une intensité lumineuse élevée. Le vent joue un rôle important en créant une agitation qui favorise une dispersion homogène de la *Spiruline* dans le milieu, et donc son exposition à la lumière.

En milieu naturel, lorsque les conditions sont optimales, les *Spirulines* peuvent se développer en grande quantité et entrent alors en compétition avec d'autres organismes. Lors des efflorescences, la consommation des carbonates et bicarbonates entraîne une augmentation du pH limitant ainsi la croissance des autres microorganismes.

## 3. Etablissement Et Installation D'une Ferme De Culture :

### 3.1. Choix du terrain

Pour mettre en place une ferme de culture de *Spiruline* et en assurer le suivi, il faut avoir fait le bon choix du site et des matériaux de construction. Il faut respecter quelques règles pas toujours évidentes : pas sous des arbres, ni en un lieu inondable, ni près d'une route ou d'une industrie

(pollution). A l'abri des curieux, souvent ignorants et pas toujours bien intentionnés. Un terrain plat facilitera le travail, de même que la proximité de l'eau, etc.

### **3.2. Influence du climat**

Les deux paramètres fondamentaux qui contribuent à constituer le climat sont les températures et la pluviométrie. Il ne faut pas pour autant négliger les vents dominants qui peuvent avoir des conséquences importantes sur l'évaporation d'un bassin de culture, sur la température de l'eau ou la "pollution" de ce bassin par tous les débris et les poussières qu'il peut entraîner.

De même certains éléments comme les haies, la présence de barres rocheuses, de Forêts, etc. peuvent entraîner des conséquences importantes sur le microclimat, Conséquences qu'il sera bon d'évaluer avant l'implantation d'un bassin.

#### **a) Température**

La température du milieu de culture doit donc se situer entre 25 à 30°C. La température idéale pour la culture est de 37°C. Plus la "saison" est longue, plus la période de récolte est longue. Les climats continentaux ou d'altitude sont désavantagés.

Dans un climat trop froid, on peut compenser artificiellement comme pour tous les Végétaux. La construction de bassins sous serre peut être d'autant plus intéressante que cet abri constitue non seulement une protection contre le froid, l'évaporation, les Insectes et les poussières mais aussi contre les pluies diluviennes, comme les orages, qui peuvent faire déborder les bassins et donc provoquer une perte, ou au moins une dilution du milieu de culture.

#### **b) Pluviométrie**

La conduite de bassins de culture nécessite un minimum de ressources en eau. Les Eaux de pluie sont intéressantes car propres et neutres (pas de minéraux en solution).

Sous les climats à faible pluviométrie, ou à saison sèche longue, il peut être nécessaire de prévoir une citerne pour stocker de l'eau de pluie et compenser ainsi l'évaporation des bassins. Là encore, il faut un "juste milieu". Les excès de précipitations devront être prévus en construisant des bassins plus profonds ou en les protégeant. Le manque d'eau est évidemment rédhibitoire. La carence en eau de pluie peut être compensée par l'utilisation d'eaux de provenances diverses, et plus ou moins "chargées" (rivière ou fleuve, nappe phréatique, eaux usées...). Il faudra alors tenir compte de la qualité de l'eau dans la mise au point, puis l'entretien du milieu de culture.

La présence d'une couverture translucide au-dessus des bassins pour éviter une Dilution du milieu de culture est une bonne solution dans les régions à fortes Précipitations.

#### **c) Saisonnalité**

Dans les régions tempérées, l'hiver est généralement trop froid pour cultiver la *Spiruline*, sauf avec chauffage et éclairage artificiels trop coûteux. Même dans des régions chaudes un arrêt annuel peut être rendu nécessaire par l'importance des pluies ou de la sécheresse ou par les vents de sable à certaine saison. La culture de *Spiruline* sera donc souvent saisonnière. Durant la mauvaise saison, une "souche" de *Spiruline* devra impérativement être conservée dans son milieu de culture. Les contenants (bocaux, bonbonnes, bassines) devront laisser passer la lumière et être stockés dans un lieu clair mais à l'ombre, ou être sous éclairage électrique. Même

si les cultures de *Spiruline* survivent à des températures inférieures à 10°C, voire à de brèves gelées, il est prudent de ne pas les stocker au-dessous de 18°C pendant de longues périodes, car les risques de contamination augmentent.

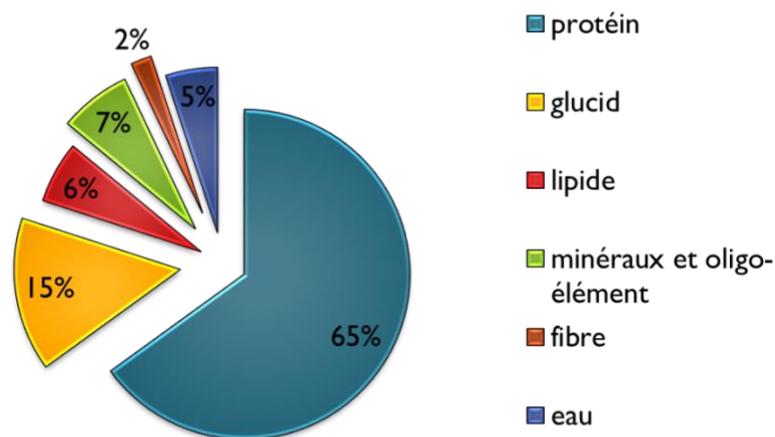
Le fait que la spiruline prospère en milieu très alcalin présente deux avantages majeurs :

- Meilleure absorption du gaz carbonique de l'air
- Protection contre les contaminations.

Toutefois, il ne faut pas croire que seule la spiruline peut croître dans son milieu de culture : d'autres algues, des microorganismes et des animaux peuvent y vivre, d'où la nécessité de surveiller les cultures du point de vue des contaminants, surtout aux changements de saisons. (Amed Ali, 2011).

#### 4. Composition biochimique

Il existe de fortes variations dans le milieu de culture et le mode de conditionnement concernant la *Spiruline* tel que l'existence de différentes souches de *Spiruline*, l'origine géographique et les éléments chimiques entrant dans la composition du milieu de culture (Falquet et Hunri, 2006 ; Charpy et al. 2008). Par rapport à son poids sec, la *Spiruline* disposerait d'un taux d'environ 65 à 70% de protéines, 15 à 25% de glucides et 6 à 8% de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux (principalement des oligoéléments) et des pigments (chlorophylle, caroténoïdes et phycobiliprotéines) (Falquet, 1996 ; Cheong et al., 2010).



**Figure 04 : composition biochimique et valeurs nutritives de la *Spiruline***

##### 1) Protéines

L'analyse des propriétés nutritionnelles de la cyanobactérie a d'abord révélé une teneur particulière en protéines. Elle peut osciller entre 50% et 70% du poids sec. Un aspect qualitatif de la *Spiruline* montre que les protéines sont complètes car tous les acides aminés nécessaires s'y trouvent (Gutierrez-Salmeán et al, 2015), représentent 47% du poids total des protéines. Les acides aminés soufrés, la méthionine et la cystéine, ainsi que la lysine, sont certes plus faiblement représentés. Sa richesse nutritionnelle est due à ces protéines quasiment bio-assimilables à 100 % dont le corps peut presque toutes les utiliser.

La paroi composée de muréine confère à la *Spiruline* une très haute digestibilité, entre 75 et 90% (Chapry et al, Falquet et Hurni,2006).Excepté ces protéines, la *Spiruline* contient une quantité exceptionnelle de phycobiliprotéines, des pigments colorés intervenant dans la photosynthèse, classées en trois groupes : la phycoérythrine, l'allophycocyanine et la phycocyanine . Les principales fonctions des acides aminés de la *Spiruline* et leur teneur moyenne sont résumées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 03 : Teneur moyenne et principales fonctions des minéraux et des oligoéléments de la *Spiruline*(Vidal,2008 ;Vasson,2015 ;Manet et al,2016 ).**

Acides Aminés (AA)	Teneur moyenne dans 10g de spiruline	Principales fonctions
<b>AA essentiels</b>		
<b>Isoleucine</b>	350 mg (50% des AJR)	-Indispensable dans le processus de croissance
<b>Leucine</b>	540 mg (49% des AJR)	-Stimule les fonctions cérébrales
<b>Lysine</b>	290 mg (36% des AJR)	-Production d'Anti corps, d'enzymes, d'hormones
<b>Méthionine</b>	140 mg (23% des AJR)	-Antioxydant puissant
<b>Phénylalanine</b>	280 mg (140% des AJR)	-Indispensable à la thyroïde
<b>Thréonine</b>	320 mg (64% des AJR)	-Améliore la fonction digestive et intestinale
<b>Tryptophane</b>	100 mg (48% des AJR)	-Contribue à la synthèse de sérotonine
<b>Valine</b>	400 mg (44% des AJR)	-Stimule les capacités mentales et physiques
<b>AA non essentiels</b>		
<b>Alanine</b>	470 mg	-Participe au métabolisme du glucose
<b>Arginine</b>	430 mg	-Participe à la sécrétion de l'hormone de croissance
<b>Acide aspartique</b>	610 mg	-Participe à la synthèse de plusieurs acides aminés
<b>Cystine</b>	60 mg	-Indispensable pour l'utilisation de la vitamine B6
<b>Acide glutamique</b>	910 mg	-Indispensable dans le métabolisme azoté
<b>Glycine</b>	320 mg	-Intervient dans la production de l'ADN et l'ARN
<b>Histidine</b>	100 mg	-Indispensable dans le processus de croissance
<b>Proline</b>	270 mg	-Indispensable dans la production de collagène
<b>Tyrosine</b>	300 mg	-Précurseurs de la dopamine, production thyroxine
<b>Sérine</b>	320 mg	-Indispensable à la formation des membranes des cellules,

\*AA : Acides Aminés, AJR : Apports Journaliers Recommandés.

## 2) Lipides

Il convient de rappeler que les lipides font partie de 6% à 8% du poids sec de la *Spiruline* mais peuvent atteindre jusqu'à 11%. D'un point de vue qualitatif et quantitatif, cette divergence provient essentiellement de la méthode d'extraction et l'heure de la récolte de la *Spiruline* (Babadzhanov et al,2004).

Son exceptionnelle teneur en lipides totaux constitue un équilibre stable en acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. Parmi ces acides gras, ils figurent deux fractions qui se subdivisent en fraction saponifiable (83%) et fraction insaponifiable (17%) (Goulambasse, 2018).

### 2).1.Fraction saponifiable

Cette proportion d'acide gras représente 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la *Spiruline*(Fox,1999). Elle est principalement composée de monogalactosyl-diacylglycérol (MGDG) (12%), de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) (8%), de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (5%) et de phosphatidylglycérol (26%)(Xue et al,2008). A noter que les triglycérides, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol sont présents qu'en très faible taux .

La composition de la *Spiruline* se caractérise par la présence d'une forte concentration combinée en acide alpha-linoléique (oméga 3) et l'acide linoléique (oméga 6). Ces substances essentielles jouent un rôle primordial dans le maintien du système nerveux, cardiovasculaire, immunitaire et les réactions allergiques (Vidé, 2015).

L'acide gamma-linoléique (AGL, oméga-6) constitue environ 20% des acides gras totaux. Cet acide gras est intéressant comme précurseur des prostaglandines, des thromboxanes, des leucotriènes et médiateurs des réactions inflammatoires et immunitaires. Ces caractéristiques remarquables font en sorte que la *Spiruline* soit considérée comme la source idéale des omégas 3, oméga 6 et plus précisément l'acide gamma-linoléique (Gutiérrez-Salmeán et al. 2015)(Tableau3).

**Tableau 04 : Composition en acides gras de la spiruline(Vidé, 2015).**

Composition	% AJR pour 10g de spiruline
<b>Acide palmitique (C16 : 0)</b>	25,8
<b>Acide palmitoléique (C16 : 1)</b>	3,8
<b>Acide stéarique (C18 : 0)</b>	1,7
<b>Acide oléique (C18 : 1)</b>	16,6
<b>Acide linoléique (C18 :2)</b>	40,1
<b>Acide gamma-linoléique (C18:3)</b>	40,1

### 2).2. Fraction insaponifiable

Les lipides insaponifiables représentent 1,1 à 1,3 % de la matière sèche de la *Spiruline*. Ils regroupent des stérols, des terpènes et des hydrocarbures saturés (paraffines). La présence de certains stérols peut expliquer en partie l'activité antimicrobienne de cette cyanobactérie. La

propriété odoriférante de la micro algue est due aux terpènes. Quant aux paraffines, elles sont apportées par une source d'alimentation (Fox, 1999).

### 3). Glucides

Les glucides constituent 15% à 25% de la matière sèche de *Spirulina platensis*. Appelés aussi hydrates de carbone, ils composent la paroi cellulaire des *Spirulines* en s'associant à celles des bactéries gram négatif. Les polymères essentiels retrouvés au sein de la spiruline sont la glucosamine, le rhamnose et le glycogène. Ces derniers sont facilement absorbables au sein de l'organisme (Babadzhanov, 2004).

La *Spiruline* est composée de polysaccharides complexes sulfatés et spécifiques qui possèdent des propriétés antivirales et anticoagulantes (Furmaniak et al. 2017). On cite :

- La *Spiruline* calcique (Ca-Sp) : un polysaccharide composé de rhamnose, fructose et en quantité moindre de ribose, mannose, glucose, xylose, soufre et calcium. Il a un effet antiviral contre le virus de l'herpès de type 1, la rougeole, oreillons, grippe et VIH (Lee et al. 2001 ; Yamamoto et al. 2003).
- La *Spiruline* sodique (Na-Sp) : présente un effet antithrombine sur le système de coagulation sanguine fibrinolytique par l'activation du facteur 2 de l'héparine (Yamamoto et al. 2003).

Une substance glucidique appartenant aux cyclitols, le méso-inositol phosphate est qualifié d'une source excellente de phosphore (Falquet et Hunri, 2006).

L'*Immulina* est un extrait commercial de *Spiruline*. C'est un polysaccharide de haut poids moléculaire qui a été étudié pour ses propriétés immunomodulatrices et antimicrobiennes. Cependant les glucides simples comme le glucose, le fructose, et le saccharose, en ajoutant les polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, ne sont présents qu'en très faibles quantités. C'est pour cette raison la *Spiruline* est peu calorique (Ahounou, 2018).

### 4) Nucléiques Acides

Les acides nucléiques présents dans la *Spiruline* sont ADN (30%) et l'ARN (70%). Une source alimentaire riche en acides nucléiques induit la dégradation biochimique des purines pour produire l'acide urique (Charpy et al. 2008).

### 5) Vitamines

*Spirulina platensis* est riche en deux types de vitamines selon leurs propriétés de solubilité. Elle contient 4 vitamines liposolubles (A, D, E, K) et 9 hydrosolubles (B1, B2, B3, B5, B6, B12, C). Ce sont des substances nutritives vitales et sans valeur énergétique décrites dans la prévention contre des maladies telles que les pathologies osseuses, maladies cardio-vasculaires, le cancer et les malformations fœtales (Manet, 2016).

Les AJR en provitamine A sont d'environ 15 à 24 milligrammes par jour : un apport quotidien de cinq grammes de *Spiruline* répond à plus 1000% de l'AJR. Un apport quotidien de cinq

grammes de *Spirulina* répond à plus 300% de l'AJR équivalent à 0,2 milligrammes par jour (Manet, 2016).

**Tableau 05 : Teneur moyenne dans 10g de Spiruline et les principales fonctions des vitamines hydrosolubles (Manet, 2016).**

Vitamines hydrosolubles	Teneur moyenne dans 10g de spiruline	Principales fonctions
<b>B1 (thiamine)</b>	0,35 mg (30% des AJR)	-Transmission d'influx nerveux -Assimilation des glucides
<b>B2 (riboflavine)</b>	0,35 mg (21% des AJR)	-Production d'énergie par le métabolisme des glucides et lipides. -Croissance des tissus (peau et muqueuses) -Vision
<b>B3 (niacine, PP)</b>	1,46 mg (9% des AJR)	-Production d'énergie -Transmission de l'influx nerveux
<b>B5 (panthoténate)</b>	0,5-10mg (10% des AJR)	-Croissance des tissus (peau, cheveux, muqueuses) -Favorise la production d'énergie
<b>B6 (pyridoxine)</b>	0,08 mg (5% des AJR)	-Synthèse des neurotransmetteurs -Métabolisme des protéines
<b>B8 (biotine)</b>	0,5 µg (0.5% des AJR)	-Métabolisme : protéines, lipides, glucides -Synthèse des vitamines B9 et B12
<b>B9 (acide folique)</b>	0,01 mg (2.5 % des AJR)	-Renouvellement de toutes les cellules -Synthèse des neuromédiateurs -Indispensable à la synthèse des globules rouges et oxygénation cellulaire
<b>B12 (cobalamine) *</b>	0,015-0,032 (1000% des AJR)	-Formation des GR (anti anémique) -Renouvellement cellulaire

### **5).1. Vitamines hydrosolubles**

La plupart des vitamines hydrosolubles et spécialement les vitamines du groupe B sont transformées en co-enzymes et parfois en cofacteurs intervenant dans la synthèse des hormones et des enzymes, la production de l'énergie et la transmission d'influx nerveux.

Il faut souligner la biodisponibilité réelle d'un complexe en vitamine B12 sous forme active dans la *Spirulina* (Falquet et Hunri, 2006). En industrie pharmaceutique, les cyanobactéries utilisées en compléments alimentaires sont basées d'un analogue de B12 qui est inactive (Watanabe, 2007).

### **6). Minéraux et oligoéléments**

La *Spirulina* contient tous les minéraux essentiels environ 7% du poids sec. Une variation quantitative remarquable réside entre les oligoéléments et les éléments minéraux ; ceci conclue

la haute disponibilité des minéraux vis-à-vis des oligoéléments qui sont présents à l'état trace (Manet, 2016).

Les macronutriments et micronutriments résidants dans *Spirulina platensis* sont respectivement :

- **Les sels minéraux** : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore et le soufre.
- **Les oligoéléments** : le fer, le zinc, le chrome, le manganèse, le sélénium, le cobalt et le bore (Manet, 2016).

Les minéraux et les oligoéléments présents dans la *Spirulina* sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 06 : Teneur moyenne et principales fonctions des minéraux et des oligoéléments de la *Spirulina* (Manet, 2016).**

Oligoéléments	Teneur moyenne dans 10g de <i>Spirulina</i>	Principales fonctions
<b>Fer</b>	7-18 mg (50 à 100% des AJR)	-Fabrication et fonctionnement de l'hémoglobine -Constitution de myoglobine
<b>Sélénium</b>	0,1-2.55 mg (20-100% des AJR)	-Cofacteur des enzymes anti oxydantes -Stimulant de l'immunité
<b>Cuivre</b>	0,1mg (5% des AJR)	-Cofacteur de nombreuses enzymes -Anti-inflammatoire, antioxydant
<b>Manganèse</b>	0,4 mg (12% des AJR)	-Formations des os et des enzymes -Métabolisme protéines, lipides, glucides -Stabilise taux de glucose sanguin
<b>Chrome</b>	0,03-0,25 mg (16% des AJR)	-Métabolisme glucides, lipides, acides
<b>Zinc</b>	0,4 mg (4% des AJR)	-Activation de plus de 200 enzymes
<b>Potassium</b>	100-200 mg (5-10% des AJR)	-Perméabilité des membranes - Régulation du rythme cardiaque
<b>Sodium</b>	0.09 mg	-Régulation pression osmotique -Maintenance de l'équilibre hydroélectrolytique et de la masse hydrique
<b>Magnésium</b>	25-50 mg (9 à 25% des AJR)	-Masse minérale du squelette osseux -Métabolisme glucidique et lipidique (muscle, coeur, axe nerveux)
<b>Calcium</b>	130 mg (10% des AJR)	-Édification et renouvellement du squelette -Rythme cardiaque, système nerveux
<b>Phosphore</b>	67 mg (8 % des AJR)	-Masse minérale du squelette osseux

## 7). Enzymes

De nombreuses enzymes entrent dans la composition de la *Spirulina*, il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD) qui est parfaitement assimilable par la *Spirulina* dépourvue de paroi cellulosique. Elle représente une arme majeure contre le vieillissement et les lésions

cellulaires comme elle est caractérisée par un pouvoir potentiel antioxydant dans la libération des anions superoxydes (**Proy, 2019**).

### 8). Pigments

*Spirulina platensis* est munie d'un système énergétique photosynthétique qui nécessite des pigments étroitement liés à l'intensité lumineuse reçue. Ainsi, la cyanobactérie fut nommée «< aliment solaire naturel >> (**Vidé, 2015**).

Quatre pigments protéiques accessoires se révèlent d'une manière particulière et abondante dans la composition de la *Spiruline*.

### 9). Les caroténoïdes

Les caroténoïdes, précurseurs de la vitamine A, sont un groupe de pigments non azotés naturellement colorés qui varient d'un jeune clair et fonce vers le rouge (**Vidalo, 2008**). Cette famille comprend deux subdivisions principales :

- **Les carotènes** : les carotènes (alpha et bêta), suivi par le lycopène et le phytoène qui ne contiennent pas d'atomes d'oxygène mais uniquement des atomes d'hydrogène.
- **Les xanthophylles** : comme la lutéine, la zeaxanthine ou l'astaxanthine et la

Capsanthine. Celle-ci sont pourvu d'atomes d'oxygène (**Nutrixeal, 2020**).

Elle retient les plus grands intérêts biologiques relatifs à l'activité antioxydante. Une étude clinique a permis de démontrer que la *Spiruline* est une source nutritionnelle privilégiée de caroténoïdes identique à une alimentation avec légumes à feuilles et de carottes. De plus, elle participe à la stimulation du système immunitaire, le ralentissement du vieillissement et la protection contre les UV (**Le Guehenec, 2009**).

### 10). La chlorophylle

Dans tous les organismes photoautotrophes, la chlorophylle est un pigment photosynthétique connu pour sa couleur verte. Elle représente 1% de la matière sèche de la *Spiruline* (**Proy, 2019**). Parmi les bienfaits qui lui sont attribués, on cite :

- Renforcement du système circulatoire ;
- Régulation du transit intestinal ;
- Stimulation de la production d'hémoglobine et les globules rouges chez les personnes anémiques (**Laurent, 2019**).

La classification de la chlorophylle dépend de la chaîne latérale du groupement X et du noyau chlorine. On retrouve cinq types de chlorophylle : chlorophylle a, chlorophylle b, chlorophylle c et chlorophylle d. La *Spiruline* classée parmi les cyanobactéries renferme essentiellement la chlorophylle du type à (**Société Chimique de France, 2018**).

La structure molécule de la *Spiruline* est très proche à celle de l'hémoglobine puisqu'elle est aussi constituée du noyau pyrrole. Il existe une seule différence au niveau d'un seul atome ; il s'agit du magnésium pour la chlorophylle et le fer pour l'hémoglobine. Le magnésium capté par la chlorophylle permet de maintenir l'équilibre acido-basique de notre organisme (**Le Guehenec, 2009**).

Une consommation quotidienne de 5 grammes de *Spiruline* regorge une abondance de 40 milligrammes de chlorophylle (**Laurent, 2019**).



**Figure05 : La culture d'une souche mérede la *Spiruline***

**(ARTTHROSPIRA PLATENSIS PARACAS) Région De Béni Saf(cliché par Seklalatika et Ben aissa souad,14 mai 2023).**

## **5.Application de la *Spiruline***

En1999, Borowitzka,M.A avait montré la possibilité de faire pousser l'algue dans l'espace sous microgravité avec des fibres optiques. Cette fraction magique a été également utilisée dans le

traitement des effluents industriels et comme source d'énergie durable et de biocarburant (HO M.W, 2006).

### **5.1. Domaine Agro alimentaire**

L'industrie agroalimentaire, utilise les *Spirulines* pour l'alimentation animale et la fabrication d'aliments diététiques destinés aux régimes hyperprotéiques : la spiruline fait partie des innovations de la technologie agro-alimentaire.

En agriculture ou biologie, le groupe des cyanobactéries produit une variété de métabolites secondaires dans leur milieu de culture (Harrigan,G.G et al 2002.). Beaucoup de ces produits naturels ont des activités antibiotiques, algicide, antiviral et fongicide ( Mundt,S et al 2001) .

En aquaculture, la *Spiruline* est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage, plus souvent soumis à des infections virales et/ou bactériennes que les poissons sauvages. Ainsi, Watanuki et al., 2006 ont mis en évidence l'effet immunostimulant de *Spirulinaplatensis* chez la carpe *Cyprinus carpio*.

La *Spiruline* est utilisée pour ses pigments :

- En aquariophilie pour accentuer la coloration des poissons d'ornement ;
- En aquaculture pour améliorer la pigmentation des crevettes et des poissons ;
- En agroalimentaire pour rendre les œufs et la chair de poulet plus attrayants au consommateur par les caroténoïdes qu'elle contient.

#### **5.1.1. Adjuvants de régime amaigrissant**

La *Spiruline*, grâce à son apport naturel et équilibré en vitamines, minéraux et oligo- éléments, peut donc être considérée comme une véritable alliée pour les personnes qui veulent entamer un régime. De plus, par son effet détoxifiant, elle aide à éliminer les toxines. (Algosopnette.com 2010).

Ainsi , après quelques jours d'utilisation, l'effet énergisant de la *Spiruline* fait que la personne, non seulement ne se sent pas fatiguée (puisque'elle n'est pas carencée), mais en plus elle se sent plus dynamique qu'avant le début de son régime. Cette constatation émane de nombreux témoignages de femmes (et d'hommes aussi) qui l'ont testée (Algosopnette.com 2010) .

Par ailleurs, la prise de 5 à 10 g de *Spiruline* 20 à 30 minutes avant les repas, entraîne un sentiment de satiété lequel facilite le suivi d'un régime hypocalorique. Ce phénomène est lié à sa teneur en phénylalanine (2,8 g pour 100 g de matière sèche) : cet acide aminé est métabolisé dans l'intestin en phényléthylamine, laquelle déclenche la sécrétion d'une hormone (la cholécystokinine) qui donne au cerveau un signal de satiété, c'est en quelque sorte un coupe-faim naturel et sans danger. (Ballinger,A .B 1994)

#### **5.1.2. Utilisation de la *Spiruline* pour usage animal**

La *Spiruline* est utilisée dans les domaines d'élevage : comme un complément alimentaire pour les animaux (favoriser la croissance et la fertilité et pour augmenter la pigmentation des

animaux), Elle est vendue comme additif à la nutrition des taureaux , elle donne une robe plus brillante chez les cerfs et exerce une action énergisante. . (HenriksonR , 2000)

Des études sur les poissons d'aquarium tels le Xiphophorus helleri et la crevette Fenneropenaeus chinensis. Kim, C, G et al, 2006 ont montré les effets bénéfiques de *Spirulina platensis* Ainsi l'influence bénéfique comme sur la croissance l'incorporation de *spiruline* dans les poulets de chair a été étudié par Razafindrajaona, 2008.

En aquaculture, la *Spiruline* est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage plus souvent soumis à des infections virales. Watuniki et al , 2006 ont mis en évidence l'effet immunostimulant de *Spirulina platensis* chez la carpe *Cyprinus carpio*.

Chez les chiens et les chats, la *spiruline* permet d'améliorer l'état de la peau et des poils et d'éviter les carences en calcium. (HenriksonR , 2000) La dose dépend du poids de l'animal . Elle prévient les infections respiratoires chez les lapins.(Henrikson R , 2000). Surmonte la fatigue physique et les états de stress en période de mue chez les oiseaux et favorise un plumage doux et solide.

Actuellement, ces pigments connaissent un regain d'intérêt. Il existe en effet à l'heure actuelle une forte tendance de substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Cette tendance s'explique d'une part, par l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels pour des impératifs sanitaires, écologiques et de protection de l'environnement et d'autre part, par l'évolution de la législation qui vise à favoriser les produits naturels par rapport à ceux de synthèse. Cet état de fait explique l'accroissement considérable de la demande du marché en colorants naturels(Boldirev,2005).

Plusieurs colorants naturels disponibles sur le marché font apparaître un manque considérable de colorants bleus. Les seuls indiqués sont la *Chamazulène* (extraite des fleurs de la camomille) et *l'Indigo* (issu de la fermentation des feuilles de l'indigotier).

La disponibilité de ces deux colorants reste cependant en deçà des besoins du marché, en raison des faibles rendements d'extraction qui ne dépassent pas pour les deux cas 0,1 % du poids sec. Parmi les phycobiliprotéines, la phycocyanine détient un monopole de fait en raison de sa couleur bleue unique.

## 5.2. Domaine de l'industrie cosmétique

On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ( Fabius, 1998).

La *Spiruline*, en cosmétique applicable, constitue un véritable allié pour la beauté, utilisée pour la variété de couleurs qu'elle peut donner lors de son mélange avec d'autres composées. Depuis

de nombreuses années, elle rentre ainsi dans la composition de rouges à lèvres et de crayons pour souligner les yeux, les cheveux retrouvent vigueur et brillance, tandis que les ongles renforcés cassent moins facilement (Anonyme, 2012).

La fabrication des pommades, des masques, des savons, des gel-douches et des crèmes à base de *Spiruline* donnent à la peau toutes ces vertus grâce à sa richesse en éléments nutritifs essentiellement la phycocyanine, qui est le seul pigment bleu naturel qui ne soit ni cancérigène ni toxique. On attribue à cela une activité anti-inflammatoire, hépatoprotectrice et détoxifiante, protectrice contre les radiations, une action activatrice sur le système immunitaire provoquant une augmentation de la réponse de l'organisme, une action anti-radicalaire et une activité antioxydante exceptionnelle (Dupire, 2010).

En cosmétique, la *Spiruline* est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge, par son action sur le renouvellement cellulaire et la tonicité des tissus. (Spolaore, P et al 2006) .

La phycocyanine extraite de la *Spiruline* est aussi utilisée dans le domaine de la cosmétologie, elle rentre ainsi dans la composition de rouges à lèvres et de crayons pour souligner les yeux. (Henrikson, R2000) ainsi, en utilisant de la *Spiruline* en complément d'une alimentation équilibrée, la peau devient plus nette et fraîche, les cheveux retrouvent vigueur et brillance, tandis que les ongles renforcés cassent moins facilement. (Merceron, M, 2006)

De façon un peu plus détaillée, sa teneur en vitamine A permet un bronzage plus rapide et plus uniforme au soleil.

Sa teneur en vitamine B5 permet à la peau de conserver son hydratation et sa souplesse ; elle aide aussi à renforcer les cheveux contre les agressions chimiques et mécaniques. La vitamine B8, en diminuant l'excrétion de sébum, réduit la principale cause de chute des cheveux .

### 5.3. Domaine de la santé

La *spiruline* renferme une teneur élevée en acide qui exerce une action thérapeutique importante sur le derme : atténuation de certains phénomènes inflammatoires (notamment après des brûlures) et amélioration de la qualité des cicatrisations cutanées. Cet acide étant très rare dans la nature (onagre, bourrache, cassis), son extraction à partir de la spiruline pourrait constituer une offre intéressante pour l'industrie cosmétique.

La *spiruline*, grâce à son apport naturel et équilibré en vitamines, minéraux et oligo-éléments, peut donc être considérée comme une véritable alliée pour les personnes qui veulent entamer un régime. De plus, par son effet détoxifiant, elle aide à éliminer les toxines. (Merceron, M, 2006)

Après quelques jours d'utilisation, l'effet énergisant de la spiruline fait que la personne, non seulement ne se sent pas fatiguée (puisque'elle n'est pas carencée), mais en plus elle se sent plus dynamique qu'avant le début de son régime. Cette constatation émane de nombreux témoignages de femmes (et d'hommes aussi) qui l'ont testée (Merceron, M, 2006) .

Par ailleurs, la prise de 5 à 10 g de *Spiruline* 20 à 30 minutes avant les repas, entraîne un sentiment de satiété lequel facilite le suivi d'un régime hypocalorique.

Ce phénomène est lié à sa teneur en phénylalanine (2,8 g pour 100 g de matière sèche) : cet acide aminé est métabolisé dans l'intestin en phényléthylamine, laquelle déclenche la sécrétion d'une hormone (la cholécystokinine) qui donne au cerveau un signal de satiété ; c'est en quelque sorte un coupe-faim naturel et sans danger. (Ballinger, A. B 1994) .

La *Spiruline* dite potion magique a révolutionné tous les domaines que ce soit médical par ses propriétés thérapeutiques potentielles, en se basant sur la composition de cette micro-algue et les études sur les activités de ses composantes, depuis peu, certains chercheurs étudient les effets de la *Spiruline* qui semble être un excellent antiviral. Un anti-herpès, un anti-bactéries, un anti-inflammatoire et lutte aussi contre le HIV-1 (Charaf et al. 2010). Elle baisse le taux de cholestérol et des lipides sanguins. Son effet hypo-glycémiant a été prouvé (Ray et al, 2007) ainsi que son effet contre l'hypertension artérielle (Mani., 2000).

Cette portion magique stimule le système immunitaire elle aurait une activité anti-tumorale et peut induire à un mécanisme d'apoptose des cellules cancéreuses donc prévient et régresse l'activité cancéreuse (Rasool, 2009).

Toutefois, elle exerce une activité anti-oxydante, une activité protectrice contre les radiations en stabilisant l'ADN, une activité sur la flore intestinale (Wu, 2007). Elle prévient l'anémie (Ribadeneira et al, 2000).

La *Spiruline*, possède une propriété de réduire les métaux lourds et des substances néphrotoxiques de l'organisme (Misbahuddin, 2006). C'est un hépato-protecteur (Wu, 2007), lutte contre toxicité cardiaque (Khan, 2006), empêche le développement de l'athérosclérose (Mascher et al, 2005), elle est anti-plaquette, anti-cataracte ; prévient la rhinite allergique voire même le parkinson (Man, 2009). L'efficacité de la *Spiruline* pour perdre de poids (Ho, 2006), paradoxalement, elle permet une meilleure croissance de la musculature et du bien-être corporel (Voltarelli et De Mello, 2008). La *Spiruline* est unique dans le règne végétarien ou végétalien car elle apporte toutes les protéines importantes et de très bonnes qualités, elle évite aussi les carences en nutriments (très utilisée en malnutrition). Il faut bien noter que la *Spiruline* n'est pas un médicament ni un traitement médical (**Mundt, 2001**).

# CHAPITRE 2 :

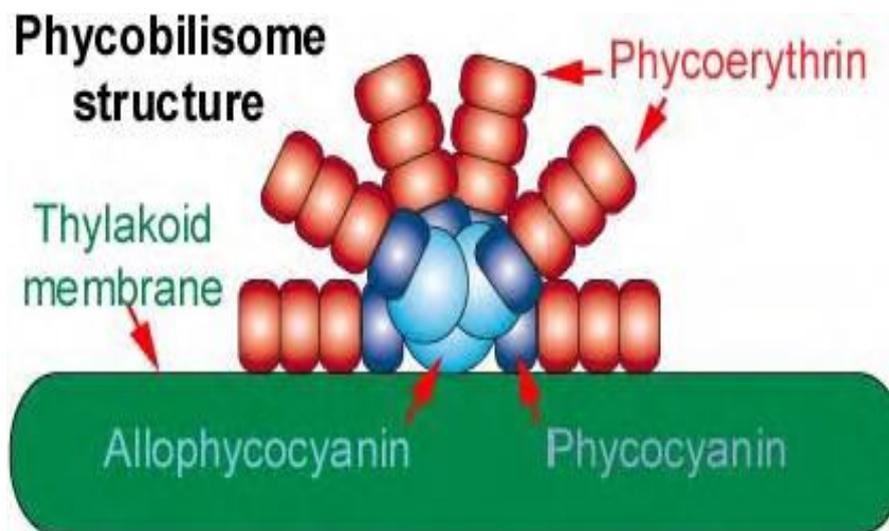
# LA PHYCOCYANINE

## **1. Les principaux constituants fonctionnels de LaPhycocyanine:**

Les cyanobactéries possèdent une large variété de composants colorés incluant les caroténoïdes, les chlorophylles et les phycobiliprotéines.

Les phycobilisomes sont attachés en matrices régulières à la surface externe de la membrane du thylacoïdal, siège de la photosynthèse. Leur principale fonction est de servir de récepteur des rayons lumineux pour l'appareil photosynthétique de la *Spiruline* et convertir cette énergie lumineuse en énergie électrochimique ; ces macro-complexes protéiques sont composés d'un cœur sur lequel sont fixées des projections radiales (ou bras). Pour la spiruline, le cœur est composé de molécules d'allophycocyanine entourées de molécules de phycocyanine périphériques.

Les phycobiliprotéines, dont fait partie la phycocyanine, sont des chromoprotéines constitués d'une partie protéique et d'un pigment. Leur agrégation en complexe macromoléculaire forme le phycobilisome.



**Figure 06: Représentation schématique d'un phycobilisome classique**

Les phycobiliprotéines sont constituées d'une partie protéinique de haute masse moléculaire portant, par des liaisons covalentes, des **chromophores à noyau tétra pyrrolique ouvert**, responsables de leur couleur.

Les principaux chromophores décrits sont :

- la phycocyanobiline,
- la phycoérythrobliline,
- la phycourobiline
- la cryptoviolette.

Chacun d'eux présente un spectre d'absorption spécifique modifié par les interactions avec l'apoprotéine. Les principales phycobiliprotéines sont :

- l'allophycocyanine (APC),
- les phycocyanines (CPC),
- les phycoérythrine (R-PE et B-PE)
- la phycoérythrocyanine (PEC).

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiées :

**Tableau 07: Caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiées**

Phycobiliprotéine	Maximum d'absorption (nm)	Maximum d'émission (nm)	Masse moléculaire (daltons)	Coefficient d'extinction molaire (cm <sup>-1</sup> .M <sup>-1</sup> )	Rendement quantique
<b>R-PE</b>	565, 545 (épaulement), 498	576	240000	1,96 x 10 <sup>6</sup>	0,84
<b>B-PE</b>	545, 565, 498 (épaulement)	576	104000	0,7 x 10 <sup>6</sup>	0,98
<b>APC</b>	652, 620 (épaulement)	660	240000	2,41 x 10 <sup>6</sup>	0,68
<b>C-PC</b>	615	647	220000	1,54 x 10 <sup>6</sup>	0,81
<b>PEC</b>	575	625	100000	0,85 x 10 <sup>6</sup>	

La partie protéique ou apoprotéine est formée par deux sous-unités protéiques  $\alpha$  et  $\beta$  de 15 à 20 kDa formant un hétérodimère appelé aussi « monomère ». Les groupes bilins ou phycobilines constituant le chromophore correspondent à des groupements prosthétiques linéaires isométriques de type tétrapyrrole.

Ils sont classés selon leur configuration moléculaire qui diffère par la disposition des doubles liaisons et leur confère des propriétés spectroscopiques nettement distinctes visualisée par une absorbance significative dans les UV.

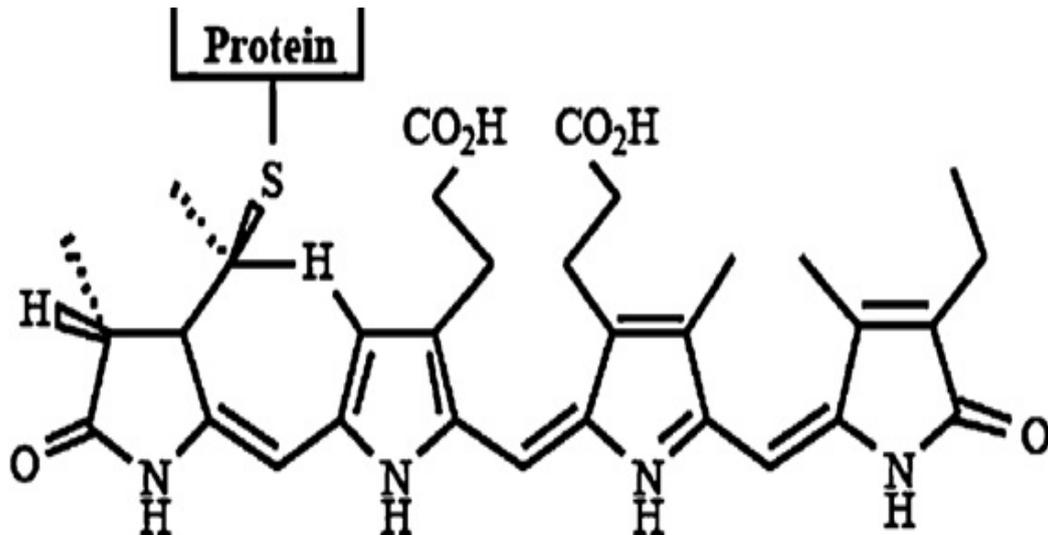
- la phycourobiline de couleur orange absorbe dans le bleu-vert,
- la phycoerythrobiline de couleur rouge absorbe dans le vert,
- la phycobilivoline absorbe dans l'orange
- la phycocyanobiline de couleur bleue absorbe dans le rouge.

Les classes de phycobiliprotéines se distinguent par l'un de leur chromophore appelé "accepteur terminal d'énergie" :

- Pour les phycoérythrine, c'est toujours une phycoerythrobiline.
- Pour la phycocyanine, la phycoerythrocyanine et l'allophycocyanine, ce chromophore est toujours une phycocyanobiline .

## 2. Définition de la phycocyanine :

La phycocyanine est le principal pigment de la *Spiruline* (10 à 20% du poids sec). Il se représente sous forme d'extrait liquide, il est un des rares colorants alimentaires naturels de couleur bleue. Il est vendu sous le nom de (linabule ou sérum bleu). Il est constitué d'une structure protéique reliée à un chromophore : molécule de phycocyanobiline constituée du groupe bilin. Ce dernier est constitué du noyau tétra pyrrolique de la chlorophylle ouvert et sans magnésium. (Gupta et al , 2011).



**Figure 07 : Formule de la phycocyanine.**

### 3. Les méthodes d'extraction de phycocyanine :

Divers chercheurs ont mis au point plusieurs méthodes pour l'extraction et purification de la phycocyanine citant (l'eau, congélation, extraction par des solvants,...).

Cependant, presque toutes ces méthodes d'extraction impliquent de nombreuses étapes de précipitation, centrifugation et dialyse dans la purification initiale, et la chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie de filtration sur gel sont utilisés dans la purification finale.

Inconvénient majeur de ces protocoles est le grand nombre d'étapes impliqués, et il est connu que plus le nombre de marches plus haut plus la perte de rendement du produit n'est élevé. En outre, la mise à l'échelle de ces méthodes est difficile et cher. Il convient de noter que 50-90% du coût de production réside dans les étapes de purification. Par conséquent, il est nécessaire de chercher des méthodes efficaces de bio séparation à grande échelle, qui permettront d'atteindre de hautes puretés, ainsi que rendement élevé, tout en maintenant l'activité biologique des molécules. Une méthode de purification telle qui répond à tous ces critères est l'extraction aqueuse à deux phases extraction (ATPE) (**Ganapathi et Raghavaro, 2007**).

### 4- Les utilisations de la phycocyanine :

Divers aliments renfermant de la phycocyanine extraite de spirulines, sont commercialisés sous la marque "Linablue" créée par le groupe DainipponInk and Chemicals. Nous pouvons citer par exemple (**Cruchot, 2008**):

- des chewing-gums
- sorbets
- sucettes glacées
- Bonbons
- boissons sans alcool

- gelées
- produits laitiers

La phycocyanine est une protéine colorée trouvée exclusivement chez les algues bleues. Elle n'est pas synthétisable par voie chimique. Elle est largement indiquée pour colorer en bleu certains produits alimentaires glacés ou sucrés du genre boissons glacés, crèmes glacées, pâtes, gâteaux et biscuits, etc.).

Elle peut-être, introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires. Elle remplace avantageusement des pigments de synthèse considérés comme suspects.

A l'heure actuelle, les applications connues de la phycocyanine à échelle industrielle se limitent à quelques produits alimentaires (les masselains; les jus sucrés; les glaces, sorbets et accessoirement des chocolats) ou à quelques formulations cosmétiques (crèmes et gels).

Les seules ventes de la phycocyanine sur le marché sont monopolisées par quelques compagnies (essentiellement japonaises) et n'arrivent à couvrir que 2% au maximum du marché américain de colorants naturels alimentaires.

Actuellement, ces pigments connaissent un regain d'intérêt. Il existe en effet à l'heure actuelle une forte tendance de substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Cette tendance s'explique d'une part, par l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels pour des impératifs sanitaires, écologiques et de protection de l'environnement et d'autre part, par l'évolution de la législation qui vise à favoriser les produits naturels par rapport à ceux de synthèse.

Cet état de fait explique l'accroissement considérable de la demande du marché en colorant naturels. Plusieurs colorants naturels disponibles sur le marché font apparaître un manque considérable de colorants bleus. Les seuls indiqués sont la Chamazulène (extraite des fleurs de la camomille) et l'Indigo (issu de la fermentation des feuilles de l'indigotier). La disponibilité de ces deux colorants reste cependant en deçà des besoins du marché, en raison des faibles rendements d'extraction qui ne dépassent pas pour les deux cas 0,1 % du poids sec. Parmi les phycobiliprotéines, la phycocyanine détient un monopole de fait en raison de sa couleur bleue unique.

## **5. Propriétés physico-chimiques de la Phycocyanine :**

Les groupements prosthétiques de la phycocyanine représentent 4% de la masse de l'algue, soit 16 chromophores par unité de masse moléculaire (Dalton) sachant que la masse moléculaire du monomère de phycocyanine est de 37468,5 Da (détermination par ionisation par electrospray couplée a une spectrometrie de masse).

Ce monomère est composé de deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de taille respective de 18186,56 et 19281,94 Da, et de trois chromophores de phycocyanobiline attachés a la sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha$  84) et a la sous-unités  $\beta$  ( $\beta$  84,  $\beta$  155) .

La phycocyanine peut se retrouver sous forme de mélanges complexes d'agrégats en tant que trimère ( $\alpha\beta$ ), hexamère ( $\alpha\beta$ ) et dodécamère ( $\alpha\beta$ ).

Selon le pH, la force ionique, la température et la concentration en protéines, la quantité relative de ces agrégats est variable.

En général, la structure de la phycocyanine chez *Spirulina platensis* est formée de l'association de deux hexamères qui se font face formant une unité asymétrique .

Au total sur cette unité asymétrique, 36 chromophores de phycocyanobiline sont liés par un pont thioéther à la partie protéique .

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

# **CHAPITRE 1**

## **MATERIELS ET**

## **METHODES**

## 1. Extraction de phycocyanine à partir de la *Spiruline* provenant de la station de Bnisafe au sein de l'école de la pêche.

L'objet des travaux étant d'une part l'obtention d'une bonne masse de la phycocyanine extraite à partir de la *Spiruline* provenant de la station de Bnisafe l'Ouest Algérien.

Les travaux porteront ainsi sur une comparaison du rendement d'extraction de la souche de l'ouest tout en préservant d'une part, ses qualités intrinsèques, et d'autre part, de pouvoir déduire après, la méthode optimale en termes de rendement.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Préparation du matériel végétal :

La *Spiruline* est actuellement produite dans son environnement naturel école de la pêche, région de Bnisafe, l'Ouest de l'Algérie. Sa production artisanale et expérimentale dans un bassin est actuellement maîtrisée (Hiri, A), 2013. Après ensemencement du bassin, nous avons récolté la *spiruline* en janvier 2023. Les feuilles de la plante sont ensuite séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et l'humidité pour des analyses ultérieures. Un laboratoire d'extraction suivant les normes les plus strictes (norme ISO 22000 centrée sur la sécurité des aliments et la traçabilité).



**Figure 08 : matériel végétale et les différents réactifs biochimiques (cliché seklalatika et ben aissa souad, 14.mai.2023 ).**

## 2.2. Méthodes

### 2.2. 1 Les méthodes d'extraction de phycocyanine réalisées :

#### a). Par l'eau :

Une suspension de 4 % de *Spirulina* dans l'eau a été préparée à l'obscurité. On décante la solution, ensuite, on prélève la solution bleue, puis une centrifugation (9000 tours/15 min) à 4°C. On prélève le surnageant et on le dilue d'un facteur de 100 environ avec de l'eau. On mesure la densité optique à 615 nm, 652 nm, 620 nm et 280 nm. Soit DIL ce facteur de dilution en volume.

Le calcul du % en phycocyanine est réalisé selon la formule suivante :

$$1.873 \times (DO_{620} - 0.474 \times DO_{652}) = DIL/C$$

C : % de la concentration de *Spiruline* sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %

**La pureté de phycocyanine est égale à  $DO_{620}/DO_{280}$  (M'Baye et al. 2011).**



**Figure 09: extraction par l'eau (cliché seklalatika et ben aissa souad, 14.mai.2023).**

#### b). Par sonification :

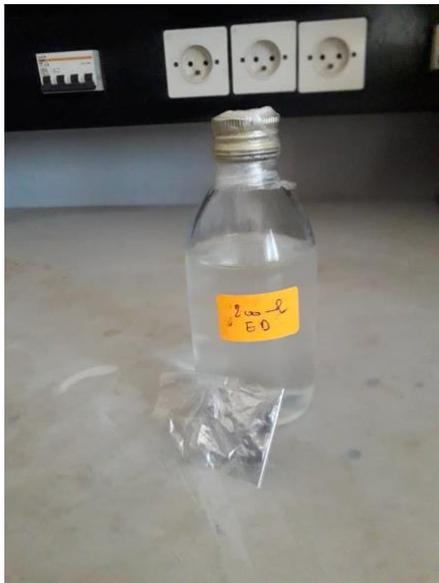
On met 10 mg de *Spiruline* en suspension dans 100 ml de tampon, la solution est mise sous l'action de l'ultrason pendant 5 min. Ensuite, une centrifugation (9000 tours/15min à 4°C). On prélève le surnageant et on ajoute de nouveau au culot 100 ml de tampon et on le remet à l'action de l'ultrason pendant 2 à 3 min, puis centrifuger afin de prélever le surnageant et le mélanger avec le premier et mesurer les DO à 615, 652, 620 et 280 nm. Enfin, on calcule le pourcentage en phycocyanine par la formule de Bennett and Bogorad (1973) :  $PC = [DO_{615} - 0.474 \times DO_{652}] / 5.34$ . La pureté de phycocyanine par la formule :  $DO_{620}/DO_{280}$  Avec DO à 620 nm indiquant la concentration de phycocyanine DO à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

### .c) Par congélation :

On met 100 mg d'algues secs dans 200 ml de tampon. La solution subit des cycles de congélation/décongélation (congélation à -20°C) jusqu'à l'éclatement de cellule. La solution obtenue sera centrifugée. Au surnageant, on ajoute 20% de saturation de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et on le laisse reposer 2 heures puis une deuxième centrifugation. Au surnageant obtenu, on ajoute 45% de saturation de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et une troisième centrifugation est effectuée directement. Enfin, on récupère le culot.

Une lecture de DO a été effectuée à 615nm, 620nm, 652nm et 280nm.

$$PC \text{ (mg/ml)} = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 5.34 \quad \text{Pureté} = DO_{620} / DO_{280} \text{ (Li et al., 2001)}$$



**Figure 10 : extaration par congélation (cliché seklalatika et Ben aissa Souad,14.mai.2023).**

### d). Par solvant :

On verse 4 g de *Spirulina* dans 120 ml du tampon phosphate, au début on l'incube à l'obscurité à 4 °C pendant 12h (pour permettre la lyse des cellules à l'hypotonie de mise), puis centrifuger pour la première fois et récupérer le surnageant bleu. Ensuite, on ajoute 120 ml du tampon phosphate au précipité et incubé 12h à l'obscurité. Après la deuxième centrifugation, les deux surnageants sont mélangés afin de lire la densité optique à 615nm, 652nm, 620nm, 280nm. Le calcul du pourcentage en phycocyanine et de sa pureté est basé selon les équations suivantes (Chen et al, 2006) :  $PC \text{ (mg/ml)} = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / .34$   $Pureté = DO_{620} / DO_{280}$  NB : on a changé le PH de la solution tampon (PH=7 et PH=8) pour ces trois méthodes (sonification, congélation et extraction par solvant) et nous avons comparé le rendement d'extraction. Préparation de 0.1 M phosphate de potassium buffer à 25°.

### **e) Par séparation aqueuse à double phase :**

Une solution de *Spiruline* de 90 % est préparée à l'obscurité on lui rajoute une solution de 40% PEG (w/w) : 40 g PEG dans 60 g d'eau ensuite une solution des sels 20% (W/W) : 10 g de  $K_2HPO_4$  + 10 g de  $KH_2PO_4$  dans 60 g d'eau (on a utilisé une solution glucosée à 20% et on a comparé le rendement d'extraction) (Bulgariu et Bulgariu 2008). En se référant à la méthode d'Albertson (1994), on a prélevé 1 g de 40 % (W/W) PEG + 1.25 g de 20 % (W/W) sels + 0.5 g spiruline + 2.25 g d'eau. Puis, après mélange, ce dernier est mis à l'obscurité sous une agitation pendant 20 min à l'aide d'un shaker.

Ensuite, centrifugation, mesure de volumes des phases, lecture de la densité optique à 620nm, 652 nm, 615 nm, 280 nm et calcul du pourcentage en phycocyanine et sa pureté par les équations suivantes :

$$PC (mg/ml) = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 4.34 \quad \text{Pureté} = DO_{620} / DO_{280} \text{ (Albertson et Tjerneld, 1994)}$$

### **f) Extraction par le glycérol:**

On mélange 800 g de poudre de *Spiruline* algérienne dans 10 kg de glycérol. On laisse macérer pendant 15 j à température ambiante à l'obscurité. Une filtration frontale lente est ensuite effectuée, avec un filtre compatible alimentaire (exemple pris : un filtre en nylon) d'une finesse de 25 microns, sachant que la finesse du filtre doit être comprise entre 2 et 50 microns).



**Figure 11 : extraction par glycerol(cliché par Seklalatika et Ben aissa Souad,14.mai.2023)**

### **3. Caractérisation de la phycocyanine extraite par la meilleure méthode d'extraction en termes de rendement.**

## 1. Conservation de phycocyanine

La conservation de phycocyanine était faite par lyophilisation.

### a) Polyphénols totaux

On fait diluer l'extrait de la phycocyanine, puis on met 0,5 ml de chaque dilution dans des tubes à essai pour chacune d'elles. On ajoute 5ml d'eau distillée et 0.5 de réactif de folin à 10%. Après 3 mn on ajoute 0.5ml de carbonate de sodium 20%. La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure à l'obscurité. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage.

### b) Flavonoïde

A 1 ml d'extrait de phycocyanine, on ajoute 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % pour chacune d'elles . Après 10 mn, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes contenus dans les extraits est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

### c) L'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été déterminée par le DPPH :

Au départ, on prépare la solution de DPPH : 12 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol et on l'incube pendant 30 mn à l'obscurité à 4°C avec agitation (cette solution doit être préparée 2 heures avant l'essai, elle reste stable 5 jours à l'obscurité à 4 °C). De la solution précédente on prélève 3 ml pour faire la dilution dans 7 ml de méthanol. Puis, on prend 0.21 ml de l'extrait de phycocyanine dans 1.94 ml DPPH diluées et l'incubées à l'obscurité pendant 30 min à 20°C pour lire la densité optique à 517 nm puis on calcule l'activité antioxydante pour chacune d'elles par la formule suivante : **Delta-DPPH = ADPPH – [A<sub>517</sub>] simple**

L'activité antioxydante a été calculée en se basant sur la courbe d'étalonnage obtenue, et en utilisant l'acide ascorbique comme standard(**Brand-Williamset al, 1995**).



**Figure 12 : Conservation de phycoerythrine (cliché par Seklalatika et Ben aissa soud,14.mai.2023).**

# **CHAPITRE 2**

## **RESULTATS ET INTERPRITATIONS**

### **1. Extraction de phycocyanine**

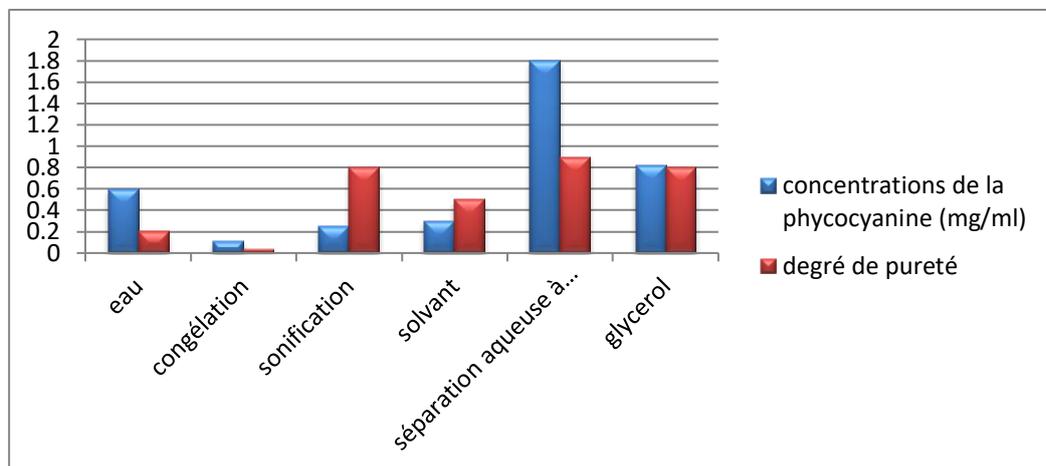
Les concentrations de phyco cyanine obtenues pour la souche algérienne selon les différentes méthodes d'extractions sont représentées dans le tableau 2.

**Tableau 8 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline et en fonction du mode d'extraction.**

	Concentrations de la phyco cyanine(mg/ml)	Degré de pureté
<b>Eau</b>	0,6	0.20
<b>Congélation</b>	0,11	0.03
<b>Sonification</b>	0,25	0.80
<b>Solvant</b>	0,30	0.50
<b>Séparation aqueuse à double phase</b>	1,8	0.90
<b>Glycerol</b>	0,825	0.80

Nous remarquons que la concentration en phyco cyanine de la *Spiruline* pour la souche de l'ouest algérien varie entre 0.06-0.825 mg/ml. Un effet significatif du lieu et méthodes de production sur la concentration d'extraction est observé, et ce quel que soit la méthode d'extraction utilisée.

Nous avons regroupé les différentes concentrations et les rapports de pureté selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 13 :



**Figure 13: Concentrations et pourcentages de pureté de la phyco cyanine de la souche de *Spiruline*.**

On remarque également que l'extraction par séparation aqueuse à double phase a donné des concentrations supérieures en C-phycoyanine comparativement aux autres méthodes (eau) pour la souche algérienne (1.8vs 0,6 mg/ml).

Concernant la pureté, l'extraction par la séparation aqueuse à double phase a donné des valeurs de pureté supérieures aux autres méthodes (par sonification, par solvant) (0.90 vs 0.25) et (0.90 vs 0.30).

Une pureté de C-phycoyanine de 0.7 est considérée comme grade alimentaire, 3.5 comme grade réactive, par contre si elle est supérieure 4, elle est considérée comme grade analytique. Ces valeurs indicatives permettent d'affirmer que cette extraction est de l'ordre alimentaire. Un effet significatif sur le lieu de production sur le degré de pureté est observé, et ce quel que soit la méthode d'extraction utilisée.

Toutefois ont trouvé une pureté de 0.79 et une concentration de phycoyanine de l'ordre de 2.67 mg/ml par une extraction aqueuse à double phase alors que (Henrikson,2009) ont obtenu par la même méthode une pureté de 5.1 et une concentration de phycoyanine de l'ordre de 1.11 mg/ml.



**Figure 14 : extraction par  
Congélation**



**Figure 15 : extraction par l'eau**

(cliché par Seklal atika,14 mai 2023)

## **2. Extraction par macération avec le glycerol :**

A la fin de la filtration, nous avons obtenu avec la *Spirulina* de l'ouest algérien environ 3,5 l de filtrat et 6,5 l de retentât et une concentration de phycoyanine de l'ordre de 0,825 mg/ml avec une pureté de l'ordre de 1,87. Ces valeurs pourraient être liées aux conditions de culture, au climat, à la souche mère, ou encore aux moyens de séchage. Le filtrat qui contient la phycoyanine est conditionné en flacons multi doses.



**Figure 16:extraction par macération avec le glycerol(cliché par Seklalatika et Ben aissa souad,14 mai 2023).**

### 3. Caractérisation de phycocyanine

**Tableau n°9 : Les Caractérisation de phycocyanine**

<p><b>Poly phénols totaux :</b></p>	<p>On remarque que la concentration des polyphénols totaux est comprise entre 0.6 et 1.8 mg/g de matière sèche pour la souche algérienne. Les phycocyanines sont riches en polyphénols. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par(Danesi,E.D.G,2011) à 4,9 µg/g).</p>
<p><b>Les Flavonoïdes :</b></p>	<p>La concentration la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par séparation aqueuse de double phase pour la souche de l'ouest algérien et 1.8 mg/g.</p>
<p><b>L'activité anti oxydante :</b></p>	<p>Nous avons obtenu une activité à hauteur de 0,6% pour la souche algérienne. ont obtenu une activité antioxydante variant de 0,17 à 51,94% selon que la concentration de <i>Spiruline</i> varie de 0,3 à 15 mg/ml.</p>

## APPENDICE A

### 1. Composition du milieu solide pour isoler la *Spiruline*

Eau distillé :	1000 mL
Agar agar :	20 mg
Nitrate de sodium :	2,5 g
Glucose :	1g
Peptone :	1g

Le pH est ajusté à 10.

### 2. Composition du milieu de Hiri (pour 1 L d'eau distillée)

Bicarbonate de soude (NaHCO <sub>3</sub> )	16
Chlorure de sodium (NaCl)	1
Phosphate d'ammonium (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,1
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> )	0,01
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	0,1
Sulfate de potassium (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,5
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	0,1
Urée azotée CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,1

### 3. Composition du milieu N1

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	2 g pH ajusté à 10

### 4. Composition du milieu N2

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	8 g pH ajusté à 10

## **5. Composition du milieu N3**

Eau distillée 100 mL ;

Bicarbonate de sodium : 15 g

pH ajusté à 10

## **Les tests d'identification**

### **1. Etude macroscopique**

Ce test consiste à une observation directe à l'œil nu des colonies obtenues sur milieux MRSc. Il permet de renseigner sur la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'opacité, le contour et la couleur des colonies étudiées.

Les colonies blanchâtres, rondes ou lenticulaires à contour régulier sont retenues.

### **2. Etude microscopique**

L'examen microscopique apparaît comme la première étape de l'étude d'une bactérie. (Guiraud, 1998), il comprend :

#### **3. Etat frais**

Cet examen permet d'apprécier la forme et la mobilité des germes étudiés. Il faut éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec les mouvements de convection susceptibles de l'entraîner.

Il consiste à examiner les microorganismes vivants entre lame et lamelle. Une goutte de suspension bactérienne est déposée au centre de la lame, puis une lamelle déposée au-dessus en évitant la création des bulles d'air.

#### **4. . Etat frais**

Cet examen permet d'apprécier la forme et la mobilité des germes étudiés. Il faut éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec les mouvements de convection susceptibles de l'entraîner.

Il consiste à examiner les microorganismes vivants entre lame et lamelle. Une goutte de suspension bactérienne est déposée au centre de la lame, puis une lamelle déposée au-dessus en évitant la création des bulles d'air. L'observation se fait par microscope optique aux grossissements (Gr : 100 .1, 25 . 10 . 0,2

## Les analyses microbiologiques sur la *Spiruline*

### 1. La préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique (N° 01.98.51)

Préparation de la suspension-mère de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.

Préparation, si nécessaire de dilutions décimales qui permettent, après ensemencement et incubation des milieux de culture :

- a) **Dans le cas des boîtes**, il faut effectuer un dénombrement valable des colonies (existence de boîtes comportant entre 30 et 300 colonies et pour certains groupes, tels les coliformes, entre 15 et 150 colonies).
- b) **Dans le cas des tubes**, il faut disposer d'un nombre suffisant de tubes montrant un développement bactérien et des tubes sans culture, de manière à ce que le calcul du nombre le plus probable à l'aide des tables, puisse être réalisé.

Les prises d'essai sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de deux facteurs essentiels à savoir :

- Le nombre de pièces soumises à l'analyse
- Les opérations analytiques à conduire

### c. Suspension mère et dilutions décimales

Introduire aseptiquement 10 grammes de produit à analyser dans un sachet stérile de type « Stomacher» contenant au préalable 90 mL de diluant soit le TSE (tryptone sel eau), Homogénéiser. Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/10 ou 10<sup>-1</sup>.

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la DM dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant. Cette dilution est alors au 1/100 ou 10<sup>-2</sup>.

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la dilution 10<sup>-2</sup> dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant ; cette dilution est alors au 1/1000 ou 10<sup>-3</sup>.

### 2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (NF V 08-051, 2003)

La Flore Mésophile Aérobie Totale est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit. Ce dénombrement se fait en milieu solide (PCA) après incubation en aérobiose à 30 °C.

#### ***a) Principe***

Inoculation en profondeur d'un milieu de culture (PCA), coulé dans une boîte de pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, inoculation d'autres boîtes avec des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes s'effectue à 30°C, en aérobiose pendant 72h.

A partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de pétri retenues, nous calculons le nombre de microorganismes par mL ou par gramme de l'échantillon analysé.

#### ***b) Lecture et dénombrement***

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse. Il s'agit de compter les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

### **3. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux-méthode par comptage des colonies (ISO 4832, 2006)**

#### ***a. Principe***

Préparation de trois boîtes de Pétri, en utilisant un milieu VRBL et une quantité spécifiée de suspension mère.

Incubation des boîtes à 30 °C ou 37 °C pendant 24 h et Comptage des colonies caractéristiques.

Le calcul du nombre de coliformes par millilitre est réalisé à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boîte de Pétri.

#### ***b. Dénombrement***

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes de Pétri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies.

Procéder au comptage des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0,5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

#### **4. Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices (XPV 08-601, 2005)**

##### ***a. Principe***

Inoculation en profondeur du milieu gélosé tryptose sulfite à la cyclosérine exempt de jaune d'œuf, coulé dans une boîte de Pétri ou dans un tube, avec une quantité déterminée de la suspension-mère.

Recouvrement avec une couche du même milieu lorsque l'essai est effectué en boîte de Pétri.

L'incubation des boîtes se fait à 46 °C en anaérobiose pendant 20 h ± 2 h suivie à dénombrement des colonies caractéristiques (entourées d'un halo noir).

##### ***b. Comptage des colonies***

Choisir la ou les tubes contenant moins de 30 colonies caractéristiques et moins de 100 colonies au total et compter les colonies caractéristiques.

#### **5. Recherche des *Staphylococcus aureus* (NFV 08-052)**

Inoculation en surface d'un milieu de culture gélose sélectif Chapman, coulé dans une boîte de Pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

L'incubation des boîtes est à 37 °C, en aérobiose pendant 24h à 48h.

Le calcul du nombre de staphylocoques par mL ou par gramme d'échantillon se fait à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilutions donnant un résultat significatif.

##### ***a. Lecture***

Seront considérés comme positives, les boîtes contenant des colonies caractéristiques à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide.

#### **6. Dénombrement des levures et moisissures ; technique par comptage des colonies à 25°C (C.A.C.Q.E. N° 01-97-61)**

##### ***a.Principe***

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif déterminé sabouraud, coulé dans trois boîtes de Pétri, avec une quantité définie de l'échantillon pour essai, si le produit est liquide, ou de la suspension mère pour les autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales des autres boîtes, obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère. Incubation de ces boîtes en aérobiose à 25° C pendant 3, 4 ou 5 jours.

Calcul du nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans des boites choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif.

### ***b. Lecture***

Compter les colonies sur chaque boîte après 3,4 et 5 jours d'incubation. Après 5 jours, retenir les boites contenant moins de 150 colonies. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, retenir les comptages obtenus après 4, ou même 3 jours d'incubation.

Expression des résultats

Le nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre est égal à :

C : est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées; n1 : est le nombre de boîtes comptées à la première dilution; n2:est le nombre de boites comptées à la seconde dilution; d :est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus.

Le résultat doit être exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10<sup>x</sup>, x étant la puissance appropriée de 10.

## **1. Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (ISO 6579, 2002)**

### ***a. Principe***

La recherche de *Salmonella* nécessite trois phases successives.

### ***b. Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide***

Ensemencement de la prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée à température ambiante, puis incubation à 37°C ± 10C pendant 18 h ± 2 h.

### ***c. Enrichissement en milieux sélectifs liquides***

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) et d'un bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture obtenue ci-dessus.

Incubation du bouillon RVS à 41,5 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h et du bouillon MKTTn à 37 °C ± 1 °C pendant 24 h ± 3 h.

#### ***d. Isolement et identification***

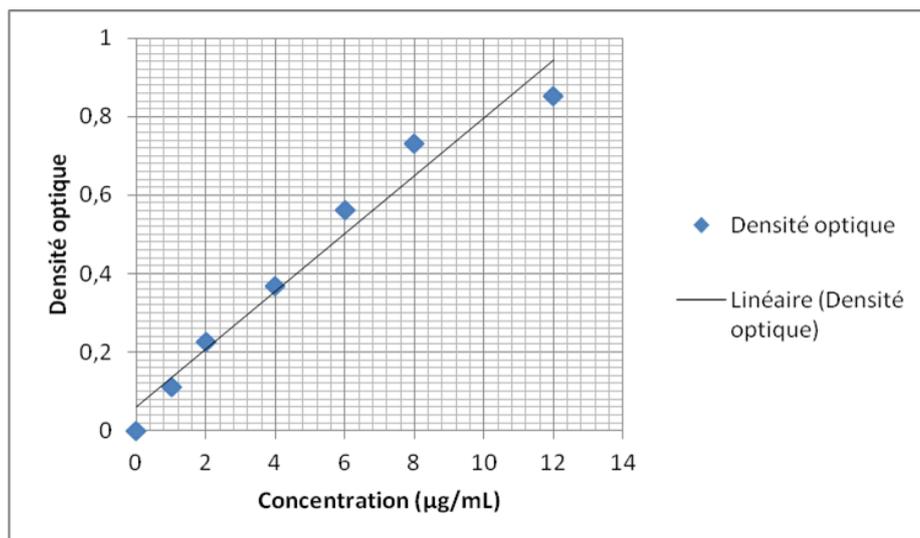
A partir des cultures obtenues, ensemencement de deux milieux sélectifs solides :

- Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD).
- Un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélose XLD permettant la recherche de Salmonella lactose positive, incluant Salmonella Typhi et Salmonella Paratyphi.

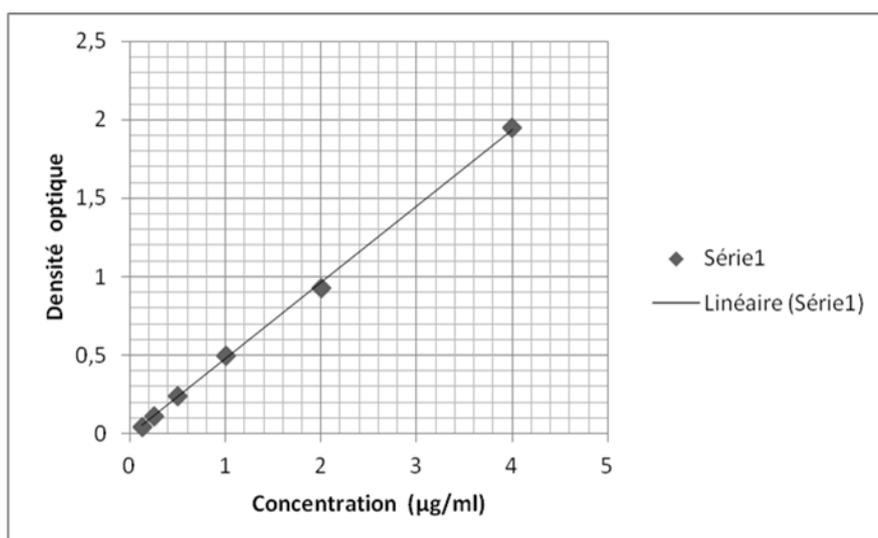
Incubation du milieu gélose XLD à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  puis examen après  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ . Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

l'observation se fait par microscope optique aux grossissements (Gr : 100 .1, 25 . 10 . 0,25)

## APPENDICE B : Courbe d'étalonnage des sucres pour dosage de glucose (anthron)



## Courbe d'étalonnage acide gallique



## **APPENDICE C : Titrage (acidité Dornic )**

Le matériel nécessaire est le suivant : un statif avec noix et pince, une fiole conique de 100 mL, une solution de NaOH N/9, une burette de 25 mL, une solution de phénolphtaléine à 1% dans éthanol. Remplir la burette de la solution de NaOH N/9. Régler le niveau au du liquide à zéro. Prélever 1 mL de la culture testé et transférer dans un bécher. Ajoute quelque goutte de phénolphtaléine et titrer jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante. Noter le volume de solution titrant utilisé en dixièmes de millilitres. Nombre de dixièmes de millilitre de NaOH=1°D.

Les résultats sont exprimés selon la relation : Acidité= VNaOH 10

VNaOH: Volume de la souche coulé pour neutraliser l'acidité (Bourgeois et al ., 1996).

# Conclusion

## Conclusion :

Notre étude avait pour objectif la comparaison entre les méthodes d'extraction de phycocyanine à partir de la *Spiruline* produite dans l'ouest de l'Algérie en vue d'une optimisation. Ces travaux nous ont permis de conclure que l'extraction par séparation aqueuse à double phase a donné des valeurs supérieures comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant). La *Spiruline* algérienne a donné 3,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de 0,82 mg/ml et une pureté de 1,87.

La caractérisation de la phycocyanine de souche algérienne a permis de déterminer en termes de rendement sa valeur nutritionnelle et thérapeutique en polyphénols, en flavonoides et surtout son activité antioxydante tant recherchée dans le domaine médical.

Il est à noter que la souche algérienne est en pleine culture et production à l'Ouest algérien, espace de soleil et d'eau de la chaleur et des sels minéraux. Sa production est simple à mettre en œuvre car la souche est maintenant disponible sur place.

Une caractérisation plus poussée de cette souche par les techniques de résonance magnétique (RMN) permettrait de lui donner sa valeur indicative pour des éventuelles valorisations principalement en cosmétique.

Ainsi après les étapes d'extraction où plusieurs méthodes ont été testées et la caractérisation de la souche, nous proposons la valorisation de cette phycocyanine dans le domaine de la cosmétique ou plusieurs étapes sont en cours d'élaboration.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

## RREFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Amed Ali Mlaraha 2011. Les conditions de réalisation de la culture de *Spiruline* : Cas de la région nord-ouest de Madagascar et Comores. Université de Mahajanga. p.15-17.
2. Albertson P.A, Tjerneld, F, 1994. Methods in enzymology. Volume 228. Aqueous two phase system. Edited by : Harry Walter, Göte Johansson. Academic Press, INC. London.
3. Ahounou, M. N., (2018). La *Spiruline*: un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation. (Thèse de doctorat). Université de Rouen.
4. Babadzhanov, A. S., Abdusamatova, N., Yusupova, F. M., Mezhlumyan, L. G. & Malikova, M. Kh. (2004). Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. Chemistry of Natural Compounds, 40, 276 – 279.
5. Barth & Léo (2019). Le Guide Complet de la Spiruline, Article scientifique. Repéré à <https://naturalathleclub.com/spruline/>.
6. Boudaoud. S 2016 : L'incorporation de la *Spiruline* sur les qualités nutritionnelles, organoleptiques et technologiques du couscous artisanal. Mémoire de master en Technologie des industries agro-alimentaires, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
7. Brand-wiliams, W, Cuvelier, M.E, Berset, C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und –technologie/Food Science and Technology, 28, 25-30.
8. Bulgariu, L, Bulgariu, D, 2008. Cd (II) extraction in PEG (1550)-(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system using halide extractant. J.Serb.chem.Soc. 73(3)341-350.
9. Charpy, L., José, Langlade, M. J. & Alliod, A. (2008). La *Spiruline* peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Repéré à [http://www.placton-du-monde.org/fileadmin/documents/IRD\\_spiruline\\_atout\\_developpement\\_afrique.pdf](http://www.placton-du-monde.org/fileadmin/documents/IRD_spiruline_atout_developpement_afrique.pdf).
10. Cheong, S. H., Kim, M. Y., Sok, D. E., Hwang, S. Y., Kim, J. H., Kim, H. Y., ... Kim, M. R. (2010). *Spirulina* prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo), 56(1), 34 – 40. Doi : 10.3177/jnsv. 56.34.
11. Cnerna-Afssa, coordinateur Martin, A. (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris : Lavoisier. 28.
12. Chen, T, Wong, Y.S, Zheng, W, 2006. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. Phytochemistry 67, 22. 2424-2430.
13. Cruchot, H., 2008. La *spiruline* bilan et perspectives ; Thèse de doctorat en pharmacie N° 25.08.15. Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon. Université de Franche-Compte.
14. Durand-Chastel (1999) Production of *Spirulina* biomass rich in gamma-linolenic acid and sulfolipids Marine Cyanobacteria NS19 (dissem), pp.541-546 in Bull. Inst. Océanogr. (Monaco).

15. Dourdouridjihane et karouiithar et Dardouriyousra, 2022.étude comparative des valeurs nutritionnelles de *Spiruline* cultivée dans des régions différentes en algérie. Université echahidhemmalakhdar. El oued. P2
16. Densi, E.D.G., Rangel-yagui, C.O., sato,S,joaomonteiro de carvalho,J.C.,2011. Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. Brazilian journal of microbiology.42:362-373.
17. Fox, R. D. (1999). *La Spiruline*, technique, pratique et promesse. Aix-en-Provence, France : Édisud.
18. Falquet, J. (1996). *Spiruline*, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologie, 22.
19. Falquet, J. &Hurni, J. P. (2006). *Spiruline*, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologie, 41.
20. Furmaniak, M. A., Misztak, A. E., Franczuk, M. D., Wilmotte, A., Waleron, M.&Waleron, K. F. (2017). Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. *FrontMicrobiol*,8, 2541.10.3389/fmicb.2017.02541.
21. Handelman G.J., van Kuijk F.J., Chatterjee A., Krinsky N.I. (1991),,,,"Characterization Ofproducts formed during the autoxidation of beta-carotene". *Free RadicBiol Med.*,10:427-437.
22. Habib, M.A.B ., Parvin, M ., Huntington, T.C ., Hasan, M.R . (2008). A review on culture production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish .FAO Fisheries and Aquaculture Circular , 1034 , 360.
23. Henrikson, R., 2009. Earth Food *Spirulina*. How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet. RonoreEnterprises, Inc., Hana, Maui, Hawaii. www.spirulinasource.com 3.
24. Jourdan, J.P. (2012). Cultivez votre spiruline. Manuel de culture artisanale .Publication Antenna Technologies.
25. Girardin-Andréani C. *Spiruline* :système sanguin, système immunitaire et cancer. *Phytothérapie*.2005 ;4 :p.158-161.
26. Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L. &Chamorro-Cevallos. G. (2015). Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina (Arthrospira)*. *NutriciónHospitalaria*, 32(1), 34 – 40. doi: 10.3305/nh.2015.32.1.9001.
27. Gupta, M., Dwivedi, U. N., Khandelwal, S., 2011. C-phycoyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin; *toxicology letters*, 204. 2-11.
28. GanapathiPatil, K.S. Raghavarao M.S. 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34. 156–164.
29. Lounici, S. (2010). Caractérisation de la *Spiruline* : *Spirulinahtam*, optimisation de ses conditions de culture et application industrielle. Blida.
30. Laurent, I. (2019).La *Spiruline(Spirulinaplatensis)*, de l'aliment au médicament :utilisations et conseils à l'officine. (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.
31. Le Guehennec, J. (2009). *La Spiruline*. Terre d'hommes, 180.
32. Lee, J. B., Srisomporn, P., Hayashi, K., Tanaka, T., Sankawa, U. & Hayashi, T.(2001). Effects of structural modification of calcium *Spirulin*, a sulfatedpolysaccharide from

- Spirulina platensis*, on antiviral activity. Chemical AndPharmaceutical Bulletin, 49, 108 – 110.
33. Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C. Colla. E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(3), 724 – 732. doi: 10.1002/jsfa.7987.
  34. Li, L., Zhang, J., Jiang, T., Guo, B., Chang, W. Liang, D. 2001. Purification, crystallization and preliminary crystallographic investigations of selenium-containing phycocyanin from selenium-rich algae (*Spirulina platensis*). Science in China, 44, (4), 337-344.
  35. LafriMène. 2018. Optimisation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la *Spiruline* HTAM. Université de Blida 1. p.53-58.
  36. Leonard J. et Compere P. *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en protéines. 1967; 37 (1): p. Suppl. 23 p.
  37. Manet, A. (2016). La *Spiruline*: indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine. (Thèse de doctorat). Université de Grenoble Alpes.
  38. Mehrez amel.2021, contribution de l'étude de l'activité biologique du phycocyanine extrait d'*Arthrospira platensis* (*Spirulina foxybehatam*). Université echahidhemmalakhdar. El oued. P2.
  39. M'Baye, B.K, LO, B.B, Bassene, E, 2011. Etud des carotenoides, des phycocyanines et des protéines de la *Spiruline* en Mauritanie. ScienceLib Edition Mersenne, 3, (110906). ISSN 2111.4706pp.
  40. Nutrixéal info. (2020). Xanthophylles. Repéré à <https://nutrixéalinfo.fr/index/xanthophylles-carotenoides/>.
  41. Proy, M. (2019). La *Spiruline* et son utilisation à l'officine. (Thèse de doctorat). Université de Picardie Jules Verne.
  42. Paniagua-michel J., Dujardin E. et Sironval C.(1993) : Le Tecuitlal, concentré de *Spiruline* source de protéines comestibles chez les Aztèques. Cahiers de l'Agriculture ;2 :p.283-287.
  43. Ravelo.v., 2001.-Bioécologie, valorisation du gisement naturel de *Spiruline* de Belalanda (Toliara, Sud-Ouest de Madagascar), et technologie de la culture.Thèse de doctorat de 3° cycle en Océanologie appliquée.IHSM Toliara. Madagascar :160 pp.
  44. Société Chimique de France. (2018). Chlorophylles. Repéré à <http://www.societechimiquedefrance.fr/chlorophylles.html>.
  45. Tsarahevitra, j . (2005). Adaptation de la *Spiruline* du Sud de Madagascar a la Culture en Eau de Mer . Mise au Point de Structures de Production a l'Echelle Villageoise .Thèse de Doctorat Es Sciences en Océanologie Appliquée , Université de Toliara.
  46. Vascular endothelial 49 cells: Enhancement of plasminogen activator activity. Journal of Health Science, 49, 405 – 409.
  47. Vonshak A., 2002 :*Spiruline platensis* (Arthrospira) :Physiology,Cell-biology and Biotechnology,p 1-17.
  48. Vasson, M. P. (2015). Compléments alimentaires : les clés pour les conseiller à l'officine.Paris-La Défense : Le Moniteur des pharmacies.
  49. Vidalo, J. L. (2008). *Spiruline* : l'algue bleue de santé et de prévention. Paris : Edition du Dauphin.

50. Vidé, J. (2015). Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et antiinflammatoire d'un apport nutritionnel de *Spirulines* enrichies en silicium. (Thèse de doctorat). Université de Montpellier.
51. Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), 1266 – 1274.
52. Xue, C. H., Hu, Y. Q., Saito, H., Zhang, Z. H., Li, Z. J., Cai, Y. P., ... Imbs, A. B. (2002). Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9 – 13.
53. Yamamoto, C., Nakamura, A., Shimada, S., Kaji, T., Lee, J. B. & Hayashi, T. (2003). Differential effects of sodium spirulan on the secretion of fibrinolytic proteins from.

