

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur et Master en Sciences
de la Mer

OPTION : Biotechnologie marine

**Extraction et identification des pigments de micro-
algues à usage alimentaire et pharmaceutique**

Présenté par :

KHAROUBI Kaouthar

TELIDJI Lilia

Soutenu le 31 /10/ 2021 devant le jury composé de :

M^{me} BOURABAIN F.	Maitre assistante A (ENSSMAL)	Présidente
M^{me} AMROUCHE L.	Maitre assistante A (ENSSMAL)	Examinatrice
M^{me} BENTCHIKOU L.	Maitre assistante A (ENSSMAL)	Examinatrice
M^{me} AISSOU-AKROUR C.	Maitre de conférences B (ENSSMAL)	Promotrice

Année universitaire 2020-2021

REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, nous remercions **Dieu** de nous avoir accordé la santé et les moyens de réaliser ce travail.*

Nous sommes très reconnaissantes envers tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration et la réalisation de ce mémoire, on voudrait témoigner toute notre gratitude à plusieurs personnes qui ont rendus possible cette reprise d'étude.

*A notre promotrice Madame **AKROUR AISSOU C.** pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion. Que ce travail soit le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.*

*A Madame **BOURABAIN F.** de nous faire honneur d'accepter la présidence de notre jury.*

*Nos vifs remerciements vont à Madame **AMROUCHE L.** et Madame **BENTCHIKOU L.** d'avoir examiné ce travail. Leur regard critique sur notre travail est important à nos yeux, on est honorées de partager avec elles ce moment solennel qui clôture nos études.*

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien qui nous a été accordé par l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL). Au niveau des laboratoires, Nous voudrions remercier tout le personnel de L'ENSSMAL et particulièrement les ingénieurs de laboratoire :

*Madame **GUERROUMI H.** Monsieur **DJERAI NourEdinne**, Monsieur **MATOUK Youcef** pour leur précieuse aide et leurs caractères humains,*

Nous tenons aussi à remercier l'équipe du laboratoire de Saida pour leur précieuse aide

*Un grand merci à **nos parents** qui nous ont soutenues, encouragées et aidées tout au long de notre cursus.*

DEDICACE

Grâce à **DIEU** miséricordieux que j'ai pu achever ce travail.

Avec tous mes sentiments les plus chaleureux et sincères, je dédie ce travail.

A

La mémoire de **mon père Abdallah** qui nous a quitté trop tôt, qu'**ALLAH** l'accepte dans son Paradis éternel.

Ma mère, Mon modèle de femme, la prunelle de mes yeux, la battante qui a tout fait pour que je réussisse, voilà j'y suis mon diplôme est le tien maintenant chère maman, tu ma soutenue, m'a supportée et m'a comblée de ta bonté, que **DIEU** te procure bonne santé et longue vie.

Ma sœur adorée Amina et son mari Miloud, je vous souhaite beaucoup de bonheur incha **ALLAH**, **Karima et Yasmine**, mes autres sœurs dévouées je vous souhaite aussi réussite et bonheur dans la vie.

Ma grand- mère, notre matriarche mes tantes **Fatouma et Nacera** qui mon soutenues.

Mes chères amies Sarah Latifa, Rima et Sihem.

Ma chère Lilia, mon binôme et sa famille.

Mr. BRAHIMI Mustapha qui a consacré son temps pour m'aider, m'orienter et m'encourager.

Kaouthar

DEDICACE

Grâce à **DIEU** miséricordieux que j'ai pu achever ce travail.
Avec tous mes sentiments les plus chaleureux et sincères, Je dédie ce travail
A :

A mes parents : Papa, Maman. Ça y est, vous voyez enfin le bout de mes études. J'ai mis du temps mais j'ai grandi et je vais enfin devenir ingénieur. Tout ça, c'est grâce à vous, **MERCI**.
Merci de m'avoir supportée. Merci de m'avoir permis de faire les études que je souhaitais.
Merci d'être toujours là pour moi.

A Mes frères : Adnane, Riadh, Ramzi. Mes modèles, mon sang. Eux qui sont toujours là. Eux qui m'écoutent, me conseillent et que j'aime très fort.

A mon oncle Zakaria à qui je voue un profond respect : Tu m'as toujours soutenu, m'as orienté et cru en moi merci pour ta disponibilité à mes côtés et pour tes précieux et judicieux conseils.

A Mes deux familles paternelle et maternelle que j'aime beaucoup.

Aux Ingénieurs du labo Madame Houda et Monsieur Noureddine : Vous m'avez permis d'avoir de nouvelles visions et d'approfondir mes connaissances, je vous en remercie beaucoup.

A Mon Amie et binôme Kaouthar qui m'a vouée un énorme respect et avec qui j'ai beaucoup appris durant notre collaboration. Merci de m'avoir comprise !!

A mes collègues : (anciens et nouveaux) Certains sont devenus amis, d'autres m'ont permis d'avancer, d'évoluer, d'apprendre à leurs côtés. Ils ont fait ou font partie de ma vie. Merci d'avoir été là ou d'être là.

Lilia

LISTE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

LISTE DES TABLEAUX

LISTES DES FIGURES

ANNEXE

INTRODUCTION.....	1
I.Cyanobactéries : Premiers organismes photosynthétiques	5
I.1. Ecologie et biologie	5
I.2. Reproduction.....	6
II. Généralités sur la spiruline	6
II.1. Algue ou bactérie ?.....	6
III. Caractéristiques de la spiruline.....	7
III.1. Taxonomie d' <i>Arthrospira platensis</i>	7
III.2. Morphologie et caractères généraux d' <i>Arthrospira platensis</i>	8
III.3. Distribution géographique.....	9
III.4. Cycle biologique d' <i>Arthrospira platensis</i>	9
III.5. Reproduction	10
III.6. Culture de la spiruline	10
III.6.1. Bassin	10
III.6.2. Milieu de culture	11
III.7. Conditions chimiques de croissance	12
III.7.1. Eau.....	12
III.7.2. Salinité.....	12
III.7.3. Alcalinité	12
III.8. Conditions physiques de croissance	12
III.8.1. Température	12
III.8.2. Lumière	12
III.9. Etapes d'obtentions de la forme poudre	12
a. La récolte	13
b. La filtration	13
c. Pressage en pate.....	13

d.	Façonnement en spaghetti	13
e.	Séchage à basse température	13
IV.	Composition nutritionnelles de la spiruline	13
IV.1	Protéines	14
IV.2.	Lipides	15
IV.3.	Glucides	15
IV.4.	Acides nucléiques	16
IV.5.	Vitamines	17
IV.6.	Minéraux et oligoéléments	17
IV.7.	Enzymes	18
IV.8.	Pigments	18
IV.8.1.	Caroténoïdes	18
IV.8.2.	Chlorophylle	19
IV.8.3.	Phycocyanine	19
V.	Méthodes d'analyses	20
V.1.	Extraction des différents pigments de la spiruline	20
V.1.1.	Extraction des caroténoïdes	20
V.1.2.	Extraction de la chlorophylle	20
V.1.3.	Extraction de la phycocyanine	20
V.2.	Identification des différents pigments de la spiruline	21
V.3.	Dosage par spectrophotométrie des différents pigments de la spiruline	21
V.3.1.	Caroténoïdes	21
V.3.2.	Chlorophylle	22
V.3.3.	Phycocyanine	22
VI.	Evaluation de la qualité microbienne de la spiruline	23
VI.1	Flore mésophile aérobie totale	23
VI.2.	Flore fongique	23
VI.3.	Coliformes totaux	23
VII.	Activités thérapeutiques de la spiruline	24
VII.1.	Activité antioxydante	24
VII.2.	Activité antibactérienne	24
VIII.	Applications de la spiruline	25
VIII.1.	La spiruline et l'industrie agroalimentaire	25
VIII.2.	La spiruline et l'industrie pharmaceutique	25

VIII.3. La spiruline et l'industrie cosmétologique	26
----------------------------------------------------------	----

MATERIEL ET METHODES.....27

I. Matériel végétal.....	28
--------------------------	----

II. Analyses physico-chimiques de la poudre de spiruline.....	29
---------------------------------------------------------------	----

II.1. Détermination du potentiel d'hydrogène pH	29
-------------------------------------------------------	----

II.2. Taux d'humidité	29
-----------------------------	----

II.3. Taux de matière minérale (AOAC, 1980)	30
---------------------------------------------------	----

II.4. Taux d'acidité titrable.....	30
------------------------------------	----

III. Analyses quantitatives par Spectrophotométrie	31
----------------------------------------------------------	----

III.1. Extraction des pigments caroténoïdes	31
---------------------------------------------------	----

III.2. Extraction des chlorophylles (ZINGA <i>et al.</i> , 2016)	34
------------------------------------------------------------------------	----

III.3. Extraction de la phycocyanine	34
--------------------------------------------	----

III.3.1. Méthodes mécaniques	34
------------------------------------	----

III.3.1.1. Extraction à l'eau.....	34
------------------------------------	----

III.3.2. Méthodes chimiques.....	35
----------------------------------	----

III.3.2.1. Extraction par solvant.....	35
----------------------------------------	----

III.4. Dosage par spectrophotométrie des différents pigments de la spiruline	38
------------------------------------------------------------------------------------	----

III.4.1. Dosage des caroténoïdes	38
----------------------------------------	----

III.4.2. Dosage de la chlorophylle	39
------------------------------------------	----

III.4.3. Dosage de la phycocyanine	39
------------------------------------------	----

IV. Analyse qualitative spectrale	39
-----------------------------------------	----

IV.1. Identification des différents spectres des pigments de la spiruline	39
---------------------------------------------------------------------------------	----

IV.2. Identification des différents pigments de la spiruline par séparation sur couche mince (CCM)	40
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

IV.3. Séparation des pigments de la spiruline sur couches imprégnées par l'huile de paraffine (AISSOU, 2020).....	40
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

➤	Principe
.....	40

V. Evaluation de la qualité microbienne de la spiruline	41
---------------------------------------------------------------	----

V.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) selon la norme NFV08-051 (Anonyme, 1992 in AOUIR, 2017).....	41
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

V.2. Dénombrement de la flore fongique (FF).....	41
--------------------------------------------------	----

V.3. Dénombrement des coliformes totaux (CT)	41
----------------------------------------------------	----

V.4. Expression des résultats.....	42
------------------------------------	----

VI. Détermination des activités thérapeutiques de la spiruline	42
----------------------------------------------------------------------	----

VI.1. Activité antioxydante	42
-----------------------------------	----

VI.2. Activité antibactérienne	44
--------------------------------------	----

RÉSULTATS ET DISCUSSION46

I. Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de spiruline	47
-----------------------------------------------------------------------------	----

I.1. Potentiel d'hydrogène pH	47
-------------------------------------	----

I.2. Taux d'humidité.....	47
I.3. Taux de matière minérale.....	48
I.4. Taux d'acidité titrable	49
II. Dosage par spectrophotométrie des différents pigments de la spiruline	50
II.1. Caroténoïdes	50
II.2. Chlorophylle	51
II.3. Phycocyanine.....	52
III. Identification des différents pigments de la spiruline par absorption spectrale	56
III.1. Caroténoïde	56
III.2. Chlorophylle.....	58
III.3. Phycocyanine	59
IV. Identification des différents pigments de la spiruline par séparation sur couches imprégnées à l'huile de paraffine (CCM)	61
IV.1. Caroténoïdes.....	61
IV.2. Chlorophylle :	64
IV.3. Phycocyanine	67
V. Evaluation de la qualité microbienne de la spiruline	67
VI. Détermination des activités thérapeutiques de la spiruline	68
VI.1. Activité antioxydante	68
VI.2. Activité antibactérienne	70
CONCLUSION GENERALE	74
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76
ANNEXES.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Pourcentage des principaux acides gras de la spiruline modifiée. (AHOUNOU, 2018 ; FALQUET ET HURNI, 2006).....	15
Tableau 2 : Teneur en acides nucléiques de quelques aliments	16
Tableau 3 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10 g de matière sèche de <i>Spirulina platensis</i> (CHARPY <i>et al.</i> , 2008).....	20
Tableau 4 : Absorbances maximales des caroténoïdes (modifié)	22
Tableau 5 : Absorbances maximales des chlorophylles (modifié).....	22
Tableau 6 : valeurs de pH de la poudre de spiruline	47
Tableau 7 : Poids des creusets vides	48
Tableau 8 : Poids des creusets + échantillon.....	48
Tableau 9 : Poids des creusets + échantillon après 24heures.....	48
Tableau 10 : Taux d'humidité dans chaque creuset.....	48
Tableau 11 : Poids du creuset après combustion	49
Tableau 12 : Taux de matière minérale dans chaque creuset.....	49
Tableau 13 : Volumes titrés de NaOH en ml	49
Tableau 14 : Taux d'acidité titrable	49
Tableau 15 : Concentrations et absorbances des caroténoïdes pour le tracé de la courbe d'étalonnage.....	50
Tableau 16 : Lecture des absorbances de la chlorophylle.....	51
Tableau 17 : Absorbances de la phycocyanine extraite à l'eau	52
Tableau 18 : Absorbances de la phycocyanine extraite par le solvant	53
Tableau 19 : Absorbances de la phycocyanine extraite par séparation aqueuse à double phase (solution phosphate).	53
Tableau 20 : Absorbances de la phycocyanine extraite par séparation aqueuse à double phase (solution glucosée)	53
Tableau 21 : Valeurs des concentrations et des degrés de pureté de la phycocyanine selon les méthodes d'extraction.....	54
Tableau 22 : Pigments identifiés aux différentes longueurs d'onde.....	57
Tableau 23 : Les pigments des caroténoïdes correspondant aux différents RF du système méthanol/acétone/eau.	62
Tableau 24 : Les pigments des caroténoïdes correspondant aux différents RF du système méthanol/acétone.....	63
Tableau 25 : Les pigments des chlorophylles correspondant aux différents RF du système éluant méthanol/acétone/eau.	65
Tableau 26 : Les pigments des chlorophylles correspondant aux différents RF du système éluant méthanol/acétone.....	65
Tableau 27 : Dénombrement et recherche de la flore mésophile aérobie totale, la flore fongique et les coliformes totaux contenus dans la poudre de spiruline.....	67
Tableau 28 : Germes microbiens dénombrés dans l'échantillon de spiruline (UFC/g)	68
Tableau 29 : Concentrations et absorbances de l'extrait de la spiruline pour le tracé de la courbe d'étalonnage.....	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de cyanobactérie	5
Figure 2 : <i>Arthrospira platensis</i> observée au microscope	6
Figure 3 : Morphologie typique de spiruline (Source : Antenna technologie).....	9
Figure 4 : Cycle biologique de la spiruline selon (BALLONI <i>et al.</i> , 1980 in CHARPY, 2008)	10
Figure 5 : Composition de la spiruline	13
Figure 6 : Positionnement de la spiruline par rapport à d'autres aliments en termes de taux de protéines	14
Figure 7 : Emballage de la spiruline reçue	28
Figure 8 : Protocole d'extraction des caroténoïdes (VICTOR <i>et al.</i> , 1995 in SADOUN et BENYOUNES; 2005).	33
Figure 9 : Extraction de la chlorophylle	34
Figure 10 : Extraction de la phycocyanine à l'eau	35
Figure 11 : Extraction de la phycocyanine par solvant	36
Figure 12 : Extraction de la phycocyanine par séparation aqueuse à double phase.....	37
Figure 13 : Mesure du pH.....	47
Figure 14 : Poudre de spiruline après 24 h d'étuvage.....	47
Figure 15 : Creusets après combustion.....	48
Figure 16 : La solution de spiruline après titrage	49
Figure 17 : Pigment caroténoïde concentré	50
Figure 18 : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour les caroténoïdes. Erreur ! Signet non défini.	
Figure 19 : Extrait de la chlorophylle diluée	51
Figure 20 : Phycocyanine extraite par l'eau.....	52
Figure 21 : L'extrait de phycocyanine par l'extraction par solvant.....	52
Figure 22 : Phycocyanine extraite par la solution glucosée	53
Figure 23 : Concentrations (mg/ml) et degrés de pureté de la phycocyanine selon les modes d'extraction.	54

Figure 24 : Concentrations de la phycocyanine (mg/ml) et degré de pureté selon les modes d'extraction selon BOUDAIFA et SI BACHIR., 2020 (modifié).	55
Figure 25 : Spectre d'absorption des caroténoïdes.	56
Figure 26: Spectre d'absorption de la chlorophylle	58
Figure 27: Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par l'eau.....	59
Figure 28 : Spectre d'absorption de la phycocyanine par solvant	60
Figure 29: Plaques imprégnées à l'huile de paraffine après migration des différents pigments dans a) système éluant méthanol/acétone/eau et b) système éluant méthanol/acétone.....	61
Figure 30: Plaques imprégnées à l'huile de paraffine après migration des caroténoïdes dans :	62
Figure 31 : CCM après migration de la chlorophylle dans :	64
Figure 32: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Spirulina platensis</i>	69
Figure 33: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	70
Figure 34 : Les solutions de l'extrait de la spiruline à différentes concentration	70
Figure 35 : Aspect macroscopique de : a) <i>Staphylococcus aureus</i> et b) <i>E coli</i>	71
Figure 36: Résultats de l'activité antibactérienne de la spiruline contre : a) <i>E coli</i> et b) <i>Staphylococcus aureus</i>	72

ANNEXES

➤ Les Figures

Figure 1 : Structure chimique de quelques caroténoïdes (JUN, 2015).	86
Figure 2 : Structure chimique de quelques chlorophylles (FOLLY,2000).....	87
Figure 3 : Structure chimique et tridimensionnelle de la phycocyanine modifié (FERNANDEZ-ROJAS <i>et al.</i> , 2014).	87
Figure 4 : Phase aqueuse et organique obtenues	88
Figure 5 : Filtration de la phase organique	88
Figure 6 : Suspension de la spiruline avant et après centrifugation	89
Figure 7 : Solutions utilisées dans la séparation aqueuse à double phase de la phycocyanine.	89
Figure 8 : L'extrait sec des caroténoïdes avec l'hexane	90
Figure 9 : Solution de bichromate de potassium	90
Figure 10 : La gamme étalon.....	91
Figure 11 : Solution de DPPH.....	91

➤ Les Tableaux

Tableau 01 : RF des caroténoïdes sur des plaques imprégnées de Kieselgur (RANDERATH ., 1971).....	92
Tableau 02 : RF des chlorophylles sur des plaques imprégnées de triglycéride.....	92
Tableau 03 : Composition du milieu Sabouraud Chloromphénicol.....	92

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

ml : Millilitre

HIV-1 : Human immunodeficiency virus 1

HIV-2 : Human immunodeficiency virus 2

UI : Unité

SOD : Superoxyde dismutase

S : Spiruline.

AGL : Acide gamma-linolénique

PC : Phycocyanine

DO : Densité Optique.

Abs : Absorbance.

% : Pourcentage.

β : Beta.

α : Alpha.

ε : Gamma

λ : Lambda

g : Gramme.

Hrs : Heures.

CH₄N₂O : Cyanate d'ammonium (urée).

M : Mètre.

Min : Minute.

M.M : Matière minérale.

LBCM2 : Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire 02.

LBCM1: Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire 01.

Chl : Chlorophylle.

E. Coli : *Escherichia coli*.

ISO : Organisation internationale de normalisation

MH : Muller Hinton

CaCl₂ : Chlorure de calcium.

(NH₄)₂SO₄ : Sulfate d'ammonium.

LBPVB: laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosy et valorisation biologique des plantes.

DPPH: 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyle.

IC₅₀ : concentration d'inhibition (50%).



INTRODUCTION



INTRODUCTION

La biotechnologie marine ou dite bleue est un domaine qui recèle un énorme potentiel pour l'innovation et la croissance économique, elle peut donc irriguer de nombreux domaines d'application tels que la santé, la nutrition, l'agriculture, la cosmétique, l'énergie, l'industrie, l'environnement et l'aquaculture (BOYEN et JAOUEN ; 2015).

Les cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, sont des bactéries photosynthétiques qui produisent de l'oxygène. Elles présentent une très grande diversité morphologique. Le genre *Arthrospira* renferme des cyanobactéries filamenteuses, dont fait partie *Arthrospira platensis* plus connue sous le nom de Spiruline (SGUERA, 2008).

La spiruline est une cyanobactérie apparue sur terre, il y a plusieurs milliards d'années. Sa première utilisation au Mexique en XV Siècle a montré ses propriétés. Puis, employée pendant la seconde guerre mondiale, elle ne fut identifiée et analysée que dans les années 60 en Belgique. Début des années 80, elle fut commercialisée aux Etats-Unis (LOUVEL, 2019).

En Algérie, le docteur Hiri A en 1998 dans Tin Aman à Tamanrasset pour la première fois a isolé et purifié la spiruline (SEGHIR *et al.*, 2020).

La spiruline est une cyanobactérie, connue pour sa richesse en nutriments. En effet elle est composée de 55% à 70 % de protéines, 6% à 9% de matière grasse, de 15 % à 20 % de glucides et elle est riche en minéraux, vitamines, fibres et pigments : phycocyanine, chlorophylle et caroténoïdes (LAFRI, 2018). Vu cette richesse en nutriments la spiruline connaît aujourd'hui des vertus thérapeutiques telles que des activités sur le système immunitaire, lutte contre le cancer, le sida, le vieillissement cellulaire, comme elle a des propriétés anti-inflammatoires et hépatoprotectrices. La spiruline semble avoir donc un potentiel très vaste (SGUERA , 2008).

Elle présente aussi un double statut à la fois d'aliment et de complément alimentaire. Son statut de complément alimentaire est à l'origine de sa présence dans les officines (AHOUNOU, 2018).

Notre travail a pour objectif d'extraire les différents pigments de *Spirulina platensis* et les identifier. Une évaluation de la qualité microbienne de la microalgue ainsi que ses activités thérapeutiques telles que l'activité antioxydante et antibactérienne ont été réalisées

Après une description générale de la spiruline ainsi que les caractéristiques d'*Arthrospira platensis*, la composition nutritionnelle sera présentée, accompagnée d'une évaluation de sa qualité

microbienne ainsi qu'une synthèse des propriétés thérapeutiques de la spiruline, avant d'exposer brièvement ses différents domaines d'application.

La partie expérimentale de notre travail consiste en l'extraction et l'identification des différents pigments de *Spirulina platensis* et leur analyse quantitative, qualitative et microbiologique ainsi que les activités thérapeutiques de cette microalgue (antioxydante et antibactérienne).

On achève notre étude par une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenus et éventuellement des perspectives d'avenir.



**ETUDES
BIBLIOGRAPHIQUES**



I. Cyanobactéries, premiers organismes photosynthétiques

Plus anciens organismes sur la planète terre, apparues il y a des milliards d'années, les cyanobactéries également appelées Cyanophytes ou Cyanophycées sont des micro-organismes procaryotes (dépourvues de membrane nucléaire), possédant des thylakoïdes, siège de la photosynthèse, recouverts de granules protéiques associées à une partie pigmentaire. Cet ensemble constitue les phycobiliprotéines (**figure 01**). Outre la photosynthèse, ils assurent deux autres fonctions : la respiration et fixation de l'azote atmosphérique chez certaines espèces (DURAND, 1993 ; JARIOA, 2005), de même elles possèdent des caractéristiques :

- de bactérie : absence de noyau et d'organites intracellulaires.
- d'algue : présence de chlorophylle (capacité à faire la photosynthèse) et de phycobiliprotéines (pigments accessoires), tels que la phycoérythrine, la phycocyanine.... (VONARX, 2008).

Parmi les cyanobactéries les plus connues la spiruline : un petit être aquatique (0,3 mm de long), de nom scientifique « cyanobactérie *Arthrospira platensis* » (JOURDAN, 2006).

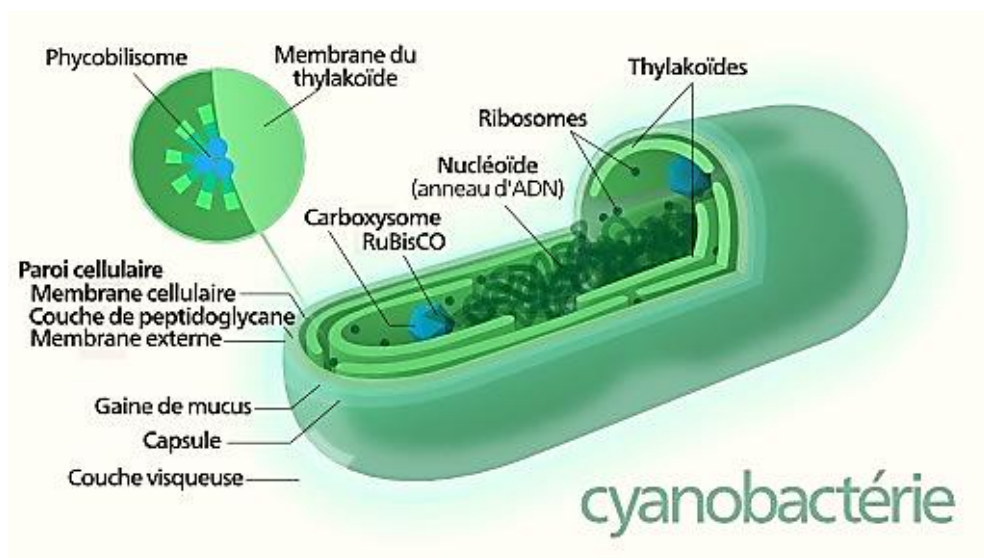


Figure 1 : Schéma de cyanobactérie

<http://data.abuledu.org/wp/?LOM=12592> [1]

I.1. Ecologie et biologie

Les Cyanobactéries sont partout, Elles peuplent aussi bien les neiges, les glaces des pôles et des montagnes que les eaux thermales les plus chaudes. Elles sont présentes également dans les sables des déserts, sur les parois des montagnes où elles subissent sans dommage froid extrême, insolation

et sécheresse. Elles croissent en mer comme en eau douce, dans les lagunes sursalées ou les marais salants, elles peuvent vivre dans les eaux polluées ou les vases riches en hydrogène sulfuré [2].

I.2. Reproduction

La Cyanobactérie se reproduit par division cellulaire, quoique certaines espèces filamenteuses produisent des fragments végétatifs spécialisés, appelés hormogonies. Ils servent de propagules végétatives et possèdent une multitude de vacuoles gazeuses assurant la flottaison et du coup leur propagation (HICKMAN, 2013).

La reproduction sexuée est inconnue chez les Cyanobactéries ; cependant, certaines cultures expérimentales de Kumar (*Nature*, 1962) et de Singh et Sinha (*Nature*, 1965) laissent présager l'existence de combinaisons para sexuelles rappelant celles qui existent chez les bactéries [2].

II. Généralités sur la spiruline

II.1. Algue ou bactérie ?

La spiruline est un organisme procaryote possédant un ARN ribosomal, aussi appelée cyanophycée ou arc-en-ciel car elle possède :

- Un pigment bleu : la phycocyanine.
- Un pigment vert : la chlorophylle (SOIZIC, 2019).

Le nom scientifique de la spiruline est *Arthrospira platensis*, une cyanobactérie filamenteuse (**figure 02**), à ne pas confondre avec *Siputlina subsalsa* qui est une cyanobactérie non comestible. Elles sont apparues sur terre il y a environ 3,5 milliards d'années il en existe environ 1500 espèces. Au cours du processus de la photosynthèse, elles sont capables de transformer le gaz carbonique en matière organique en dégageant de l'oxygène (SOIZIC, 2019).

Spiruline platensis se développe dans des conditions alcalines élevées, elle est utilisée pour ses contenus nutritifs remarquables (RAJ, 2020), ses nombreux nutriments, ses vitamines, ses acides aminés essentiels et ses enzymes végétales, qui peuvent constituer une composition biochimique spéciale d'où un régime complet pour les régions qui connaissent des pénuries alimentaires et qui souffrent de malnutrition (HAVIAS, 2020).



Figure 2 : *Arthrospira platensis* observée au microscope

<https://algae-lab.com/shop/living-algae/culture-sample/spirulina-platensis-m1/> [3]

II.2. Origine de la spiruline, historique et découverte

Lorsque les Espagnols envahirent l'Amérique Centrale, ils constatèrent que les Aztèques, peuple originel du Mexique, se nourrissaient essentiellement de maïs et d'une sorte de boue bleue verte recueillie à la surface du lac Texcoco, séchée et broyée ils en fabriquèrent un gâteau appelé Tecuitlathl, considérée bien après par les colons comme d'une haute valeur nutritive (PANIAGUA *et al.*, 1993).

450 ans après, le botaniste belge J- Léonard a découvert que les Kanembous de l'ouest du Tchad de la région du Kanem récoltaient cette boue bleue-verte, ils l'a mélangeaient au miel pour en faire un gâteau appelé **Dihé** extrêmement riche en protéines et aujourd'hui, le Dihé n'est autre que la Spiruline (SGUERA, 2008).

Et donc, en 1960 la Spiruline a été considérée comme une algue et une claire distinction entre les procaryotes et les eucaryotes a été définie basée sur la différence d'organisation cellulaire : les procaryotes regroupent les organismes dépourvus de compartiment cellulaire tandis que les eucaryotes regroupent ceux qui possèdent des organelles c'est à dire des nucléoles et des mitochondries (DURAND, 1993 ;GOULAMABASSE, 2018).

En 1962, Stanier et ses collaborateurs constatèrent que cette algue bleue-verte était dépourvue de compartiments cellulaires, et donc faisait partie des procaryotes ; ils proposèrent de désigner ce microorganisme par «Cyanobactérie». Cette nouvelle désignation est finalement acceptée et figurée pour la première fois au «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology en 1974» (STANIER, 1974 ; GOULAMABASSE T.R,2018).

En Algérie, la spiruline a été isolée et purifiée pour la première fois par Dr. Hiri A en 1998 à Tin Aman à Tamanrasset ;

En 2013 à Ouargla, Tamanrasset et Oran, il y'a eu production artisanale de cette cyanobactérie, et sa capacité de production annuelle a atteint 7 quintaux (SEGHIR *et al.*, 2020).

III. Caractéristiques de la spiruline

III.1. Taxonomie d'*Arthrospira platensis*

La spiruline est la plus connue des 200 genres dont les 1500 espèces de cyanobactéries, très difficiles à détecter, il en reste sans doute encore beaucoup à découvrir (CRUCHOT, 2008).

En pratique, il faut retenir que le terme “Spiruline” correspond au nom commercial d’une espèce de cyanobactérie alimentaire appartenant toujours au genre *Arthrospira* ;

Le mot “Spirulina” est le nom commercial anglophone de la spiruline, mais il désigne également un genre de cyanobactérie assez éloigné d’*Arthrospira*, et surtout non comestible (par exemple : *Spirulina major*, *Spirulina subtilissima*, *Spirulina princeps*, *Spirulina gigantea* ou *Spirulina subsalsa*) (Fox, 1999 ; CRUCHOT , 2008).

La classification selon Ripley Fox (1999) est comme suit :

Règne : Monera

Groupe ou Sous Règne : Procaryotes.

Embranchement: Cyanophyta.

Classe : Cyanophyceae.

Ordre : Nostocales (= Oscillatoriales).

Famille : Oscillatoriaceae.

Genre : *Oscillatoria*.

Sous genre : *Spirulina* ou *Arthrospira*.

Espèce : *Arthrospira platensis*.

III.2. Morphologie et caractères généraux d’*Arthrospira platensis*

La spiruline est une cyanobactérie, procaryote et photo-autotrophe pouvant être unicellulaire ou pluricellulaire. Elle possède en moyenne une longueur de 250 µm. Elle est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout appelées filaments ou trichomes mobiles, non ramifiés qui ont un diamètre de 10 à 12 µm, et enroulés en 6 ou 7 spires. L’enroulement du trichome sur lui-même s’effectue suivant le sens d’un minuscule ressort à l’origine de son appellation : « spiruline » du latin « spira » qui signifie enroulement. Cette forme hélicoïdale typique lui permet de se déplacer dans l’eau en adoptant le mouvement d’une vis, à une vitesse de 5 µm par seconde. On parle alors de déplacement par motilité. On trouve cependant des spirulines spiralées, ondulées et droites (**figure 03**), cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leurs habitats (Charpy *et al.*, 2008).



Forme spiralée (type « Lonar »)

Forme droite (type « M2 »)

Forme ondulée (type « Paracas »)

Figure 3 : Morphologie typique de spiruline (Source : Antenna technologie).

<https://www.antenna.ch/wp-content/uploads/2017/04/biologie.pdf> [4]

III.3. Distribution géographique

On distingue le genre *Arthrospira* des autres cyanobactéries par le milieu naturel dans lequel il se développe. En effet, la spiruline se développe préférentiellement dans des eaux douces et chaudes, alcalines (pH 8 - 11,5) et minéralisées (nitrate, phosphates, fer) riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou bicarbonate de sodium (NaHCO_3) excluant ainsi la plupart des autres microorganismes. Plus communément, on la retrouve dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (AHOUNOU, 2018).

Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud. Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou) et en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). Il s'agit certes d'un organisme cosmopolite et ubiquiste mais il est beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe (CHARPY *et al.*, 2008).

En Algérie, plus précisément à Ouargla, Tamanrasset et Oran, il y'a eu production artisanale de cette cyanobactérie (SEGHIR *et al.*, 2020).

III.4. Cycle biologique d'*Arthrospira platensis*

Le filament de Spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées Nécriidies. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave, elles sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés Hormogonies. Les Hormogonies vont croître en longueur par division binaire (chacune des cellules va donner deux cellules par scissiparité) et prendre la forme typique hélicoïdale (**figure 04**) (BALLONI *et al.*, 1980 in CHARPY, 2008).

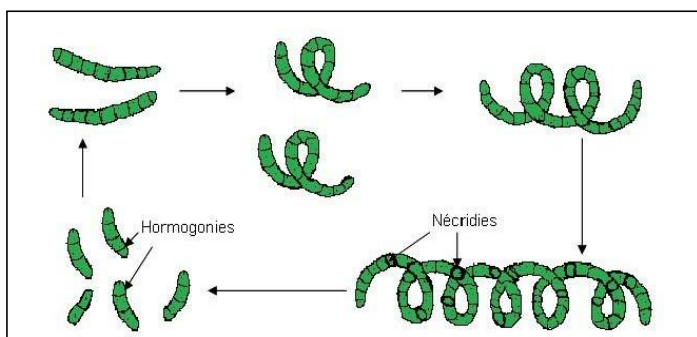


Figure 4 : Cycle biologique de la spiruline selon (BALLONI *et al.*, 1980 in CHARPY, 2008)

III.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 (séparation), fission binaire (= scissiparité, se divise en deux cellules égales) ou multiple, par bourgeonnement ou fragmentation au hasard. La cyanobactérie fait copie de son seul chromosome. La cellule s'allonge et les chromosomes se séparent. La paroi se forme pour diviser les deux cellules. Les 3 étapes fondamentales de son cycle de vie sont :

- La fragmentation des trichomes,
- Elargissement des cellules,
- Maturation du trichome en se divisant en filaments par fission binaire, ces filaments prenant une forme hélicoïdale. (SOIZIC, 2019).

III.6. Culture de la spiruline

La culture de micro-organismes photosynthétiques peut être un processus rentable pour obtenir des protéines de valeur pour l'alimentation humaine et animale (HENRIKSON, 1989).

Selon la superficie totale d'exploitation des bassins et les moyens technologiques utilisés, il existe une différence entre la culture artisanale et la culture industrielle. (JOURDAN, 2006).

III.6.1. Bassin

Pour une production familiale ou artisanale il y a de nombreuses façons de construire un bassin adéquat de petite taille, qui varient selon les conditions locales (JOURDAN, 2006).

a. En bâches plastiques

Le film est de qualité alimentaire (ou au moins non toxique) et résistant aux ultraviolets, son épaisseur recommandée est de 0,25 mm minimum, et de préférence 0,5 mm Il faut éviter le plus

possible les plis dans les angles donnant des zones qui ne seraient pas bien agitées ou aérées (JOURDAN, 2006).

b. En « dur » (béton, parpaings, briques)

Le fond du bassin en ciment doit être construit sous forme de dalle en béton armé, d'une épaisseur d'au moins 10 cm, et de très bonne qualité, sur un sol bien compacté. Les bords du bassin peuvent être en briques, parpaings ou en béton armé. Il faut éviter les angles vifs. (JOURDAN, 2006).

c. En argile (si on n'a vraiment pas d'autre possibilité)

Creuser sur 20 cm et faire un talus bien tassé de 20 cm également. La spiruline pousse très bien dans un bassin en argile, mais sa pureté bactériologique doit être surveillée de plus près (car le fond ne peut pas être agité, augmentant le risque de micro-organismes anaérobies au fond) (JOURDAN, 2006).

III.6.2. Milieu de culture

Dans la nature, la spiruline n'a besoin pour "pousser" que d'une cuvette argileuse retenant une eau saumâtre et alcaline, sous un climat chaud, et de quelques déjections animales (JOURDAN, 2006).

Le milieu doit apporter à la spiruline tous les éléments chimiques nutritifs qui lui sont nécessaires (NIANGORAN, 2017). Il s'agit de milieux très minéralisés riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou bicarbonate de sodium (NaHCO_3), d'une source d'azote fixé et d'autres minéraux (ZARROUK, 1966 in NIANGORA, 2017).

Aujourd'hui, de nombreux pays ont mis en place des fermes à spiruline grâce à la synthétisation du milieu de culture (NIANGORAN, 2017). Le plus connu et utilisé (milieu standard) est le milieu (Zarrouk) (ZARROUK, 1966 in NIANGORAN, 2017), il est fabriqué à partir d'eau distillée et contient, en g/litre : $\text{NaHCO}_3 = 16,8$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,5$; $\text{NaNO}_3 = 2,5$; $\text{K}_2\text{SO}_4 = 1,0$; $\text{NaCl} = 1,0$; $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O} = 0,2$; $\text{CaCl}_2 = 0,04$; $\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O} = 0,01$; $\text{EDTA} = 0,08$; « solution A5 » = 1,0; « solution B6 » = 1,0 .

Composition de la « solution A5 », en g/l: $\text{H}_3\text{BO}_3 = 2,86$; $\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O} = 1,81$; $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O} = 0,222$; $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O} = 0,079$; $\text{MoO}_3 = 0,015$.

Composition de la « solution B6 », en g/l: $\text{NH}_4\text{VO}_3 = 0,02296$; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4, 24 \text{H}_2\text{O} = 0,096$; $\text{NiSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O} = 0,04785$; $\text{Na}_2\text{WO}_4, 2 \text{H}_2\text{O} = 0,01794$; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3 = 0,04$; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2, 6 \text{H}_2\text{O} = 0,04398$ (JOURDAN, 2012).

III.7. Conditions chimiques de croissance

III.7.1. Eau

Les spirulines vivent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable (mais ne sentant pas fortement le chlore) ou au moins filtrée (sur bougie filtrante ou sable), le plus important étant l'élimination des algues étrangères. L'eau de pluie, de source ou de forage est en général de qualité convenable (JOURADN, 2006).

III.7.2. Salinité

Spirulina platensis peut être considérée comme une espèce à la fois halophile et très euryhaline : en milieu naturel, les salinités tolérées vont de 8,5 grammes de sel / l à 270 grammes (ILTIS, 1968). La limite de salinité permise est de 13 g/l (JOURDAN, 2006).

III.7.3. Alcalinité

Le degré d'alcalinité de milieu de culture influence la vitesse de croissance de la spiruline. Il doit être compris entre 8 et 11. Le pH idéal se situe autour de 9,5 [5].

III.8. Conditions physiques de croissance

III.8.1. Température

La température du milieu influence directement la vitesse de croissance de la spiruline :

Elle ne commence à croître d'une manière appréciable qu'au-dessus de 20°C. La vitesse de croissance est maximale entre 35°C à 37°C. Au-delà de 44°C, on risque d'avoir une destruction de la culture. La spiruline ne peut survivre dans un milieu froid (jusqu'à -5°C). Les brusques variations de température peuvent l'être létale (JOURDAN, 2006).

III.8.2. Lumière

La lumière est un facteur important dans la croissance des micro-algues (NIANGORAN, 2017).

Une très forte lumière (plein soleil) peut être dangereuse dans les cas suivants:

- Sur une culture froide (moins de 14-15°C), surtout si brusque illumination.
- Sur une culture très diluée.
- Sur une culture très chaude, car échauffement supplémentaire [5].

D'après Fox le seuil létal de luminosité est de 120 Klux, au-delà duquel la cellule éclate ; c'est la photolyse [6].

III.9. Etapes d'obtentions de la forme poudre

Selon "SPIRULINE DES HAUTS DE France", le processus d'obtention de la forme poudre de la spiruline passe par les étapes suivantes [7]

a. La récolte

La spiruline est récoltée tôt le matin (4h et 10h) : c'est le meilleur moment en termes de qualité nutritionnelle.

b. La filtration

Utilisation des pompes de surface pour aspirer l'eau du bassin et les micro-algues. Cette « boue verte » est ensuite passée à travers un filtre de 30 microns afin de séparer l'eau et la spiruline. L'eau retourne dans le bassin tandis que la spiruline coule dans un bac.

c. Pressage en pâte

La spiruline est piégée dans un linge de fromagerie pour être soumise à une dépression à l'aide d'une pompe à vide : cela éliminera plus d'eau du produit. Obtention ainsi d'une sorte de pâte à modeler.

d. Façonnement en spaghetti

Cette pâte est mise dans un presseur afin d'être façonnée en spaghetti. Ceci permet de transformer le produit assez finement pour qu'il puisse sécher efficacement dans le séchoir.

e. Séchage à basse température

Déshydratation de la spiruline dans un séchoir à basse température (<42°C), ceci permet de conserver ses propriétés nutritionnelles. Obtentions des brindilles qui pourront ensuite être broyées pour obtenir la spiruline en poudre.

IV. Composition nutritionnelles de la spiruline

Il est bien établi que les variations de conditions de culture provoquent facilement de forts changements dans la composition biochimique des spirulines, cependant en moyenne la spiruline contient en poids sec jusqu'à 70 % de protéines, 15 à 25 % de glucides, 11 % de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux (principalement des oligoéléments) (**figure 05**), de la chlorophylle et des phycobiliprotéines (SGUERA, 2008).

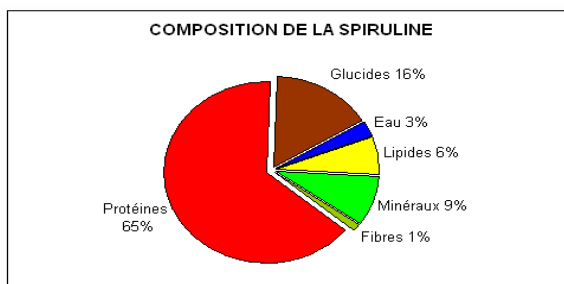


Figure 5 : Composition de la spiruline

<http://verteburkina.unblog.fr/la-spiruline-outil-de-sante/> (2008) [8].

IV.1 Protéines

La teneur en protéines de la spiruline varie entre 50 % et 70% de son poids sec.

Ces valeurs sont très particulières, même chez les micro-organismes en outre les meilleures sources de protéines végétales n'arrivent qu'à la moitié de ces teneurs, contrairement aux végétaux habituels, la totalité de la spiruline est comestible (FALQUET et HURNI, 2006).

Qualitativement, les protéines de la spiruline sont complètes, elles contiennent tous les acides aminés essentiels qui représentent 47% du poids total des protéines (BUJARD, 1970 ; FALQUET et HURNI, 2006). Selon les valeurs de référence d'OMS ou de FAO, le profil de ces acides aminés est considéré comme ayant une « haute valeur biologique » (MARTINEZ-GALERO, *et al.*, 2016).

Et quantitativement, le pourcentage en protéines de la spiruline est trois fois plus élevé que celui du bœuf (MARTINEZ-GALERO, *et al.*, 2016) et plus encore que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (3.5%) et des céréales (14%), ...**(figure 06)** (GOULAMABASSE, 2018).

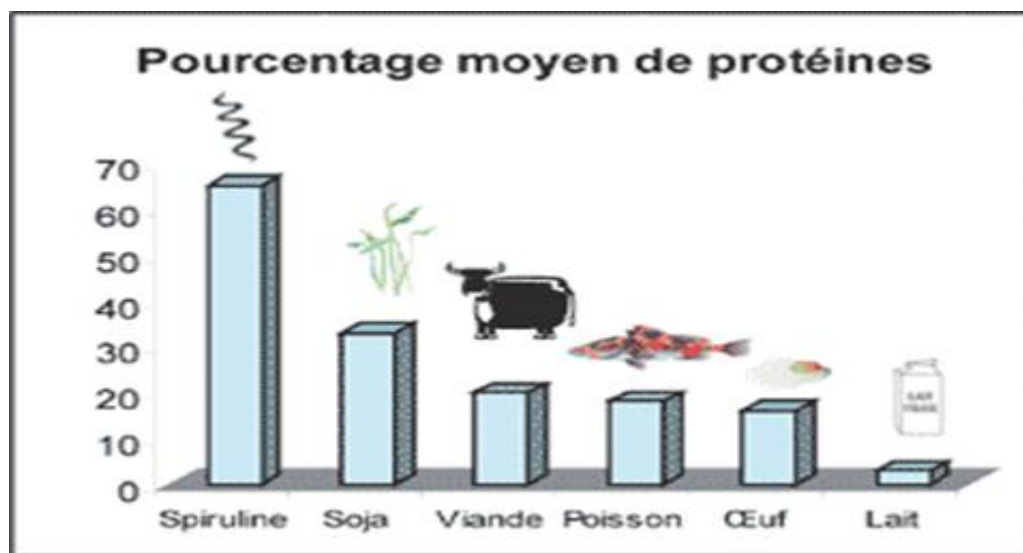


Figure 6 : Positionnement de la spiruline par rapport à d'autres aliments en termes de taux de protéines <https://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/39310f1b-cf15-411b-9f21-d462b10a952e> (2018) [9].

La spiruline contient des acides nucléiques (4,2 à 6 % du poids sec) (30 % ADN et 70 % ARN) qui en se dégradant produit de l'acide urique (MANET, 2016).

IV.2. Lipides

Outre leur rôle énergétique évident, les lipides ont un rôle structural contribuant au maintien de l'architecture cellulaire.

Suivant le système d'extraction utilisé, la teneur des lipides totaux est comprise entre 5 à 10% du poids sec de la spiruline (GUTIERREZ *et al.*, 2015).

De même, la présence d'acide gamma-linolénique dans la spiruline, rare dans les aliments courants, joue un rôle de précurseur des médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (FALQUET et HURNI, 2006).

La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et polyinsaturés. La forte concentration en acides gras essentiels inclue des oméga-3 et des oméga-6 prévient l'accumulation de cholestérol dans l'organisme humain (HUG et VON DER WIED, 2011).

Après le lait humain et quelques huiles végétales peu courantes, fort chères et, la spiruline est considérée comme l'une des meilleures sources alimentaires compte tenu de la présence d'acide gamma-linolénique (CRUCHOT, 2008).

Spirulina platensis riche en sulfolipides tels les sulfoquinovosyl diglycérides qui représentent 5% de la fraction saponifiable, intéressent fortement les chercheurs de part leur activité protectrice contre des infections virales, en inhibant *in vitro* la transcriptase inverse* du HIV-1 et du HIV-2 alors que ce dernier est naturellement résistant à cette classe de molécules (KIET et DURAND, 2006; GOULAMABASSE, 2018).

Tableau 1 : Pourcentage des principaux acides gras de la spiruline modifiée. (AHOUNOU, 2018 ; FALQUET ET HURNI, 2006).

Acide gras	% des acides gras
Palmitique (16 :0)	25 – 60
Stéarique (18 :0)	0.5 – 2
Palmitoléique (16 :1)	0.5 – 10
Oléique (18 :1)	5 – 16
Linoléique (18 :2)	10 – 30
AGL (18 :3)	8 – 40

IV.3. Glucides

Les glucides représentent 13,6 à 25% de la matière sèche de la spiruline (FALQUET & HURNI 2006, QUILLET, 1975).

Les glucides exercent une fonction dans la constitution des tissus fondamentaux de l'organisme, et étant premières sources énergétiques, ils sont indispensables au fonctionnement du cerveau et des muscles.

Les glucosamines et l'acide muramique associés à des peptides, constituent la paroi cellulaire des spirulines. Cette paroi s'apparente à celles des bactéries gram négatif. Bien que non digestibles, ces parois sont fragiles et rendent le contenu cellulaire très accessible aux enzymes de digestion. L'essentiel des glucides assimilables sont des polymères : glucosannes aminés rhamnosannes aminés et du glycogène. Tandis que les glucides simples comme le glucose, le fructose, et le saccharose, ainsi que les polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, ne sont présents qu'en très faibles quantités (AHOUNOU, 2018).

Parmi les glucides de la spiruline, plusieurs polysaccharides sulfatés chélatés à un atome de calcium ou de sodium (le Calcium-spirulan ou le Sodium-spirulan) ont été étudiés in vitro pour leurs activités biologiques : anticoagulante, antivirale et activité immunostimulante (PIERLOVISI, 2008).

IV.4. Acides nucléiques

Chez *S. Platensis* comme chez *S. Maxima*, on rapporte des valeurs de 4.2 à 6% d'acides nucléiques totaux dans la matière sèche. La proportion d'ADN serait d'un quart à un tiers par rapport à l'ARN (FALQUET et HURNI, 2006).

La dégradation biochimique d'une partie des acides nucléiques (ADN et ARN) (les purines : adénine et guanine) produit en dernier lieu de l'acide urique. Or, l'élévation de ce dernier dans le plasma peut produire à la longue des calculs rénaux et des crises de goutte. L'ARN produit deux fois plus d'acide urique que l'ADN, pour une même teneur en purines, et que l'élévation du taux d'acide urique dépend aussi de multiples facteurs, l'âge, le sexe ou l'obésité... (CRUCHOT, 2008).

Ces chiffres sont à mettre en rapport avec d'autres aliments (**tableau 2**). La teneur en acides nucléiques des spirulines est très inférieure à celle de la généralité des unicellulaires (FALQUET et HURNI, 2006).

Tableau 2 : Teneur en acides nucléiques de quelques aliments

Aliments	Acides nucléiques totaux (% matière sèche)
Viande de bœuf	1.5
Foie de bœuf	2.2
Spiruline	4 – 6
Levure	23

En se basant sur une valeur moyenne de 5% en acides nucléiques, la limite quotidienne de 4 grammes d'acides nucléiques représente le contenu de 80 grammes de spiruline sèche. Cette quantité équivaut à environ huit fois la dose de spiruline recommandée comme supplément alimentaire. On peut donc raisonnablement penser que la teneur en acides nucléiques de la spiruline ne pose pas de problèmes, même à long terme et pour des doses élevées (FALQUET et HURNI, 2006).

IV.5. Vitamines

La spiruline représente une source très intéressante de vitamine B12 utilisable par l'homme, puisqu'elle apporte la quantité recommandée par jour (CHARLEMAGNE, 2008). Même si la biodisponibilité de cette vitamine B12 n'est pas clairement établie (seulement 17 % serait absorbée et donc active chez l'Homme), la spiruline demeure une source exceptionnellement élevée pour un végétal ou bactérie. Chez l'homme, 80% des caroténoïdes totaux présents dans le β -carotène de la spiruline sont convertibles en vitamine A qu'a avec la vitamine E des propriétés antioxydantes et assurent ainsi une bonne conservation d'autres constituants de la spiruline (acides gras...). Ces molécules sont cependant fragiles et leur bonne conservation dépendra de certains procédés de fabrication : tels que le séchage à basse température et la granulométrie grossière. Cependant l'absence de vitamine A libre permet d'éviter tout risque d'hypervitaminose A puisque l'accumulation de β -carotène, à l'inverse de celle de rétinol, n'est pas toxique (PIERLOVISI, 2008).

IV.6. Minéraux et oligoéléments

La spiruline contient 7 % de son poids sec de minéraux essentiels (MANET, 2016) : fer, zinc, magnésium, calcium, phosphore et potassium (LAICHE et BESSEI, 2009).

Il a été démontré que la spiruline extrêmement riche en magnésium, constitue une bonne source alimentaire pour l'homme (PLANES, 2002).

La spiruline cultivée (550-600 mg/kg) a une très haute teneur en fer, elle combat la carence en fer chez les femmes (enceintes, allaitantes) et les enfants présentant des anémies surtout ferriprives, (BUJARD, 1970 ; LAICHE et BESSEI, 2009). Par contre le zinc est présent sous forme de traces (21-40 $\mu\text{g/g}$) ne lui conférant pas la considération d'une bonne source alimentaire en zinc.(FALQUET et HURNI, 2006).

Quant au calcium et le phosphore sont présents aussi en quantités comparables à celles trouvées dans le lait. Les quantités relatives de ces éléments sont équilibrées ce qui exclut le risque de décalcification par excès de phosphore et en font une source intéressante (CHARLEMAGNE, 2008).

De même, la haute teneur en potassium est à souligner car dans le cadre des pays industrialisés, les nutritionnistes soulignent les trop faibles rapports potassium/sodium de la grande majorité des aliments disponibles (FALQUET et HURNI, 2006).

IV.7. Enzymes

L'absence de la cellulose dans la membrane de la spiruline lui confère une biodisponibilité d'une quantité intéressante de SOD (superoxyde dismutase) (1.000 à 4.000 UI/g), une puissante enzyme anti-oxydante, à la base du système endogène de la lutte contre le stress oxydatif (MANET, 2016).

IV.8. Pigments

La spiruline, cette algue qu'on dit bleue mais que nous voyons verte contient au fait 3 sortes de pigments (GOULAMABASSE, 2018) : la chlorophylle, les caroténoïdes et la phycocyanine. Ces pigments présentent un intérêt dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

IV.8.1. Caroténoïdes

Le β carotène représente 80% des caroténoïdes présents, qui sont des pigments non azotés dont la coloration varie du jaune au rouge. La spiruline en contient 20 à 25 fois plus que les carottes. La plupart des caroténoïdes sont des provitamines A (CHARLEMAGNE, 2008).

Le reste étant composé principalement (par ordre décroissant) de xanthophylle, de cryptoxanthine, d'échinénone, de zéaxanthine et de lutéine (PALLA, 1969 ; FALQUET et HURNI, 2006).

La famille des caroténoïdes est constituée de deux groupes : les caroténoïdes hydrocarburés polyéniques et les caroténoïdes oxygénés (NEWMAN ; 1972 in BOUMEDINE 1991) (**Voir annexe figure 1**).

a. Les caroténoïdes hydrocarburés

La structure de ce groupe est un système de huit à neuf doubles liaisons conjuguées de formule générale $C_{40}H_{56}$ (BOUKHERCHOUFA et TEBAKH, 2006).

b. Les caroténoïdes oxygénés

Aussi appelés xanthophylles, procèdent en plus du carotène, des atomes d'oxygène (LIAAN-JENSEN et STOREBAKK ; 1990 in GHAZI et SAHRAOUI ; 2005).

Ce groupe compte plusieurs dérivés parmi lesquels on cite :

- les dérivés hydroxyle (lutéine, zéaxanthine) ;
- Les dérivés acides (acide Apo-8' - caroténoïque) ;

- les dérivés hydroxylés et cétoniques (capsanthine) (BOUKHERCHOUFA et TEBAKH, 2006).

Les caroténoïdes ont une action anti radicalaire, et sont indispensable à l'être vivant : Ils participent à la croissance et au développement de l'individu, ainsi qu'au maintien de la vision nocturne (CHARLEMAGNE, 2008).

IV.8.2. Chlorophylle

La spiruline contient 1% de chlorophylle (AHOUNOU, 2018).

C'est à ce pigment photosynthétique que la spiruline doit sa couleur verte, c'est une substance parfaitement assimilable par le corps, et sa structure est proche de celle de l'hémoglobine [10].

La chlorophylle est une chlorine (quatre noyaux pyrroles cycliques), chélatant un atome de magnésium(Mg^{2+}) au centre, ainsi qu'un alcool à longue chaîne, le phytol (sauf pour les chlorophylle *c*) qui est hydrophobe et sert d'ancrage aux protéines des membranes thylakoïdales. Elle présente une structure quasi-identique à l'hème de l'hémoglobine (protéine présente dans les globules rouges sanguins). C'est la présence, dans sa structure, de nombreuses doubles liaisons conjuguées qui permettent l'interaction de l'absorption du rayon lumineux. Les chaînes latérales de la chlorine sont variables et entraînent une modification du spectre d'absorption entre les différentes familles de chlorophylles [11] (**Annexe figure 2**).

Parmi ses qualités : elle rétablit l'équilibre acido-basique, régule le transit intestinal, augmente le taux de globules rouges et stimule la cicatrisation interne et externe [10].

IV.8.3. Phycocyanine

La phycocyanine est responsable du bleuissement de la poudre de spiruline exposée trop longtemps à la lumière (FLAQUET et HURNI, 2006). Elle représente 12.6 % de son poids sec, et est considérée comme le pigment le plus abondant dans la spiruline (PATEL et GOYAL, 2013).

Seul colorant bleu naturel compatible avec l'alimentaire (NGUYEN *et al.*, 2014).

Moins sensible que la chlorophylle à la photo-destruction, la couleur de la phycocyanine domine lorsque le vert chlorophyllien disparaît. C'est aussi aux phycocyanines que l'on doit l'intense couleur bleue qui apparaît plus ou moins rapidement lorsque l'on réhydrate de la spiruline séchée : l'éclatement des cellules libère ces protéines très solubles dans l'eau, alors que la chlorophylle reste associée aux débris cellulaires (FLAQUET et HURNI, 2006).

La phycocyanine est composé de deux sous unités relativement homologues :

La chaîne α avec une phycocyanobiline attachée à la cystéine 84 et la chaîne β avec deux phycocyanobilines attachées à la cystéine 84 et 155 (BENAHMED, 2012) (**Annexe figure 3**).

Appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses recherches sont en cours pour connaître toutes ses propriétés ;

Sa structure particulière lui confère des propriétés antioxydantes, antiradicalaires et détoxifiantes. La phycocyanine stimulerait également la production des globules rouges et des globules blanches (CHARLEMAGNE, 2008).

Tableau 3 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 100 g de matière sèche de *Spirulina platensis* (CHARPY *et al.*, 2008).

Pigments	Teneur en mg/100 g
Chlorophylles totales	1150
Chlorophylle a	610 – 750
Caroténoïdes (orange)	370
Phycocyanine (bleu)	15000 – 20000
Phycoérythrine (rouge)	29000 – 100000

V. Méthodes d'analyses

V.1. Extraction des différents pigments de la spiruline

Par définition, l'extraction est une méthode (ou procédé) utilisé dans le but d'isoler des composés à partir d'un mélange solide ou d'une solution complexe. L'extraction joue un rôle clé dans la recherche expérimentale du point de vue préparation d'échantillons et analyses qualitatives et quantitative de divers produits naturels ou synthétiques (ZAGHDOUDI, 2015).

V.1.1. Extraction des caroténoïdes

Quand il s'agit de cibles actives naturelles tels que les caroténoïdes, il existe plusieurs procédés d'extraction parmi lesquels l'extraction par solvant organique, qui présente la technique la plus conventionnelle utilisé (ZAGHDOUDI, 2015).

V.1.2. Extraction de la chlorophylle

La chlorophylle est soluble dans des solvants organiques, et de ce fait, elle peut être extraite en utilisant l'acétone ou l'éthanol, qui permettent sa solubilisation [12].

V.1.3. Extraction de la phycocyanine

Plusieurs méthodes ont été mise au point par divers chercheurs pour l'extraction de la phycocyanine notant : l'eau, la congélation, l'extraction par des solvants, ... (LAFRI, 2018).

L'extraction des phycobiliprotéines en général (dont la phycocyanine) sont extraites à partir d'une biomasse sèche ou fraîche entraînant une lyse cellulaire qui consiste en une rupture des membranes plasmiques de cellules ou de bactéries par divers moyens notamment

- Des moyens physiques/mécaniques (par sonification, cycles de congélation/décongélation) ;
- des moyens chimiques (solutions de CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ;
- des moyens biologiques (enzymes) (LAFRI *et al.*, 2017).

V.2. Identification des différents pigments de la spiruline

Parmi les différentes techniques d'identification, nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM).

A l'origine utilisée pour la séparation de substances colorées (d'où son nom), la chromatographie est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative, une méthode simple et rapide permettant de suivre l'évolution d'une réaction ou de tester la pureté de composés organiques. [13].

➤ Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption et sur le principe de capillarité. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique: un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche, l'éluant monte à travers la phase stationnaire (PhS). Mais, en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile et des forces électrostatiques retenant le composant sur la PhS, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant. [14].

V.3. Dosage par spectrophotométrie des différents pigments de la spiruline

V.3.1. Caroténoïdes

Cette famille regroupe les carotènes et les xanthophylles. La classe des carotènes regroupe les 5 pigments suivants le β , α , ϵ , γ carotène et le lycopène (JUN, 2015).

Le β -carotène a une absorbance à 425, 450 et 477 nm (RODRIGUEZ, 2001).

Tableau 4 : Absorbances maximales des caroténoïdes (modifié) (JUN, 2015).

Groupe	Caroténoïde	Absorbance maximale
Carotènes	α carotène	448 et 476 nm
	ϵ carotène	440 et 470 nm
	γ carotène	461 et 491 nm
	Lycopène	474 et 506 nm
Xanthophylles	Echinénone	459 nm
	Vauchériaxanthine	438 et 466 nm

V.3.2. Chlorophylle

On distingue 6 classes de chlorophylles : la chlorophylle a, b, c₁, c₂, c₃, et d. Ces pigments affichent des caractéristiques spectrales très proches et sont très sensibles à la lumière (JUN, 2015).

Tableau 5 : Absorbances maximales des chlorophylles (modifié) (JUN, 2015)

Chlorophylle	Absorbance maximale
Chlorophylle a	430 et 662 nm
Chlorophylle b	457 et 646 nm
Chlorophylle c ₁	446 et 629 nm
Chlorophylle c ₂	450 et 629 nm
Chlorophylle c ₃	452 et 626 nm
Chlorophylle d	445 et 693 nm

V.3.3. Phycocyanine

L'absorbance maximale pour la phycocyanine, l'allophycocyanine et les protéines totales est à 620 nm, à 655 nm et à 280 nm respectivement (SGUERA, 2008).

VI. Evaluation de la qualité microbienne de la spiruline

L'analyse microbiologique peut avoir pour objectif de détecter ou de quantifier une grande variété de microorganismes comprenant les bactéries et champignons qui peuvent être pathogènes ou toxigènes pour l'homme, s'ils sont susceptibles de détériorer ou de compromettre la quantité d'un produit, ils peuvent aussi indiquer si un produit a été traité de façon adéquate ou inversement (FRANCIS et MAIER, 2002 in MAHDJOUB et GHERIB, 2016).

VI.1 Flore mésophile aérobie totale

La flore mésophile aérobie totale est l'ensemble des micro-organismes aptes à se multiplier à l'air à température optimale de croissance située entre 25 et 40°C. Ils peuvent être pathogènes ou d'altération (LINDEN, 1999 in GASSAMA, 2002).

VI.2. Flore fongique

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes hétérotrophes comprenant les moisissures et les levures (GUIRAUD, 1998).

➤ Les moisissures

Ce sont des champignons microscopiques filamenteux. Les cellules sont organisées en mycélium. Certaines sont des parasites des végétaux (plus rarement des animaux), d'autres sont saprophytes, se développant sur des déchets organiques et contaminant les produits alimentaires. Elles sont des aérobies, acidophiles ($3 < \text{pH} < 7$), mésophiles ($20^{\circ}\text{C} \leq T \leq 30^{\circ}\text{C}$), osmophiles et halophiles. Certaines sont toxigènes et libèrent des mycotoxines dans l'aliment provoquant un réel danger comme *Aspergillus clavatus*.

➤ Les levures

Sont des champignons microscopiques unicellulaires, à cellules rondes ou ovales, à métabolisme oxydatif ou mixte (oxydatif et fermentatif). Comme elles sont acidophiles ($3 < \text{pH} < 7.5$), mésophiles ($25-28^{\circ}\text{C}$). Parmi les levures, il y'a des levures pathogènes non toxique comme *Candia albicans*, *Cryptococcus neoformans*....

VI.3. Coliformes totaux

Ils regroupent un certain nombre d'espèces bactériennes appartenant en fait à la famille des Enterobactériaceae. Selon (ISO) :le terme « coliforme » correspond à des organismes en bâtonnets, non sporogènes, Gram négatif, oxydase négatif, facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaries ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose et le mannitol avec production de gaz en 48

heures, à des températures allant de 35 à 37°C. Les coliformes comprennent les genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia* (RODIER *et al.*, 2005).

VII. Activités thérapeutiques de la spiruline

VII.1. Activité antioxydante

Depuis quelques années, les antioxydants font l'objet d'un engouement extraordinaire chez tous les chercheurs en biologie médicale (SGUERA, 2008), la spiruline en est une source, elle contient de nombreux systèmes antioxydants tels que : les enzymes (SOD), la phycocyanine, l'acide gamma-linolénique, β carotène et vitamine E, 1 kg de spiruline contient autant d'antioxydants qu'une tonne de fruits ! (MANET, 2016).

Elle active des enzymes antioxydantes comme la SOD et la catalase, capable de piéger les radicaux libres et inhibe ainsi, entre autre, la peroxydation des lipides et les dommages causés à l'ADN (KURLIKOWSKI, 2019).

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent que le traitement à la spiruline réduit significativement le stress oxydatif (GOULAMBASSE, 2018).

Selon l'étude faite par (LAHOUCINE, 2019), la concentration de 40 mg de poudre de spiruline nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire obtenue est de 0,160 mg/ml, ce qui montre que la microalgue a une capacité antioxydante légèrement supérieure par rapport à celle de l'acide ascorbique (0,156 mg/ml).

VII.2. Activité antibactérienne

Certaines études préliminaires sur la *Spirulina plantensis* ont montré des propriétés antimicrobiennes efficaces. Ce résultat, certifie la possession de la cyanobactérie d'un mécanisme de défense pour lutter contre les bactéries pathogènes et donc une perspective de mettre au point ou de développer un antibiotique (agent antimicrobien) à base de plante, biodégradable qui pourrait être prometteur avec moins d'effets secondaires qui peuvent remplacer les médicaments synthétiques (AL-GHANAYEM, 2017).

La spiruline *Arthrospira platensis* est capable d'inhiber la croissance de certaines bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*) et à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus*) (BHOWMIK *et al.*, 2009 ; FINAMORE *et al.*, 2018).

VIII. Applications de la spiruline

La très grande richesse de la composition chimique de la spiruline lui confère un large potentiel d'utilisations. Outre le domaine de la malnutrition, elle est utilisée dans d'autres domaines plus variés (LANGLADE *et al.*, 2008), tels l'agroalimentaire, le pharmaceutique et le domaine cosmétologique.

VIII.1. La spiruline et l'industrie agroalimentaire

Sur le marché, on trouve beaucoup de produits à base de spiruline : pâtes, biscuits, crèmes glacées, bonbons, nouilles, boissons (MOBIN *et al.*, 2019 ; BOUKHARI, 2020) tirant profit de sa riche composition nutritionnelle de part ses protéines, ses glucides, ses lipides et ses caroténoïdes (MOLINO *et al.*, 2018).

En Chine, où la consommation des algues est plus ancienne, les produits disponibles sur le marché, en plus des capsules, sont des produits agroalimentaires où la spiruline a été incorporée (BOUKHARI, 2020), tels les nouilles, pain, biscuits, thé et diverses boissons (LIANG *et al.*, 2004).

En Afrique, son utilisation se limite aux programmes de lutte contre la malnutrition et contre le HIV. Sa richesse nutritionnelle et ses qualités thérapeutiques et la possibilité de sa culture locale ont motivé ce choix (BOUKHARI, 2020).

Ici en Algérie, la spiruline a fait l'objet d'études pour son incorporation, de ce fait, ils l'ont incorporée dans le couscous (un plat traditionnel largement consommé en Algérie). afin d'améliorer essentiellement sa qualité nutritionnelle (DOUMANDJI *et al.*, 2012).

Grâce aux pigments naturels extraits des spirulines (phycocyanine, caroténoïdes, chlorophylle), qu'on obtient des colorants naturels utilisables notamment dans l'industrie alimentaire (CRUCHOT, 2008).

VIII.2. La spiruline et l'industrie pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique a été l'une des pionnières à observer la nature, à l'utiliser et à la copier, toujours en quête de nouvelles molécules (SGUERA, 2008).

En Europe, la spiruline est utilisée comme un complément alimentaire, seul ou en association avec d'autres algues ou extraits de plantes. Elle est considérée comme une bonne source de nutriments (NICOLETTI, 2016), Elle est consommée pour ses bienfaits sur la santé :

- ✓ Antioxydation liée à la phycocyanine ; renforcement du système immunitaire grâce aux polysaccharides ;
- ✓ activité antivirale : liée au sulfoquinovosyldiacylglycerol riche en sulfolipides ;

- ✓ activité antitumorale : liée à la phycocyanine ;
 - ✓ Diminution du taux de cholestérol grâce aux acides gras polyinsaturés omega3 et oméga-6 ;
 - ✓ Amélioration des capacités sportives : par ses teneurs en fer, en vitamine B12, et en β -carotène qui faciliteraient la récupération ;
 - ✓ Lutte contre l'asthénie par son apport en oligoéléments et vitamines ;
 - ✓ Activité anticoagulante liée au Spirulane Calcique (Sp-Ca) et au Spirulane Sodique (Sp-Na)
- (NIANGORAN, 2017).

VIII.3. La spiruline et l'industrie cosmétologique

La spiruline contient suffisamment de vitamines et minéraux nécessaires pour les cheveux, les ongles et la peau, et du coup la peau retrouve sa souplesse, les cheveux retrouvent leur brillance et vigueur, les ongles se fortifient ;

La spiruline agit également en favorisant la cicatrisation grâce à sa forte teneur en chlorophylle ainsi qu'à la présence d'acide gamma-linolénique;

Elle agit aussi sur les peaux ridées qui ont perdues leur élasticité (déficit en élastine) d'où une diminution de la tonicité du tissu conjonctif ; et pour prévenir le vieillissement cutané, les acides gras polyinsaturés de la spiruline présentent une solution intéressante (GOULAMABASSE, 2018).



MATERIEL ET METHODES



I. Matériel végétal

La spiruline utilisée dans notre étude (**figure 07**) provient de la région de Tamanrasset, située à 1824 m d'altitude près de Tamanrasset dans le Sahara Algérien, à la Guelta Taguemart (N 23° 01.- E5°25.473').

Sa production est faite d'une manière artisanale dans la société 'SPIRULINA ALGERIE EURL' qui se trouve dans la wilaya d'Oran. Le spécialiste de la recherche et de développement de la spiruline M.Hiri a choisi un milieu de culture constitué d'eau principalement, de sels minéraux et d'autres composants chimiques (cyanate d'ammonium (urée) : $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, Chlorure de Sodium (NaCl), ...) convenable pour la souche, avec un pH compris entre 7.5 et 9 et une agitation mécanique continue à l'aide d'une pompe à air avec des coupures de 20 minutes de temps en temps. Une fois la biomasse obtenue, la filtration se fait à l'aide d'un système de filtration à l'aide d'un tissu en nylon de grosseur de l'ordre de 30 micron et une pompe à vide ou un récipient, et par raclage délicat, la spiruline est récupérée à l'aide d'une spatule stérile.

Le séchage de la spiruline est fait par atomisation. Cette méthode consiste en une pulvérisation d'un spray de spiruline liquéfié à travers un courant d'air chaud et d'humidité. La spiruline obtenue était sous forme d'une poudre fine, Cette poudre est conservée dans une boîte fermée hermétiquement à l'abri de la lumière, d'air et d'humidité (emballage primaire). Puis mise dans des sacs en papier à l'extérieur de nature opaque (packaging) pour être commercialisée.

La procédure entamée était d'abord la commande de la spiruline en ligne au mois d'Avril et la réception a été faite au mois de Mai.



Figure 7: Emballage de la spiruline reçue

II. Analyses physico-chimiques de la poudre de spiruline

II.1. Détermination du potentiel d'hydrogène pH

➤ Principe

Le pH est basé sur la détermination en unité de la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans le produit à analyser à l'aide d'un pH-mètre.

➤ Mode opératoire

-Dans 100 ml d'eau distillée, on dissout dans un bécher 4 g de spiruline.

-On met cette solution au bain marie pendant 30 minutes.

-Après refroidissement, on mesure le pH avec une sonde préalablement lavée avec de l'eau distillée, puis on la plonge dans la solution à mesurer jusqu'à ce que la valeur se stabilise.

II.2. Taux d'humidité

➤ Principe

Le taux d'humidité consiste à calculer la quantité d'eau évaporée après séchage à 105°C.

➤ Mode opératoire (AOAC, 1999)

-Dans un creuset vide sans couvercle pesé au préalable (soit P_0), on met 2 g de spiruline (soit P_1).

-On couvre partiellement l'échantillon, puis on étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (24 heures), puis on retire le couvercle et on laisse refroidir au dessiccateur. L'échantillon obtenu sera P_2 son poids.

➤ Expressions des résultats

Le taux d'humidité est calculé selon l'équation suivante :

$$H\% = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100$$

Avec :

P_0 : le poids du creuset vide.

P_1 : le poids du creuset avec échantillon avant étuvage.

P_2 : le poids du creuset avec l'échantillon après 24 heures d'étuvage.

II.3. Taux de matière minérale (AOAC, 1980)

➤ Principe

Les cendres représentent le produit résultant de la minéralisation par incinération (combustion) de la matière sèche de l'échantillon dans un four à moufle à 600°C.

➤ Mode opératoire

-La combustion se fait comme suit :

-Le creuset qui a servi à la détermination de la matière sèche est porté au four à moufle pendant 2 heures à température de 600°C.

-On pèse à nouveau après refroidissement au dessiccateur pendant 30 min (soit P_f).
Expressions des résultats

Le taux de la matière minérale est calculé selon l'équation suivante :

$$M.M\% = \frac{P_f - P_0}{P_2 - P_0} \times 100$$

Avec :

P_0 : le poids du creuset vide.

P_2 : le poids du creuset avec l'échantillon après 24 heures d'étuvage.

P_f : le poids du creuset après combustion.

II.4. Taux d'acidité titrable

La détermination de l'acidité est faite selon le protocole d'AKROUR. AISSOU C.2020 travaux pratiques 5^{ème} année biotechnologie marine.

➤ Principe

Titration de l'acidité avec une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphthaléine comme indicateur.

➤ Mode opératoire

-Dans une fiole conique adaptée à un réfrigérant à reflux contenant 50 ml d'eau distillée chaude (bouillie puis refroidie), on met 2.5 g de spiruline puis on mélange jusqu'à obtention d'un liquide homogène qu'on chauffe au bain marie pendant 30 minutes.

- Après refroidissement, on transvase le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de 250 ml, puis on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée et on mélange.

-On prélève 10 ml du filtrat dans 10 ml d'eau distillée auquel on ajoute [0.25 ml - 0.5 ml] de phénol phtaléine tout en agitant.

-A l'aide d'une burette, on verse la solution d'hydroxyde de sodium NaOH 0.1 N jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante pendant 30s.

➤ Expressions des résultats

L'acidité titrable est exprimée en gramme acide citrique selon l'équation suivante :

$$A\% = \left[\frac{250 \times V_1 \times 100}{V_0 \times M_0 \times 10} \right] \times 0.07 = \frac{175 \times V_1}{V_0 \times M}$$

Avec :

M : Masse en gramme de l'échantillon prélevé.

V₀ : Volume en millilitre d'une prise d'essai.

V₁ : Volume en millilitre de l'hydroxyde de sodium.

0.07 : Facteur d'une conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique.

III. Analyses quantitatives par Spectrophotométrie

III.1. Extraction des pigments caroténoïdes

➤ Principe

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée au laboratoire de l'ENSSMAL, la méthode choisie est celle de VICTOR *et al.*, 1995 in AISSOU, 2020 (polycopié des travaux pratiques 4^{ème} année aquaculture).

➤ Mode opératoire

- On extrait 5 g de spiruline à l'aide d'un Buchner sous vide avec 40 ml d'hexane – éthanol (1:1).

-On répète la filtration jusqu'à l'obtention d'un résidu incolore (dans notre cas 8 fois) on ajoute le même volume KOH méthanoïque à 10% au volume du filtrat obtenu puis on le met dans un flacon brun qu'on chauffe au bain marie à 40°C pendant 10 minutes.

-Afin d'interrompre la saponification, le flacon est mis dans un bac de glace.

-Le mélange obtenu est transvasé dans une ampoule à décanter, on y ajoute 25 ml d'hexane et 20 ml d'eau distillée puis on agite légèrement.

-On obtient deux phases : phase organique et phase aqueuse (**Voir annexe figure 4**).

-D'autres extractions sont faites sur la phase aqueuse, en ajoutant 40mL Hexane – Ethanol (1:1), et la phase organique obtenue est rajoutée aux phases organiques obtenues précédemment.

Matériel et méthodes

- A la phase organique, on ajoute 20 ml d'hexane et on la filtre avec un papier Wattman dans un ballon (**Voir annexe figure 5**).

-Ainsi sont obtenues des pigments de caroténoïdes concentrés après évaporation de l'hexane dans le rota vapeur.

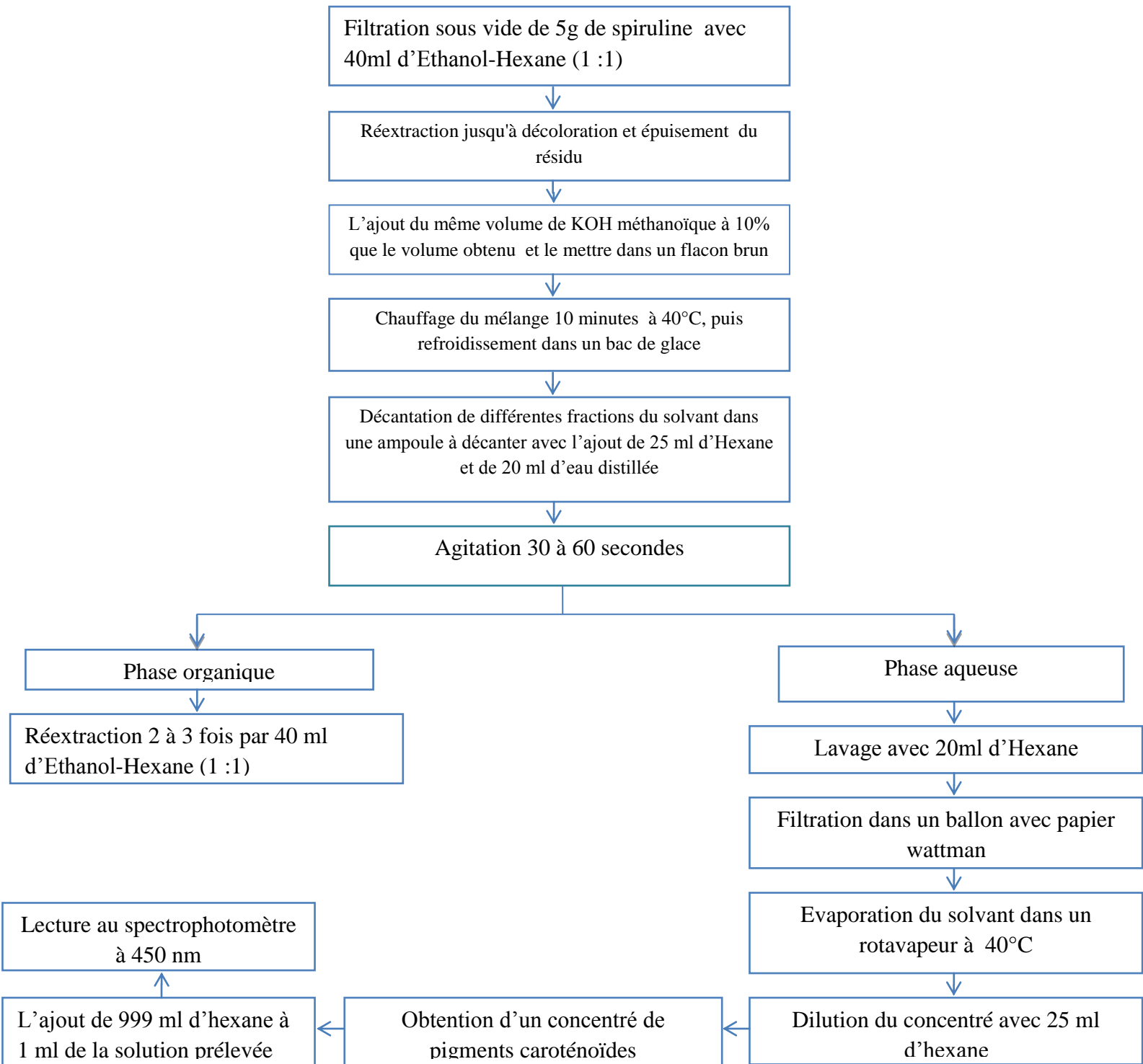


Figure 8: Protocole d'extraction des caroténoïdes (VICTOR *et al.*, 1995 in SADOUN et BENYOUNES; 2005).

➤ Expression des résultats

A partir de la courbe d'étalonnage, on évalue les concentrations en β -carotène des échantillons à une longueur d'onde de 450 nm.

III.2. Extraction des chlorophylles (ZINGA *et al.*, 2016)

➤ Principe

La poudre de la spiruline est mise en contact avec de l'éthanol à 90° qui va la lyser mécaniquement et détruire les membranes des cellules dans le but d'en extraire les organites. La solution chlorophyllienne ainsi obtenue est filtrée et la chlorophylle brute extraite est récupérée.

➤ Mode opératoire

-2 g de poudre de spiruline est mise avec 20 ml d'éthanol à 90° en laissant le mélange à 3 min à l'air libre.

-le liquide est filtré, puis le filtrat est dilué en ajoutant 50 ml d'éthanol à 90°.

-Lire les absorbances à 645 nm et à 663 nm.

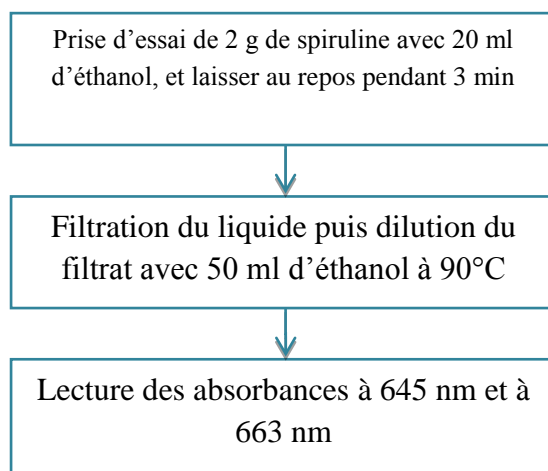


Figure 9 : Extraction de la chlorophylle

III.3. Extraction de la phycocyanine

III.3.1. Méthodes mécaniques

III.3.1.1. Extraction à l'eau

Cette méthode est faite selon le protocole décrit par M'BAYE *et al.*, 2011.

➤ Principe

C'est une décantation en présence de l'eau distillée autour de 4%, qui se base sur la colorimétrie pour mesurer la teneur en pigments.

➤ Mode opératoire

- A l'obscurité, on laisse décanter dans l'eau une suspension de 4% de spiruline qu'on centrifuge à 9000 tours/15 mn à 4°C (**Voir annexe figure 6**).

-On prélève le surnageant qui subira une dilution de 1/100 avec l'eau distillée.

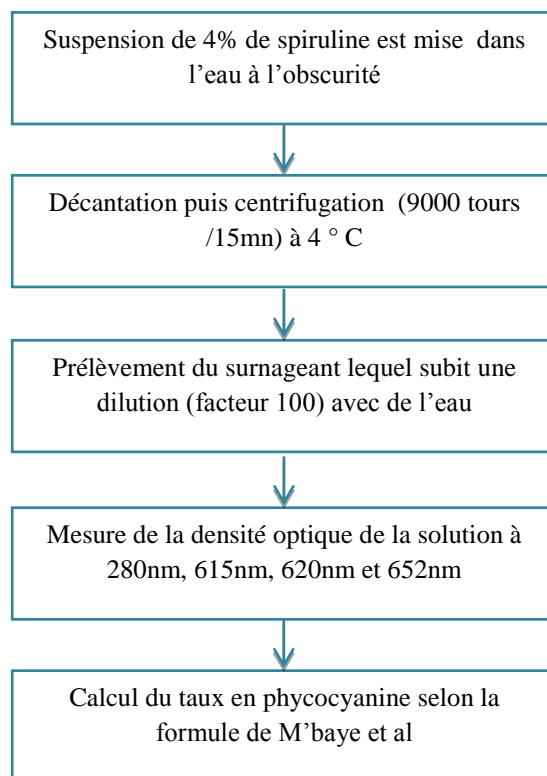


Figure 10: Extraction de la phycocyanine à l'eau

➤ Expression des résultats :

-On mesure la densité optique de la solution à 615 nm, 620 nm, 280 nm, et 280 nm.

-On calcule le taux en phycocyanine selon la formule de M'BAYE *et al* :

$$\% \text{ en phycocyanine} = \frac{1.873 \times (\text{Abs}_{620} - 0.474 \times \text{Abs}_{652}) \times F}{C}$$

Avec :

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

F : facteur de dilution en volume (ml).

III.3.2. Méthodes chimiques

III.3.2.1. Extraction par solvant

Cette méthode est faite selon le protocole de DOKE (2005).

➤ Principe

L'extraction par un solvant est une technique sélective qui repose sur la solubilité des espèces à extraire dans un solvant donné ; le solvant doit alors être non miscible à l'eau, dissoudre facilement l'espèce à extraire, et être liquide à la température de l'extraction (d'où l'appellation liquide liquide). Sa densité nous permet de situer la position de la phase organique pour achever l'extraction.

Lors du contact entre la solution et le solvant d'extraction, l'espèce chimique passe de l'un à l'autre.

➤ Mode opératoire

- 4 g de spiruline est versée dans 120 ml de tampon phosphate, on incube à l'obscurité pendant 12 h à 4 °C pour permettre la lyse des cellules.

-On récupère le surnageant bleu après centrifugation, après on lui rajoute 120 ml du tampon phosphate, et on incube une deuxième fois à l'obscurité pendant 12 h.

-On centrifuge une deuxième fois, et on mélange les deux surnageant afin de lire l'absorbance à 615 nm, à 652 nm, à 620 nm et 280 nm.

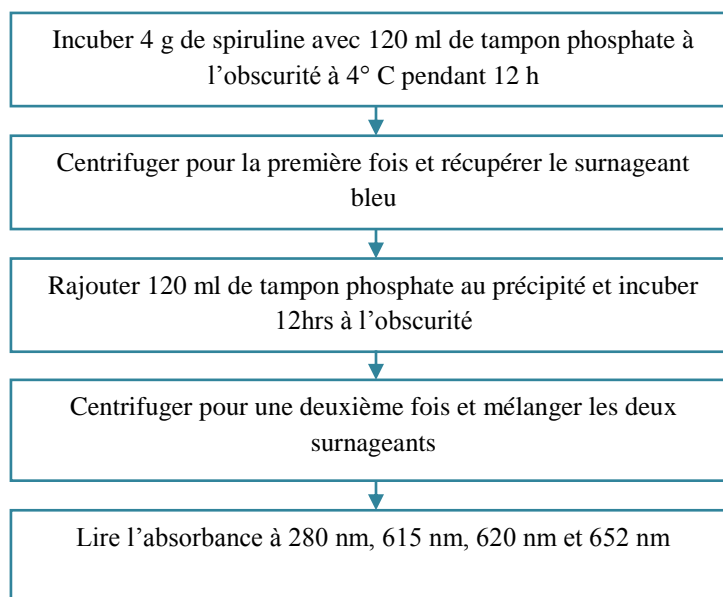


Figure 11 : Extraction de la phycocyanine par solvant

III.3.2.2. Extraction par séparation aqueuse à double phase

Cette méthode est faite selon le protocole de BULGARIU *et al.*, 2008.

➤ Principe

L'extraction de la phycocyanine par la méthode de séparation à double phase implique la séparation des molécules entre deux ou plusieurs phases aqueuses immiscibles. Du polyéthylène glycol (PEG) et des sels phosphate sont ajoutés à une quantité donnée d'extrait frais de phycocyanine. Après mélange et décantation, le système se sépare en deux phases. Ces phases sont ensuite analysées par spectroscopie UV pour estimer la pureté et la quantité de la phycocyanine.

➤ Mode opératoire

- On met une solution de spiruline à l'obscurité (90g de spiruline dans 10 ml d'eau) à laquelle on rajoute une solution de 40% de polyéthylène glycol (40 g dans 60 ml d'eau) et une solution de 20% de sels de phosphates (10 g de K_2HPO_4 et 10 g de KH_2PO_4 dans 60 ml d'eau) (on a utilisé une solution glucosée : 20 g de glucose dans 80 ml d'eau). (**Voir annexe figure 7**).

- Avec la méthode d'Alberston, on a prélevé 1g de 40 % (1/1) de PEG, 1,25 g de 20 % (1/1) de sels phosphates + 0.5 g de spiruline et 2.25 ml d'eau.

-Après mélange, le composé est mis à l'obscurité dans un agitateur pendant 20 minutes. On procède à une centrifugation, puis à la mesure des volumes de phases et on lit l'absorbance à 280 nm, à 615 nm, à 620 nm et à 652 nm.

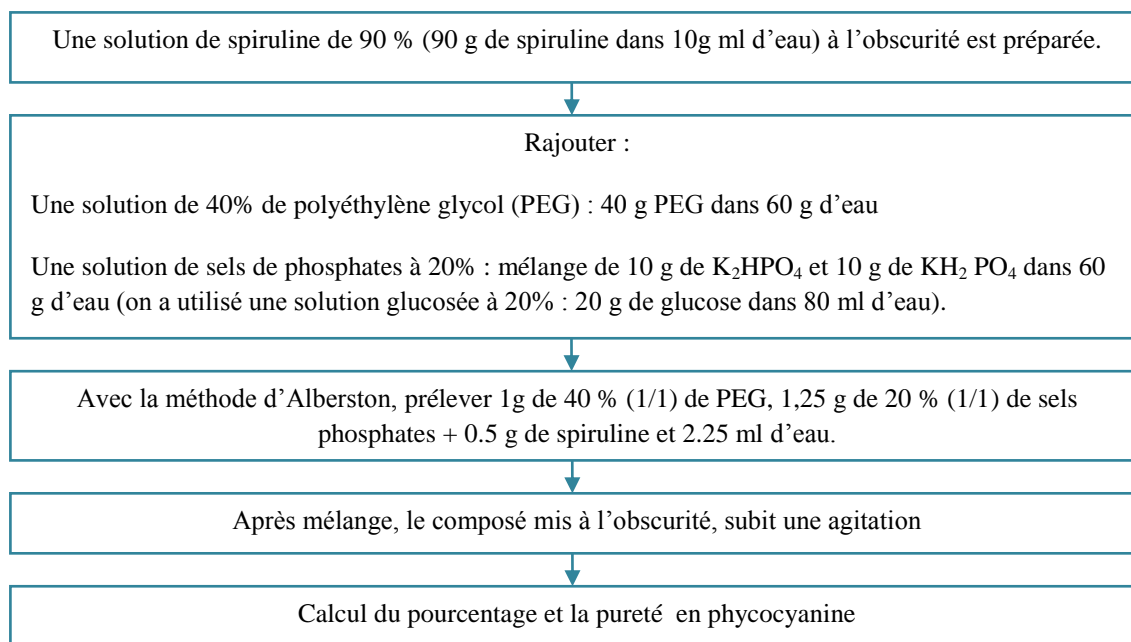


Figure 12 : Extraction de la phycocyanine par séparation aqueuse à double phase

➤ Expression des résultats

Le calcul du pourcentage et de la pureté de la phycocyanine extraite par solvant et par séparation aqueuse à double phases est fait selon l'équation de BENNETT et BOGORAD (1973)

$$\text{PC (mg/ml)} = (\text{Abs}_{615} - 0,474 \times \text{Abs}_{652}) / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : $\text{Abs}_{620} / \text{Abs}_{280}$.

Avec :

Abs à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine.

Abs à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

III.4. Dosage par spectrophotométrie des différents pigments de la spiruline

Le dosage quantitatif des différents pigments de la spiruline par spectrophotométrie a été réalisé au laboratoire LBCM2 de l'ENSSMAL.

➤ Principe

Le principe de la spectrophotométrie est basé sur la loi de Beer-Lambert : la densité optique d'une solution d'une substance absorbante dans un solvant non absorbant est proportionnelle à l'épaisseur de la solution traversée et à la concentration de la solution.

➤ Expression des résultats

$$D.O = \epsilon \cdot I.C.$$

Avec :

D.O : densité optique (nm).

C : concentration molaire volumique (mol /l).

ϵ : coefficient d'extinction molaire, fonction de λ .

La loi de Beer-Lambert est valable si les solutions sont très diluées.

III.4.1. Dosage des caroténoïdes

➤ Mode opératoire :

-L'extrait sec de caroténoïde est récupéré avec 25 ml d'hexane (**Voir annexe figure 8**).

Préparation de la gamme étalon (BENK, 1960) in AKROUR. AISSOU.,2020

-La solution de bichromate de potassium standard est préparée par dissolution de 0.0036 g dans 100 ml, chaque ml de la solution correspond à 0.0266 mg de caroténoïdes totaux calculés comme β – carotène (**Voir annexe figure 9**).

-La concentration de la solution sera donc 26.6 mg/l de caroténoïdes, à partir de laquelle on prépare les différents standards aux différentes concentrations (mg/l) : 1, 2, 5, 10, 15 mg/l (**Voir annexe figure 10**).

-On dilue 1000 fois chaque un de nos échantillon afin qu'il fasse partie de l'intervalle de la gamme étalon préparée.

-On met dans une cuve une quantité de chaque standard puis on l'introduit dans un spectrophotomètre visible /UV, après avoir régler la longueur d'onde à 450 nm qui correspond au maximum d'absorbance du β carotène.

III.4.2. Dosage de la chlorophylle

Pour y procéder, on dilue 1 ml de l'extrait dans 9 ml d'éthanol 90°.

III.4.3. Dosage de la phycocyanine

Les diluants dépendent de la méthode utilisée pour extraire la phycocyanine brute.

➤ Mode opératoire

-Pour y procéder, on prélève 1 ml de chaque extrait qu'on le dilue soit avec

- 99 ml d'eau ;
- 99 ml de tampon phosphate ;
- 99 ml de solution phosphate ou de solution glucosée.

-On prend une quantité de chaque un des trois standard, qu'on met dans une cuve à spectrophotomètre visible /UV afin de lire les absorbances à des longueurs d'ondes prédéfinies (à 280 nm, à 615 nm, à 620 nm et à 652 nm).

IV. Analyse qualitatives spectrale

L'analyse qualitative pour identifier les différents spectres a été réalisée au laboratoire LBCM2 de l'ENSSMAL.

IV.1. Identification des différents spectres des pigments de la spiruline

En absence d'un spectrophotomètre à balayage nous avons procédé à déterminer les différents spectres des pigments extraits en traduisant leurs données de dosage quantitatif sous forme de balayages allant respectivement de [400 nm – 700 nm], [400 nm – 700 nm] et de [200 nm – 800 nm] pour chaque un des pigments caroténoïdes, chlorophylles et phycocyanine.

IV.2. Identification des différents pigments de la spiruline par séparation sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince utilisée dans notre travail pour identifier les différents pigments contenus dans notre spiruline, a été réalisée au niveau du laboratoire LBCM2 de l'ENSSMAL.

IV.3. Séparation des pigments de la spiruline sur couches imprégnées par l'huile de paraffine (AISSOU, 2020)

➤ Principe

Dans notre cas, on parle de chromatographie de partage du fait qu'on se trouve en présence d'une phase stationnaire non polaire (paraffine liée au support) et une phase mobile polaire (solvant).

La phase stationnaire est composée d'une couche solide sur laquelle est déposé un gel de silice servant de support et la phase mobile est constituée d'un éluant qui sépare les différents pigments. Plusieurs gouttes de solution de pigments : caroténoïdes, chlorophylles et phycocyanine sont déposées sur la phase stationnaire à l'aide d'une micropipette pour former des taches. La plaque de silice est mise en contact avec la phase mobile qui va migrer et entraîner les pigments par capillarité.

Une fois que la migration est terminée, on obtient plusieurs taches colorées sur la plaque de silice correspondantes aux différents composants des pigments.

➤ Mode opératoire

-On plonge une plaque chromatographique prête à l'emploi dans une cuve contenant une solution de l'huile de paraffine épaisse à 8% dans l'éther de pétrole.

- A 3 cm du bord supérieur du front, on stoppe l'imprégnation.

-On laisse la plaque séchée 24 h environ à l'air libre (pour que l'éther de pétrole soit éliminé complètement avant la chromatographie). Puis la découper en deux bandes 15cm de long et 8cm de large.

-On trace 2 cm dans les parties non imprégnées sur lesquelles on dépose une goutte de chaque solution de pigments à l'aide d'une micropipette, le séchage se fait à l'air libre.

-Par la suite, on plonge les deux bandes dans des cuves en position verticale contenant deux systèmes de solvants bien déterminés : méthanol/acétone (5;2), et méthanol/acétone/eau (20 ; 4 ; 3) à 1cm du bord inférieur des plaques (parties non imprégnées), puis on ferme les cuves pour qu'elles soient saturées de vapeurs des solvants.

-On arrête la migration à 10 cm du bord supérieur (front de solvant), on laisse sécher à l'air libre.

-On cerce chaque tache et on pointe son centre à partir duquel on calcule le rapport frontal (RF).

➤ Expression des résultats

Le rapport frontal est calculé comme suit :

$$RF = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$

Avec : $0 \leq RF \leq 1$.

Si $RF = 0$: la substance reste au point de départ (pas d'affinité pour le solvant).

Si $RF = 1$: la substance est totalement entraînée par le solvant jusqu'au front.

V. Evaluation de la qualité microbienne de la spiruline

Les analyses microbiologiques ont été effectuées au niveau du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire 1 (LBCM1) de l'ENSSMAL.

Pour la préparation de la suspension mère, nous avons préparé de façon aseptique, une solution ayant une dilution de 1/10 (1 g d'échantillon auquel 9 ml d'eau physiologique stérile ont été ajoutés). Différentes dilutions décimales sont retenues (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) pour les analyses.

V.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) selon la norme NFV08-051 (Anonyme, 1992 in AOUIR, 2017)

Pour cela, on transfère 0,1 ml des différentes dilutions décimales retenues (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) dans les boîtes de pétri de diamètre de 90 mm, on rajoute 15 ml environ du milieu Plate Count Agar (PCA). Après solidification, une deuxième couche de gélose est déposée en surface. On incube les boîtes de Pétri à 30 °C pendant 72 heures. Seules les colonies blanchâtres situées entre les 2 couches de PCA sont prises en compte. On retient pour le dénombrement, les boîtes de Pétri contenant un nombre compris entre 30 et 300 colonies.

V.2. Dénombrement de la flore fongique (FF)

Il concerne les levures et les moisissures. Le milieu utilisé pour le dénombrement des levures et des moisissures est Sabouraud Chloramphenicol (en annexe tableau 3). Le milieu est coulé et refroidi dans des boîtes de Pétri. 0,1 ml des dilutions sont étalés à la surface de la gélose. Après 5 jours d'incubation à 25 °C, on retient les boîtes contenant moins de 150 colonies.

V.3. Dénombrement des coliformes totaux (CT)

Le milieu désoxycholate lactose agar (1%) a été utilisé. 1 ml d'une dilution est prélevé et ensemencé dans la gélose en surfusion. Les incubations sont faites à 30 °C et les lectures après

48 heures. Le nombre total de germes est exprimé en unité formante colonies par gramme de produit (UFC/g).

V.4. Expression des résultats

Le calcul du nombre N de micro-organismes (FMAT, FF et CT) par g de produit est obtenu à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1n_2) \times d}$$

ΣC : somme des colonies comptées sur les boîtes retenues.

d : taux de dilution correspondant à la première dilution.

n_1 : nombre des boîtes de pétri comptées pour la première dilution.

n_2 : nombre des boîtes de pétri comptées pour la deuxième dilution.

VI. Détermination des activités thérapeutiques de la spiruline

L'activité antioxydante et antibactérienne ont été réalisés à l'université de Saida "Dr. Moulay Tahar " faculté des sciences département de biologie respectivement au niveau du laboratoire de chimie et laboratoire de biotoxicologie, pharmacognosy et valorisation biologique des plantes (LBPVBP) .

VI.1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de la spiruline a été mesuré par la méthode au 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH).

➤ Principe

Le procédé de piégeage des radicaux libres du 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyle (ou DPPH) constitue la première approche pour évaluer le potentiel antioxydant d'un composé, d'un extrait ou d'autres sources biologiques dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). C'est un test qui mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle.

➤ Mode opératoire

- Préparation de la solution alcoolique de DPPH

-Pour cela on prépare 100 ml d'une solution 60 μm de DPPH qui correspond approximativement à 2.4 mg = 0.0024 g de DPPH dans 100 ml de méthanol (**Voir annexe figure 11**).

- Préparation de l'extrait méthanolique

-On macère 40 mg de poudre de spiruline dans 20ml de méthanol pendant 10mins à température ambiante, après filtration on récupère l'extrait verdâtre.

- Mesure de l'activité

-Selon le protocole décrit par Mansouri *et al.*, (2005) :

-100 µl des solutions d'extraits de spiruline à différentes concentrations (125 µg/ml, 250µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) ont été ajoutés à 1300 µl de DPPH.

-Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 µl de méthanol (sans extrait) avec 1300 µl de la solution méthanolique de DPPH.

- La lecture de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant de synthèse qui est l'acide ascorbique (antioxydant standard) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Chaque test a été réalisé en deux répétitions.

-L'activité antioxydante est exprimée en concentration d'inhibition (IC₅₀), définie comme étant la concentration de l'extrait nécessaire pour provoquer une diminution de 50% de l'absorbance du radical DPPH (515 nm). On détermine, à partir du graphe, le pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration de l'extrait. Des valeurs d'absorbance plus faibles du mélange réactionnel indiquent une activité piégeage des radicaux libre plus élevée (AOUIR , 2017).

➤ Expression des résultats

-L'activité anti radicalaire est révélée par la diminution de l'intensité de la coloration du mélange qui est exprimée en pourcentage d'inhibition et calculée selon la formule :

$$PI = \frac{(DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait})}{DO \text{ témoin}} \times 100$$

Avec :

PI : Pourcentage d'inhibition.

D₀ témoin : Absorbance du témoin négatif.

D₀ extrait : Absorbance de l'extrait.

VI.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait de la spiruline contre les deux souches bactériennes choisies est évaluée par la technique de diffusion sur milieu solide (ou la méthode des disques).

Les bactéries de références utilisées sont :

Staphylococcus aureus ATCC 33862 et *E. coli* ATCC 25922 proviennent du laboratoire LBPVBP.

➤ Principe

L'aromatogramme appelée aussi antibiogramme est une technique utilisée en bactériologie médicale, elle se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu de culture solide, qui a été ensemencé avec l'inoculum. La méthode est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque.

➤ Mode opératoire

- Revivification des souches

-Les souches identifiées et conservées sur des milieux spécifiques (géloses inclinées) ont été revivifiées sur bouillon nutritif.

-La revivification consiste à prendre cinq colonies des tubes contenant les souches conservées et les mettre dans un tube à essai stérile contenant 5ml de bouillon nutritif préalablement préparé. Après incubation à 37°C (température optimale de croissance de ces bactéries) pendant 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble dans le milieu.

- Purification des souches

-L'étape de purification consiste à réaliser un isolement par stries à partir du bouillon d'enrichissement sur gélose spécifique (Mueller-Hinton) préalablement coulée sur des boîtes de pétri. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 heures. L'obtention de colonies de même taille et de même aspect après étuvage, renseigne sur la pureté des souches.

- Préparation de l'extrait de spiruline (CHAKRABORTY *et al.*, 2015)

-5 g de poudre de spiruline a été dissoute dans 100 ml d'eau distillée dans une fiole conique et agités régulièrement pendant six heures, puis maintenus au repos pendant 18 heures. Le macérât ainsi obtenu a été filtré avec du papier filtre Wattman n ° 1 et le filtrat a été recueilli dans un ballon propre. Environ 25 ml du filtrat ont été prélevés dans un bol en porcelaine propre et laissés sécher dans un incubateur à 40 °C.

- Préparation de la suspension bactérienne

Elle est réalisée dans une solution saline stérile de 0.9% de NaCl avec une turbidité de 0.5 de la gamme de Mc Farland ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \cdot 10^8$ UFC/ml (l'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0.08 et 0.13).

- Détermination de l'activité antibactérienne

-1 ml d'eau distillée stérile est ajouté à 0.5 g de l'extrait sec de la spiruline, on obtient un extrait aqueux qu'on filtre à l'aide d'un filtre seringue à 0.22 μm .

-Prélever 1ml du filtrat et le mettre dans 8 tubes préalablement remplis avec 1ml d'eau distillée stérile allant de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} .

-Imbiber les disques stériles de papier Wattman de 8 mm de diamètre avec 15 μl de l'extrait aqueux et les déposer sur la surface des boîtes de pétri contenant les souches bactériennes ensemencées.

-Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures. (CHAKRABORTY *et al.*, 2015).

- **Expression des résultats**

Les résultats obtenus seront exprimés en diamètre de zones d'inhibition produites autour des disques (CHAKRABORTY *et al.*, 2015).



RESULTATS ET DISCUSSION



I. Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de spiruline

I.1. Potentiel d'hydrogène pH

La mesure du pH est présentée dans la figure ci-dessous



Figure 13 : Mesure du pH

Les valeurs de pH obtenues des trois essais sont présentées dans le tableau suivant

Tableau 6: Valeurs de pH de la poudre de spiruline

Essais	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai
pH	7.72	7.67	7.84

-Le pH moyen de la poudre de spiruline est de 7.74 légèrement alcalin conforme au milieu dans lequel est cultivée la spiruline. Effectivement, nos résultats concordent avec ceux de DOUMANDJI *et al.*, 2012. Ce milieu très alcalin présente deux avantages majeurs

Meilleure absorption du gaz carbonique de l'air et une protection contre les contaminations (JOURDAN, 2012).

Ce pH alcalin est dû aux conditions de culture : séchage à température basse qui convient à la micro algue. Sachant que lorsque elle est séchée à de fortes températures (60°C à 65°C) puis réhydratée, le pH devient acide (jusqu'à la valeur de 5) et là les cellules de la spiruline éclatent (JOURDAN, 2012).

I.2. Taux d'humidité

Les creusets contenant la poudre de la spiruline obtenus après 24 h d'étuvage sont illustrés dans la **figure 14**.



Figure 14 : Poudre de spiruline après 24 h d'étuvage

Les poids des creusets vides obtenus après la pesée sont les suivants

Tableau 7: Poids des creusets vides

Creusets	Creuset 1	Creuset 2	Creuset 3
Poids P_0 (g)	65.44951	61.42627	64.21682

Les poids des creusets contenant l'échantillon après la pesée sont les suivants

Tableau 8 : Poids des creusets + échantillon

Creusets	Creuset 1	Creuset 2	Creuset 3
Poids P_1 (g)	67.45602	63.43082	66.21759

Les poids des creusets contenant l'échantillon après 24 heures sont les suivants

Tableau 9 : Poids des creusets + échantillon après 24 heures

Creusets	Creuset 1	Creuset 2	Creuset 3
Poids P_2 (g)	67.36854	63.33678	66.12901

Les taux d'humidité sont exprimés dans le tableau suivant

Tableau 10 : Taux d'humidité dans chaque creuset

Creusets	Creuset 1	Creuset 2	Creuset 3
Taux d'humidité %	4.359808822	4.691327231	4.427295491

Le taux moyen de l'humidité obtenu est de 4.493%, selon JOURDAN, 2012, ce résultat inférieur à 9% confère à la poudre de spiruline un long délai de conservation.

Cette faible teneur confirme les bonnes conditions de séchage (à température basse) sans risque de fermentation.

I.3. Taux de matière minérale

La combustion de la poudre de spiruline séchée après passage au four à moufle à 600°C est montrée dans la **figure 15**.



Figure 15 : Creusets après combustion

Les poids des creusets après combustion sont enregistrés dans le tableau ci joint

Tableau 11 : Poids du creuset après combustion

Creusets	Creuset 1	Creuset 2	Creuset 3
Poids P_f	65.58064	61.55484	64.34615

Les taux de la matière minérale sont exprimés dans le tableau suivant

Tableau 12 : Taux de matière minérale dans chaque creuset

Creusets	Creuset 1	Creuset 2	Creuset 3
Taux de matière minérale %	6.833114	6.729617	6.763449

-Le taux moyen de la matière minérale de la spiruline est de 6.775% ce qui explique sa richesse en sels minéraux (JOURDAN, 2006).

I.4. Taux d'acidité titrable

Le titrage de la solution de spiruline avec le phénol phtaléine a entraîné un virage de couleur de vert en rose comme le montre la **figure 16**.



Figure 16 : La solution de spiruline après titrage

Les volumes titrés de NaOH sont comme suit :

Tableau 13 : Volumes titrés de NaOH en ml

Essais	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai
Volumes de NaOH (ml)	2.8	1.9

Les taux d'acidité sont exprimés dans le tableau suivant

Tableau 14 : Taux d'acidité titrable

Essais	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai
Taux d'acidité titrable (%)	9.8	6.65

-Le taux moyen de l'acidité titrable de la spiruline est de 8.225%, car sa composition est riche en acides organiques (ELYAH, 2003).

II. Dosage par spectrophotométrie des différents pigments de la spiruline

II.1. Caroténoïdes

L'extrait concentré de caroténoïdes après évaporation de l'hexane dans le rota vapeur est montré dans la **figure 17**



Figure 17 : Pigment caroténoïde concentré

A partir de la courbe d'étalonnage, on évalue la concentration en caroténoïdes (représentée par le β -carotène) correspondante au maximum d'absorbance (450 nm).

Tableau 15 : Concentrations et absorbances des caroténoïdes pour le tracé de la courbe d'étalonnage.

Concentrations (mg/l)	1	2	5	10	15
Valeurs d'absorbance à 450 nm	0.05	0.063	0.115	0.2	0.285

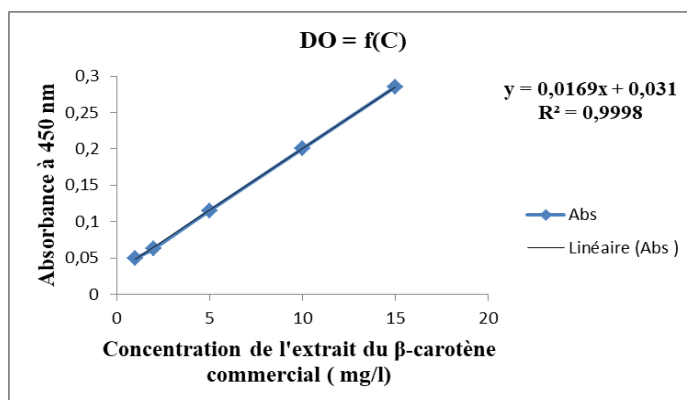


Figure 18 : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre pour les caroténoïdes

La droite obtenue pour les caroténoïdes a pour équation $y = 0.0169x + 0.031$ avec un R^2 de 0.9998.

L'extraction des caroténoïdes par la méthode de VICTOR *et al* (1995), nous a permis d'avoir une concentration en caroténoïdes totaux égale à 42 mg/100 g.

-Selon la littérature, on remarque que cette teneur est inférieure à celles trouvées respectivement (70-170 mg / 100 g de matière sèche) et (370 mg / 100 g) d'après FALQUET ; 1996 CHARPY *et al* ; 2008. Ceci peut être dû à la présence d'autres pigments comme les chlorophylles, qui gênent et modifient l'absorbance des caroténoïdes et leur concentration.

II.2. Chlorophylle

L'extrait de la chlorophylle diluée est montré dans la **figure 19**.



Figure 19: Extrait de la chlorophylle diluée

La lecture des absorbances est représentée dans le tableau suivant

Tableau 16 : Lecture des absorbances de la chlorophylle.

Absorbances (nm)	645	663
DO (nm)	0.272	0.969

II.3. Phycocyanine

➤ Extraction à l'eau

L'extrait de la phycocyanine à l'eau est figuré ci-dessous



Figure 20: Phycocyanine extraite par l'eau

La lecture des absorbances est représentée dans le tableau suivant

Tableau 17 : Absorbances de la phycocyanine extraite à l'eau

Absorbances (nm)	280	615	620	652
DO (nm)	0.567	0.250	0.250	0.132

➤ Extraction au solvant

L'extrait de la phycocyanine fait par solvant est figuré ci-dessous



Figure 21 : L'extrait de phycocyanine par l'extraction par solvant

La lecture des absorbances est représentée dans le tableau suivant

Tableau 18 : Absorbances de la phycocyanine extraite par le solvant

Absorbances (nm)	280	615	620	652
DO (nm)	0.535	0.125	0.137	0.083

- Extraction par séparation aqueuse à double phase
 - Solution phosphate

La lecture des absorbances est représentée dans le tableau suivant

Tableau 19 : Absorbances de la phycocyanine extraite par séparation aqueuse à double phase (solution phosphate).

Absorbances (nm)	280	615	620	652
DO (nm)	3	0.345	0.341	0.167

- Solution glucosée

L'extrait de la phycocyanine extraite par la solution glucosée est montré dans la **figure 22**.

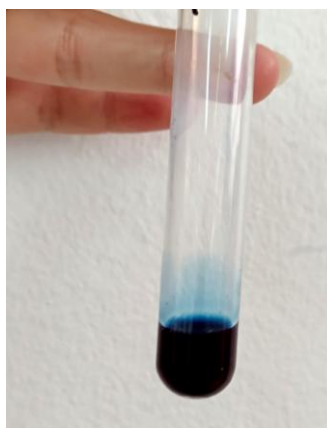


Figure 22 : Phycocyanine extraite par la solution glucosée

La lecture des absorbances est représentée dans le tableau suivant

Tableau 20: Absorbances de la phycocyanine extraite par séparation aqueuse à double phase (solution glucosée)

Absorbances (nm)	280	615	620	652
DO (nm)	3	0.660	0.665	0.362

Les concentrations et les degrés de pureté de la phycocyanine obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont représentés dans le tableau suivant

Tableau 21 : Valeurs des concentrations et des degrés de pureté de la phycocyanine selon les méthodes d'extraction

Méthodes d'extraction	Concentrations (mg/ml)	Degrés de pureté
Eau	0.088	0.441
Solvant	0.016	0.256
Séparation aqueuse à double phase (solution glucosée)	0.091	0.221

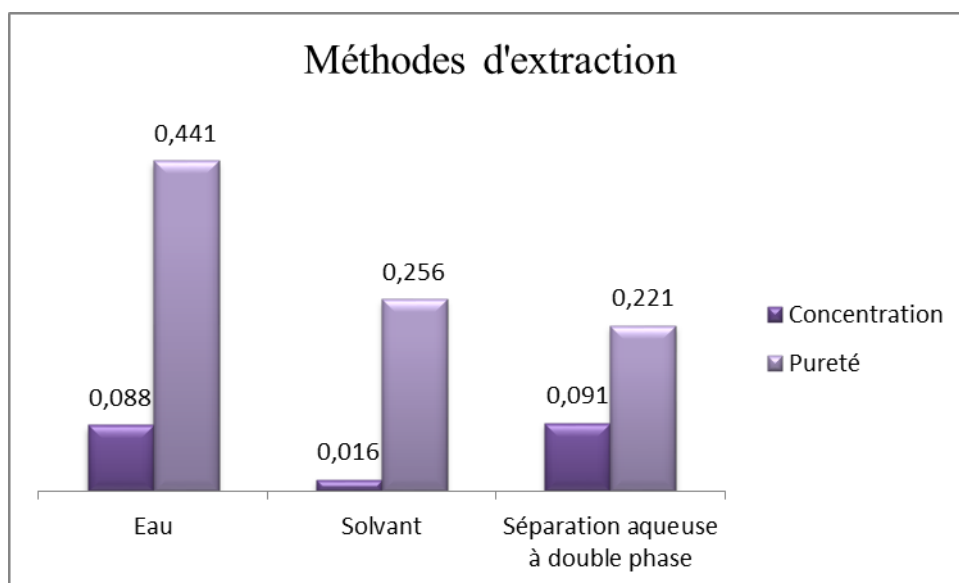


Figure 23 : Concentrations (mg/ml) et degrés de pureté de la phycocyanine selon les modes d'extraction.

La concentration ainsi que le degré de pureté de la phycocyanine varient en fonction de la méthode d'extraction.

Nous remarquons que la concentration varie entre 0.016 mg/ml et 0.091 mg/ml, et que l'extraction par séparation aqueuse à double phase en présence de solution glucosée a donné une concentration élevée de 0.091 mg/ml en phycocyanine par comparaison aux autres méthodes utilisées, et un degré de pureté faible de 0.221. Cela pourrait être expliqué par la présence d'autres molécules dans notre échantillon.

En revanche, l'extraction par solvant a donné un degré de pureté de 0.256 et une concentration extrêmement faible de 0.016 mg/ml, ceci peut être dû aux conditions de manipulation (durée de la manipulation, hypersensibilité de la phycocyanine à la lumière, à l'air) ou bien aux conditions de conservation de notre échantillon.

Tandis que, l'extraction à l'eau a donné une concentration de 0.088 mg/ml, et un degré de pureté de 0.441 supérieur aux autres méthodes (solvant, séparation aqueuse à double phase). Ce résultat est au voisinage de 0.7 selon la littérature la phycocyanine est donc de grade alimentaire, 3.9 de grade réactif et supérieur à 4 de grade analytique (RITO *et al.*, 2001 in LAFRI 2017).

En comparant nos résultats avec ceux de BOUDAIFA et SI BACHIR., (2020), on remarque que leurs valeurs sont plus élevées que les nôtres (**Figure 24**), concernant les mêmes méthodes utilisées dans leur travail.

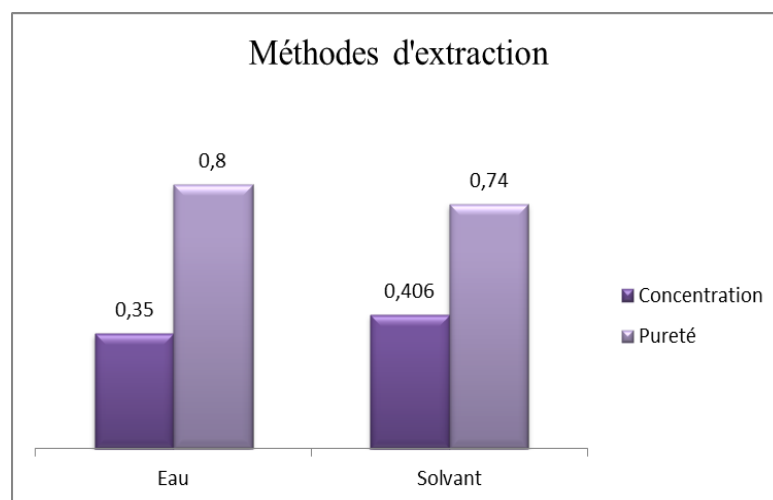


Figure 24 : Concentrations de la phycocyanine (mg/ml) et degré de pureté selon les modes d'extraction selon BOUDAIFA et SI BACHIR., 2020 (modifié).

D'après nos résultats, les valeurs obtenues par séparation aqueuse à double phase sont de concentrations (0.091mg/ml), et un degré de pureté de 0.221. En comparant nos résultats avec les leurs, on constate que leur concentration est plus élevée (0.406 mg/ml) avec un degré de pureté de 0.74 obtenus par la méthode solvant.

Le degré de pureté de la phycocyanine obtenu par l'extraction à l'eau dans leur étude équivaut deux fois le nôtre. Concernant la concentration en phycocyanine obtenue par cette méthode (0.088 mg/ml) est inférieure à la leur (0.35 mg/ml).

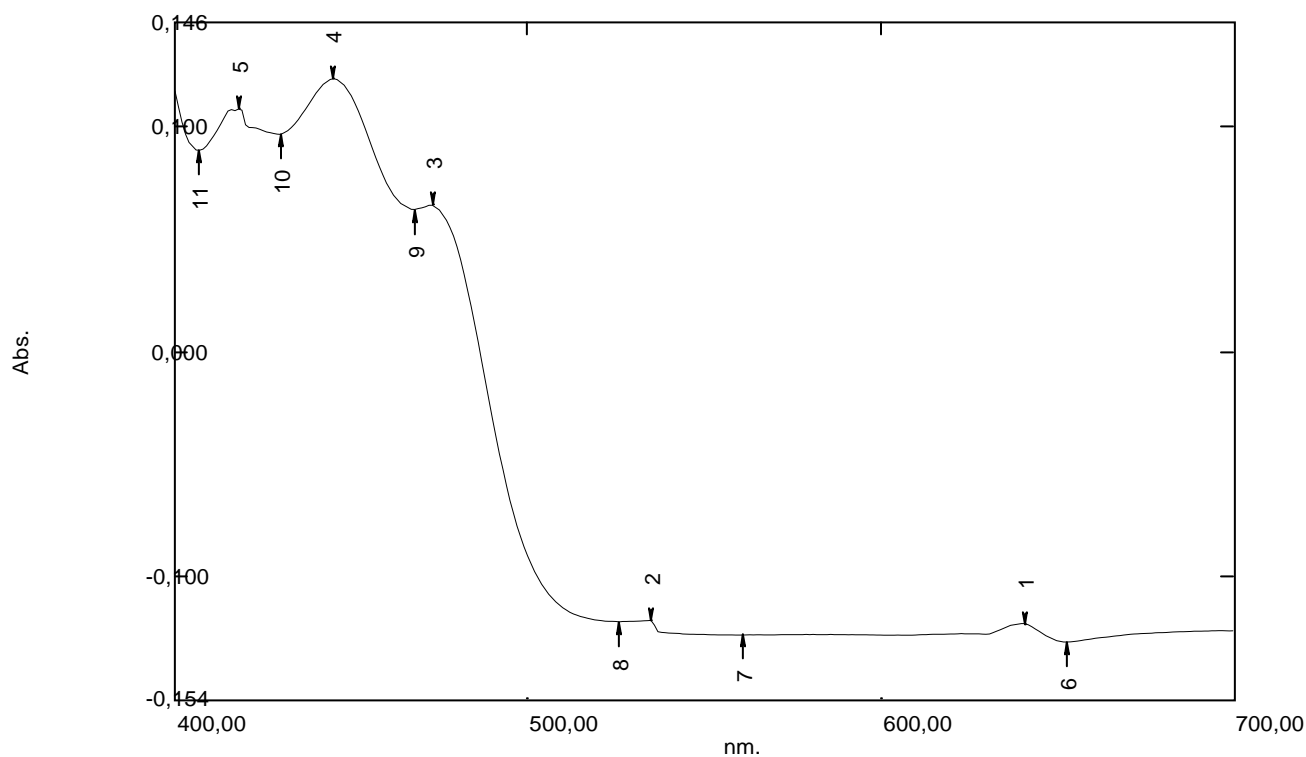
Cette différence de résultats (concentration et degré de pureté) obtenus peut être dû aux nombreux facteurs qui peuvent influencer la composition biochimique lors de la culture, la récolte ou le conditionnement de la spiruline. Comme cela pourrait être dû aux mauvaises conditions de croissance.

III. Identification des différents pigments de la spiruline par absorption spectrale

Les différents spectres obtenus en fonction des différentes absorbances des pigments (Caroténoïdes, chlorophylle, et phycocyanine), correspondantes aux différentes longueurs d'ondes sont présentés comme suit.

Par manque de pigments purs comme étalons, nous avons identifié ces différents pigments par rapport à la littérature (JUN, 2015 ; RODRIGUEZ, 2001).

III.1. Caroténoïde



jNo.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	641,00	-0,121
2	↑	535,00	-0,119
3	↑	473,00	0,065
4	↑	445,00	0,121
5	↑	418,00	0,108
6	↓	653,00	-0,129
7	↓	561,00	-0,126
8	↓	526,00	-0,120
9	↓	468,00	0,063
10	↓	430,00	0,096
11	↓	407,00	0,089

Figure 25 : Spectre d'absorption des caroténoïdes.

L'identification des différents spectres par spectrophotométrie a montré qu'on a différents pics qui absorbent à des longueurs d'ondes différentes

Tableau 22 : Pigments identifiés aux différentes longueurs d'onde

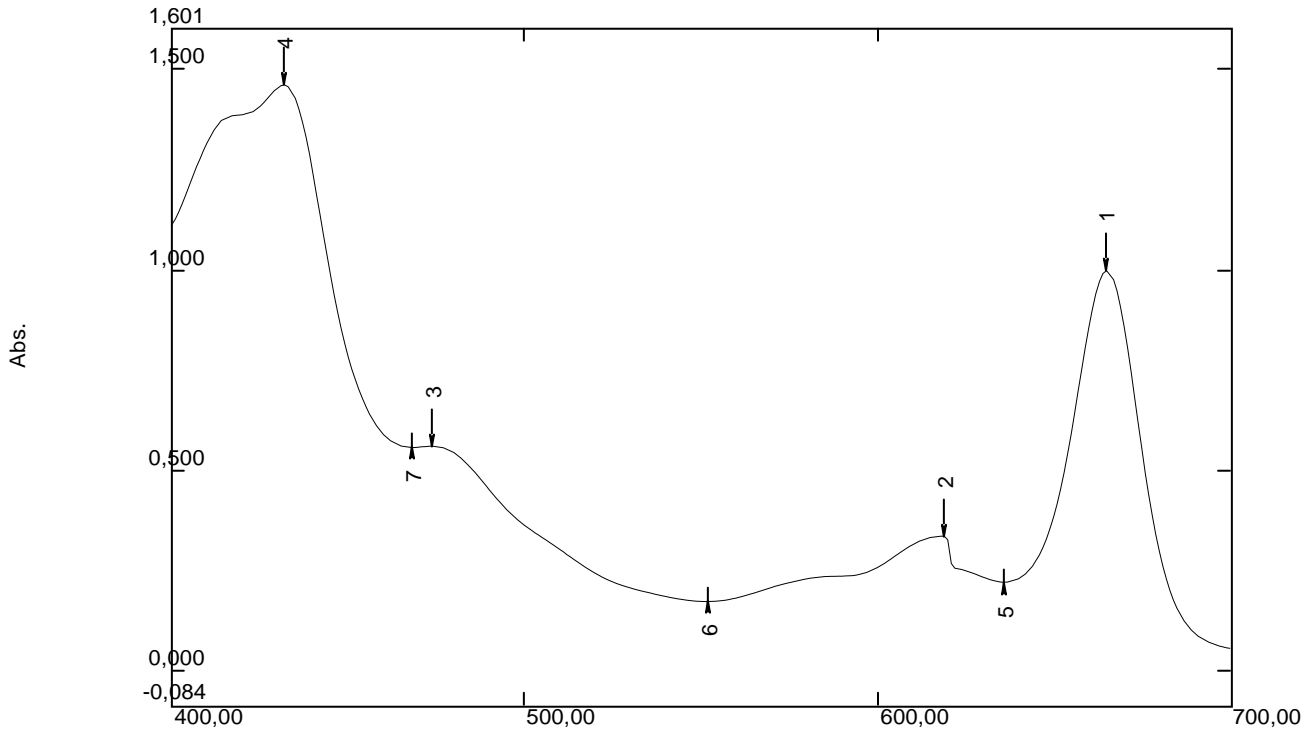
Longueur d'onde (nm)	Absorbance (DO)	Longueur d'onde de la littérature	Pigment identifié	Références
641	-0.121	-	-	-
535	-0.19	-	-	-
473	0.065	[448 nm -476 nm] [461 nm -491 nm] 477 nm	α carotène γ carotène β carotène	JUIN, 2015
445	0.121	[438 nm – 466 nm] [440 nm – 470 nm]	Vauchiéroxanthine (xanthophylles) ϵ carotène	JUIN, 2015
418	0.108	425	β carotène	RODRIGUEZ, 2001.

Ces différents pigments identifiés dans la spiruline étudiée se résument comme suit : on a le α carotène, γ carotène, β carotène, vauchiéroxanthine (xanthophylles), ϵ carotène ce qui confirme la richesse de la spiruline par rapport aux caroténoïdes.

Nous n'avons pas pu identifier les pigments correspondant aux longueurs d'onde 641 nm et 535 nm par manque des données correspondant à leurs absorbances dans la littérature.

On observe l'absence totale du lycopène et echinénone supposé faire partie des caroténoïdes de la spiruline.

III.2. Chlorophylle



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	665,00	0,998
2	↑	619,00	0,336
3	↑	474,00	0,560
4	↑	432,00	1,460
5	↓	636,00	0,221
6	↓	552,00	0,173
7	↓	468,00	0,557

Figure 26: Spectre d'absorption de la chlorophylle

L'identification des différents spectres a montré

-Un maximum d'absorbance à 665 nm sensiblement proche de 660 nm selon CERE *et al.*, 2014, et selon JUIN, 2015 à 662 nm, elle peut correspondre à la chlorophylle a.

-Une autre absorbance de 619 nm avoisinant les [452 nm – 626 nm] qui peut correspondre à la chlorophylle c₃ selon JUIN, 2015.

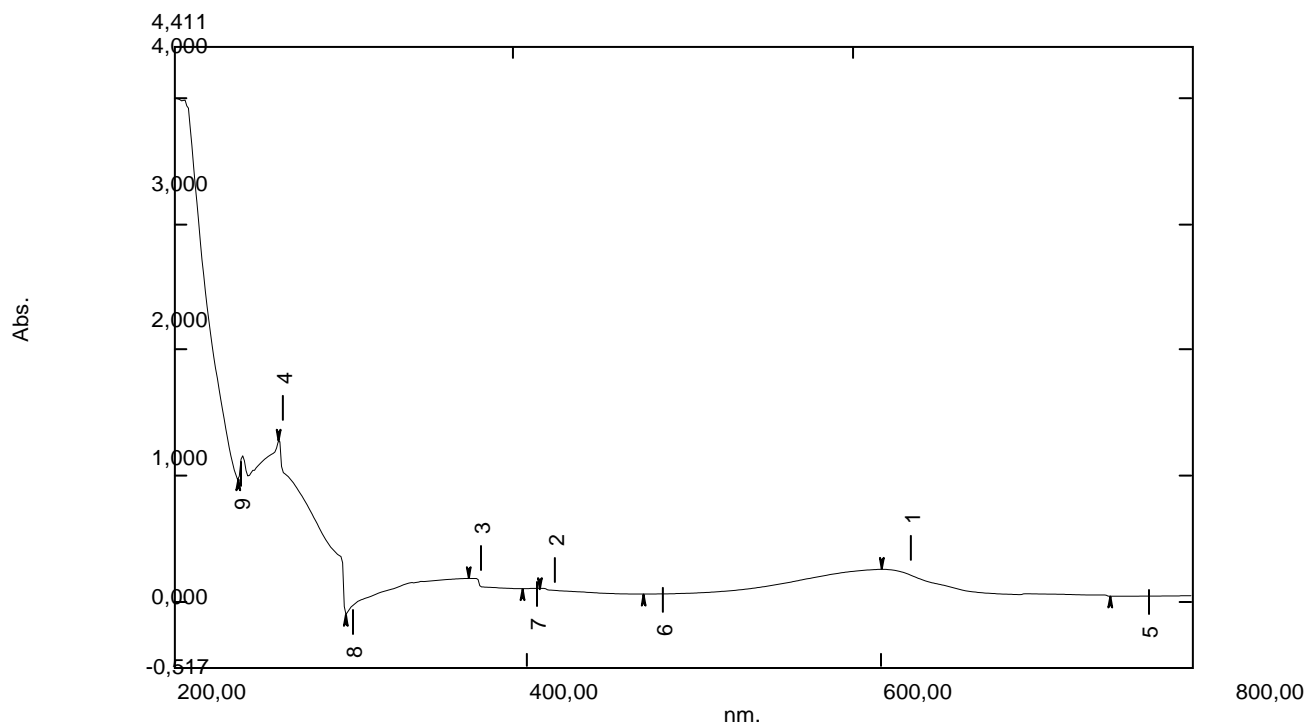
-Un autre pic à 474 nm qui peut correspondre à la chlorophylle b selon CERE *et al.*, 2014, et JUIN C, 2015 respectivement aux spectres [445 nm – 645 nm], [457 nm – 646 nm].

-Un maximum d'absorbance à 432 nm qui se situe entre [430 nm - 660 nm] selon CERE *et al.*, 2014, et entre [430 nm - 662 nm] selon JUIN, 2015, elle peut correspondre aussi à la chlorophylle

D'après notre spectre on remarque la présence de chlorophylle a, b et c₃ ; et l'absence totale de la chlorophylle c₁, c₂ et d, selon JUIN, 2015.

III.3. Phycocyanine

➤ Extraction à l'eau

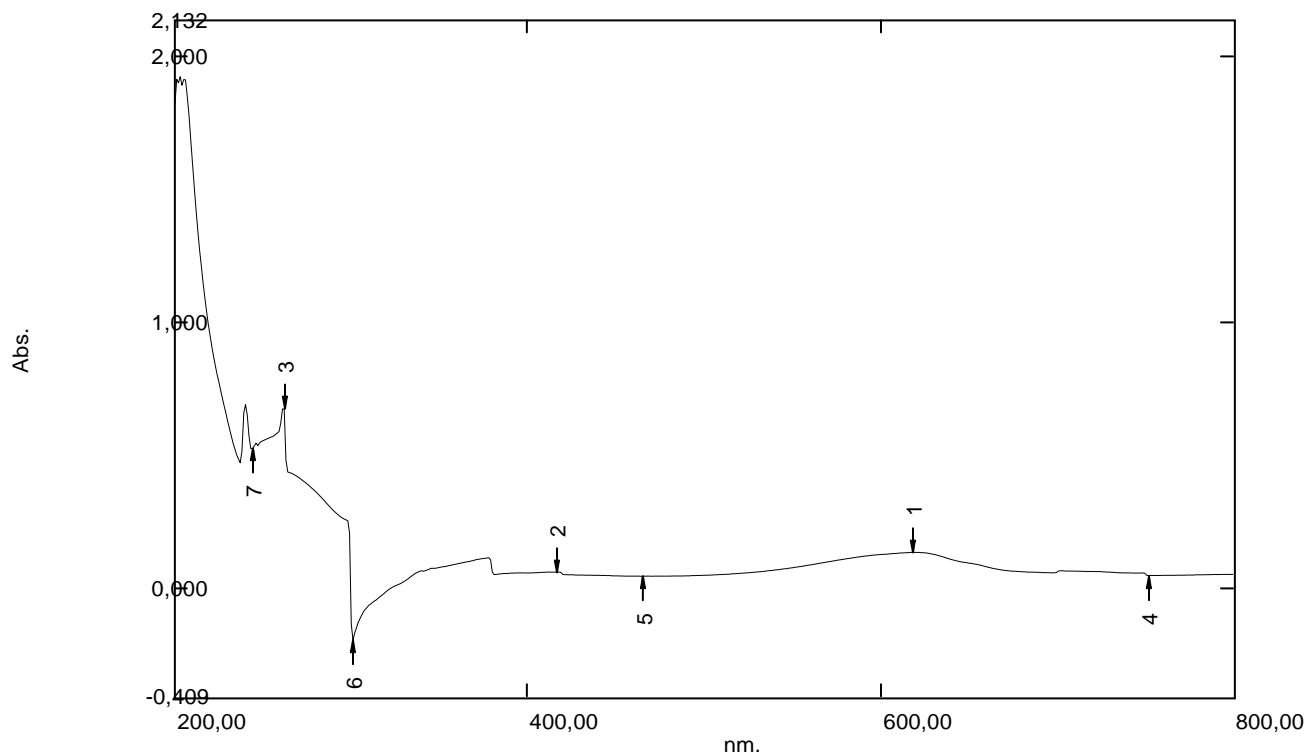


No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	617,00	0,252
2	↑	415,00	0,100
3	↑	374,00	0,180
4	↑	261,00	1,269
5	↓	752,00	0,038
6	↓	477,00	0,055
7	↓	405,00	0,098
8	↓	301,00	-0,107
9	↓	237,00	0,965

Figure 27: Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par l'eau

Selon le graphe on remarque la présence de quatre pics : le premier est situé à 617 nm qui appartient à la zone d'absorption de chromophore bleu appelé phycocyanobiline. Les trois autres pics 2, 3 et 4 sont situés respectivement à 415 nm, 374 nm et 261 nm, ce qui explique l'absorbance d'autres molécules que la phycocyanine.

➤ Extraction par solvant



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	619,00	0,132
2	↑	417,00	0,058
3	↑	262,00	0,672
4	↓	752,00	0,045
5	↓	465,00	0,042
6	↓	301,00	-0,198
7	↓	244,00	0,520

Figure 28 : Spectre d'absorption de la phycocyanine par solvant

On remarque dans notre graphe la présence de trois pics d'absorption à différentes longueurs d'onde, le premier est situé à 619 nm (absorption maximale de la phycocyanine), le deuxième et le

troisième pics sont situés respectivement à 417 nm et 262 nm, qui peuvent correspondre à d'autres molécules ou des contaminations au cours de l'extraction (produits utilisés, ...).

IV. Identification des différents pigments de la spiruline par séparation sur couches imprégnées à l'huile de paraffine (CCM)

Pour cette identification, on se sert de la CCM pour mettre en évidence les différents pigments de la spiruline, et ceci en fonction de leurs migrations sur plaques. Ceci dit, on utilise deux systèmes éluant de polarité différente

Système éluant méthanol/acétone/eau (20 :4 : 3), système éluant méthanol/acétone (5 : 2).

Les deux plaques CCM observées, montrent des taches (de nombre, de couleur et de distance de migrations différentes les unes des autres) **figure 29**



Figure 29: Plaques imprégnées à l'huile de paraffine après migration des différents pigments dans a) système éluant méthanol/acétone/eau et b) système éluant méthanol/acétone

IV.1. Caroténoïdes

Les taches seront identifiées selon la littérature (**annexe tableau 1**) qui donne les RF des pigments séparés sur couche imprégnée à l'huile de paraffine.

Les deux plaques CCM présentent des taches colorées dispersées spatialement correspondant aux différents pigments présents dans l'extrait de caroténoïdes (**figure 30**).

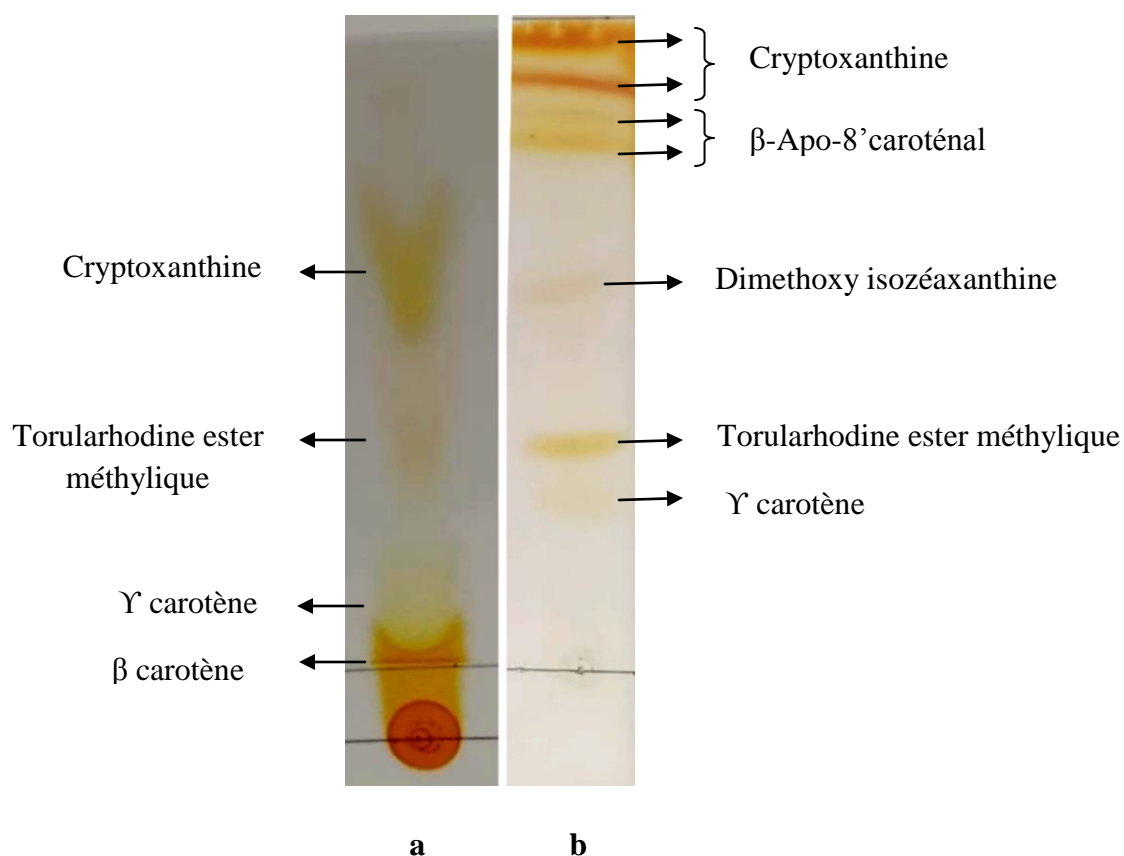


Figure 30: Plaques imprégnées à l’huile de paraffine après migration des caroténoïdes dans :
 a) Système éluant méthanol/acétone/eau et b) Système éluant méthanol/acétone.

Les pigments correspondants aux différentes tâches apparues sont identifiés dans les tableaux 23 et 24.

➤ Système méthanol/acétone/eau (20 :4 : 3)

Tableau 23 : Les pigments des caroténoïdes correspondant aux différents RF du système méthanol/acétone/eau.

Rapport de migration au front du solvant : RF de la présente étude	Couleur de la tache obtenue	Rapport de migration au front du solvant : RF (littérature)	Nom du pigment
0.11	Orange foncé	0.1	β carotène
0.14	Orange jaune	0.15	γ carotène
0.44	Jaune clair	0.48	Torularhodine ester méthylique
0.61	Orange clair	0.6	Cryptoxanthine

➤ Système méthanol/acétone (5 : 2)

Tableau 24: Les pigments des caroténoïdes correspondant aux différents RF du système méthanol/acétone.

Rapport de migration au front du solvant : RF de la présente étude	Couleur de la tache obtenue	Rapport de migration au front du solvant : RF (littérature)	Nom du pigment
0.27	Jaune clair	0.15	Y carotène
0.36	Orange clair	0.48	Torularhodine ester méthylique
0.6	Jaune clair	0.6	Dimethoxy isozéaxanthine
0.82	Orange	0.83	β -Apo-8' caroténal
0.85	Orange clair	0.83	β -Apo-8' caroténal
0.91	Orange foncé	0.9	Cryptoxanthine
0.97	Orange rouge	0.9	Cryptoxanthine

Nous remarquons, que la séparation des pigments dans le système éluant : méthanol/acétone est plus importante (six pigments) : Y carotène, torularhodine ester méthylique, dimethoxy isozéaxanthine, β -Apo-8' caroténal, cryptoxanthine que celle du système méthanol/acétone/eau (quatre pigments) : β carotène, torularhodine ester méthylique, Y carotène et cryptoxanthine.

Cette séparation spatiale des pigments est due à leur différence de solubilité dans l'éluant organique, les pigments les plus solubles se déplacent plus rapidement que ceux qui le sont moins. Et donc ils migrent plus loin sur la plaque CCM. La position des taches à un endroit particulier de la plaque dépend aussi de l'affinité du constituant pour la phase stationnaire.

Toutefois, on remarque que le Y carotène, torularhodine ester méthylique et cryptoxanthine ont été identifiés par les deux systèmes.

Nous notons aussi, l'absence de certains caroténoïdes notamment : xanthophylles (lutéine, violaxanthine, capxanthine et zéaxanthine) car leur séparation se fait sur d'autres plaques imprégnées de triglycérides.

IV.2. Chlorophylle :

Les taches seront identifiées selon la littérature (**Annexe tableau 2**) qui donne les RF des pigments séparés sur couche imprégnée à l'huile de triglycéride (RANDERATH, 1971).

La séparation de la chlorophylle a été faite par deux systèmes : système éluant méthanol/acétone/eau (20 ; 4 ; 3), système éluant méthanol/acétone (5 ; 2). Les différentes migrations sont illustrées dans la **figure 31**.

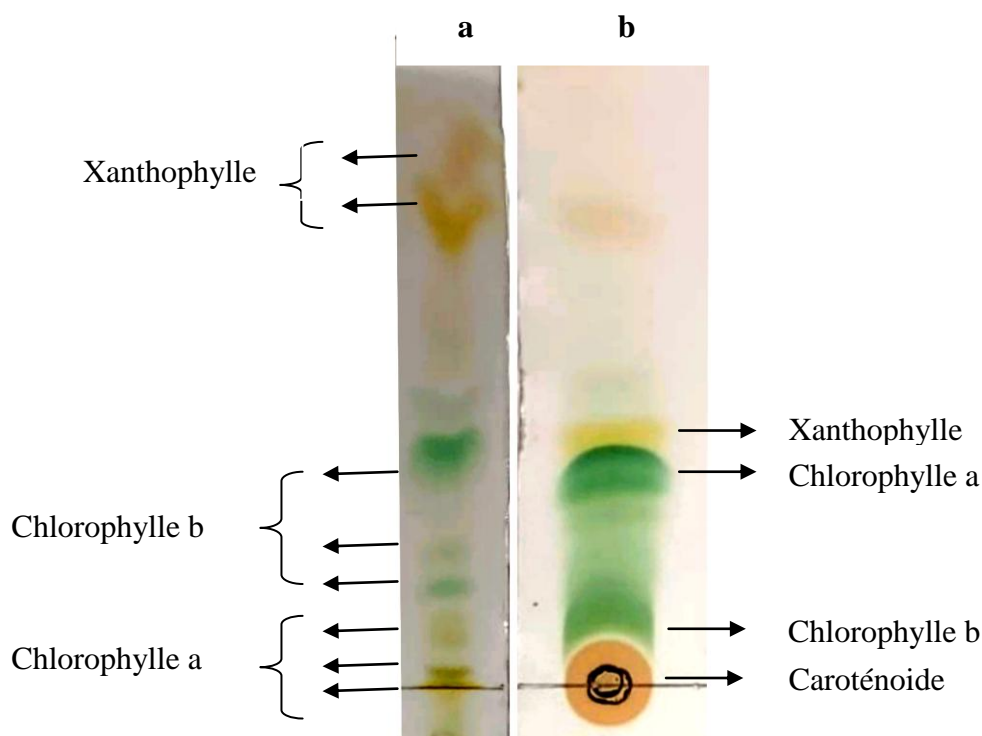


Figure 31 : CCM après migration de la chlorophylle dans :
a) système éluant méthanol/acétone/eau et b) système éluant méthanol/acétone

Les pigments correspondants aux différentes tâches apparues sur nos plaques CCM imprégnées de l'huile de paraffine sont identifiés dans les tableaux 25 et 26.

➤ Système méthanol/acétone/eau (20 :4 : 3)

Tableau 25 : Les pigments des chlorophylles correspondant aux différents RF du système éluant méthanol/acétone/eau.

Rapport de migration au front du solvant : RF de la présente étude	Couleur de la tache obtenue	Rapport de migration au front du solvant : RF (littérature)	Nom du pigment
0.11	Jaune foncé	0.13	Chlorophylle a
0.13	Jaune foncé	0.13	Chlorophylle a
0.17	Jaune clair	0.13	Chlorophylle a
0.2	Jaune clair	0.25	Chlorophylle b
0.24	Vert clair	0.25	Chlorophylle b
0.42	Vert foncé	0.25	Chlorophylle b
0.44	Vert foncé	-	-
0.49	Vert très clair	-	-
0.58	Jaune très clair	-	-
0.74	Vert foncé	-	-
0.83	Orange clair	-	-
0.88	Orange clair	-	-

➤ Système méthanol/acétone (5 :2)

Tableau 26 : Les pigments des chlorophylles correspondant aux différents RF du système éluant méthanol/acétone

Rapport de migration au front du solvant : RF de la présente étude	Couleur de la tache obtenue	Rapport de migration au front du solvant : RF (littérature)	Nom du pigment
0.1	Vert foncé	-	-

0.21	Vert clair	-	-
0.25	Vert foncé	-	-
0.28	Vert foncé	-	-
0.31	Orange clair	-	-
0.36	Vert clair	-	-
0.57	Orange clair	-	-
0.80	Vert clair	-	-
0.84	Jaune clair	-	-
0.87	Orange clair	-	-
0.92	Orange foncé	-	-

Nous remarquons, que la séparation des pigments dans le système éluant : méthanol/acétone/eau est plus importante que celle du système méthanol/acétone.

En comparant nos résultats du système éluant méthanol/acétone/eau avec celui de la littérature dont la plaque est imprégnée de triglycérides (RANDERATH, 1971), on a identifié trois chlorophylle a et trois chlorophylles b et absence des phéophytine a et b.

Par manque de données des rapports de migration au front du solvant méthanol/acétone, on n'a pas pu identifier l'ensemble des pigments observés sur la plaque. Par contre en se référant à la littérature et en se basant sur la visualisation des couleurs des taches [15], on a pu identifier

- des xanthophylles et des caroténoïdes qui correspondent respectivement à des taches jaune orangé et orange dans le système méthanol/acétone/eau.

- des chlorophylles a et b, des xanthophylles et des caroténoïdes qui correspondent respectivement à des taches vertes, jaunes, jaune orangé et orange dans le système méthanol/acétone.

Après l'identification des caroténoïdes et des chlorophylles, on a pu conclure que les carotènes sont les pigments les plus solubles, avec moins d'affinité pour la phase stationnaire. Les taches se sont donc retrouvées le plus loin dans le front de migration (taches oranges). Viennent ensuite les xanthophylles (taches jaunes orangés), un peu moins solubles, qui ont migré moins que les carotènes. Suivi de chlorophylle b (taches vertes foncées) puis chlorophylle a (taches jaunes

foncées). Ces derniers sont les pigments les moins solubles dans l'éluant. Leur grande taille contribue à augmenter leur affinité avec la phase stationnaire.

IV.3. Phycocyanine

Selon nos résultats, il n'ya pas eu de migration du pigment dont l'extraction s'est faite à l'eau dans les deux systèmes éluant, cela est dû peut être à l'hydrosolubilité du pigment ou à sa grande affinité avec la plaque chromatographique.

V. Evaluation de la qualité microbienne de la spiruline

Après incubation en temps et températures bien déterminés, les résultats obtenus du dénombrement et de recherche de la flore mésophile aérobie totale, la flore fongique et les coliformes totaux contenus dans la poudre de spiruline sont représentés dans les tableaux 27 et 28.

Tableau 27 : Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, la flore fongique et les coliformes totaux dans la poudre de spiruline.


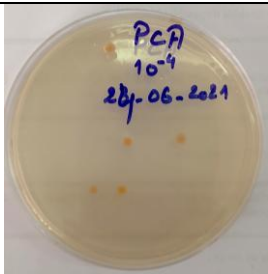




Germe recherché	Aspect du milieu avant utilisation	Volume de l'échantillon	Température et durée d'incubation	Aspect du milieu après
Flore mésophile aérobie totale		0.1 ml en surface	30°C pendant 72 heures	
Flore fongique		0.1 ml en surface	25°C pendant 5 jours	
Coliformes totaux		0.1 ml en surface	30° C pendant 48 heures	

Tableau 28 : Germes microbiens dénombrés dans l'échantillon de spiruline (UFC/g)

Germe recherché	Dénombrement (UFC/g)
Flore mésophile aérobie totale	500 000
Flore fongique	40 000
Coliformes totaux	0

La flore mésophile aérobie totale correspond à des bactéries indicatrices de l'état d'hygiène sanitaire, son dénombrement permet d'apprécier la qualité microbiologique des denrées alimentaires et l'application des bonnes pratiques d'hygiène (ANIHOUVI *et al.*, 2009 in TOUAHIR , 2017). Le dénombrement obtenu est de 500 000 UFC/g.

La flore fongique est un contaminant fréquent de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Sa présence peut améliorer les qualités organoleptiques du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines (TABUC, 2007). Le résultat du dénombrement obtenu est de : 40 000 UFC/g.

Les coliformes sont des bactéries commensales de l'intestin de l'homme et des animaux. Elles sont témoins d'une contamination fécale. Leur recherche permet de suivre l'hygiène observée par les manipulateurs (BORNERT, 2000). Le résultat des coliformes totaux montre une valeur de 0 UFC/g.

La contamination de la poudre de spiruline par les germes (FMAT) et (FF) peut être attribuée à des contaminations lors de sa récolte, son lavage, son séchage, son stockage ou bien lors de son conditionnement, ou peut-être dû à notre manipulation.

Dans notre étude, on n'a pas détecté des (CT) et donc la poudre de spiruline n'a pas subi de contaminations fécales.

VI. Détermination des activités thérapeutiques de la spiruline

VI.1. Activité antioxydante

La droite de régression qui évalue l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique aqueux de *Spirulina platensis* vis-à-vis du radical DPPH est représentée dans la **figure 35**.

Tableau 29 : Concentrations et absorbances de l'extrait de la spiruline pour le tracé de la courbe d'étalonnage.

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	125	250	500	1000	2000
Absorbances à 515 nm	0.785	0.743	0.698	0.664	0.661

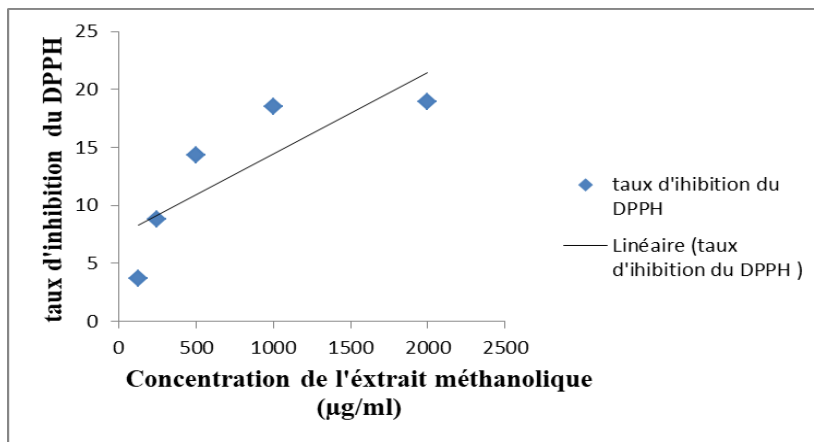


Figure 32: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Spirulina platensis*.

Pour la gamme des concentrations utilisées, de 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ et 2000 $\mu\text{g/ml}$, les taux d'inhibition des DPPH obtenus sont inférieurs à 20 % (de ce fait le calcul de IC_{50} est impossible).

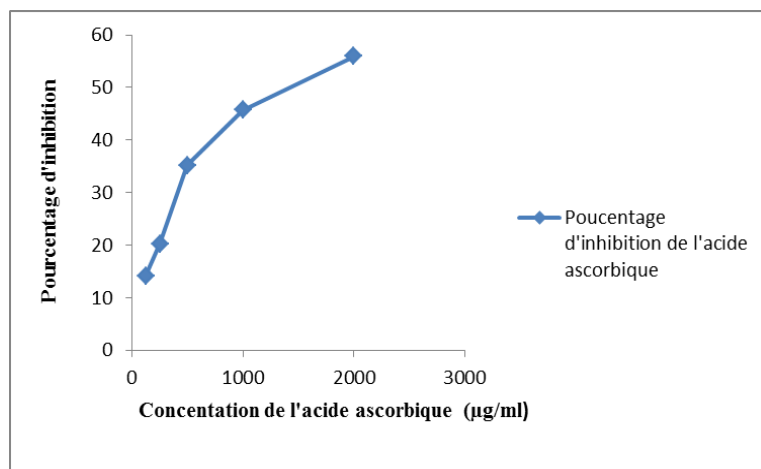


Figure 33: Pourcentage d’inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l’acide ascorbique

L’activité antioxydante se traduit par la réduction du radical DPPH qui s’accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH°) à la couleur jaune (DPPH-H). Nos résultats n’ont pas présentés ce virage de couleur car les pourcentages d’inhibition enregistrés sont faibles (**figure 34**). Ce résultat peut être attribué à la composition de la spiruline qui présente de faibles taux des composés antioxydants dont les caroténoïdes et la phycocyanine (préalablement démontrés).

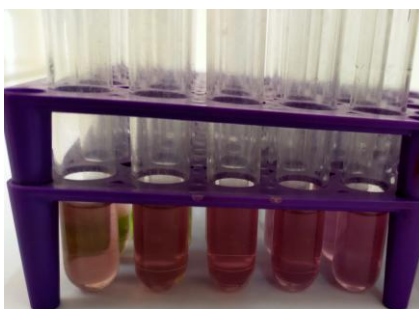


Figure 34 : Les solutions de l'extrait de la spiruline à différentes concentration après l'ajout du DPPH

De nombreuses études in vitro montrent que le traitement à la spiruline réduit significativement le stress oxydatif. Ces effets antioxydants et protecteurs sont médiés par la phycocyanine, le β -carotène et d'autres vitamines et minéraux contenus dans la spiruline (GOULAMBASSE, 2018).

VI.2. Activité antibactérienne

L’activité antibactérienne a été étudiée sur deux souches de références *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Escherichia coli* ATCC 25922 en suivant plusieurs étapes

- Isolement et purification des souches étudiées

L'observation à l'œil nu des cultures sur milieux gélosés (MH) a montrée des colonies de tailles similaires pour chaque genre

Les colonies de *Staphylococcus aureus* de formes rondes, lisses et un peu bombées, d'une couleur blanchâtre à crème sur milieu MH.

Les caractères cultureux d'*Escherichia coli* ont révélés aussi des colonies blanchâtres, ondulées, lisses et crémeuses.

La figure 34 illustre l'aspect macroscopique des deux souches sur leurs milieux spécifiques.

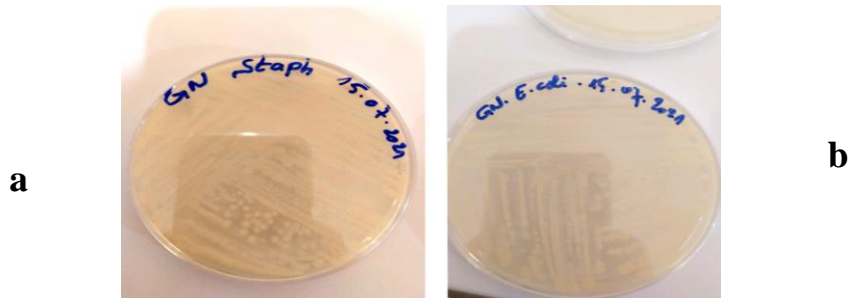


Figure 35 : Aspect macroscopique de : a) *Staphylococcus aureus* et b) *E coli*

Détermination de l'activité antibactérienne de la spiruline

Pour tester la sensibilité de nos souches bactériennes, un test d'antibiogramme a été effectué. L'intérêt de cet examen est de déterminer au mieux le spectre d'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la spiruline contre ces deux germes.

En comparant notre résultats avec celui de LAHOUCINE, 2019, tenant compte du fait que les deux souches utilisées sont les mêmes, on remarque que la spiruline exerce une activité inhibitrice vis-à-vis *E. coli* et *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition de 17 mm et 18 mm respectivement, tandis que le test de l'antibiogramme n'a pas montré l'apparition de zones d'inhibitions autour des disques (**figure 37**), cela peut être attribué probablement à la faible composition de cette poudre de spiruline en β carotène et phycocyanine.

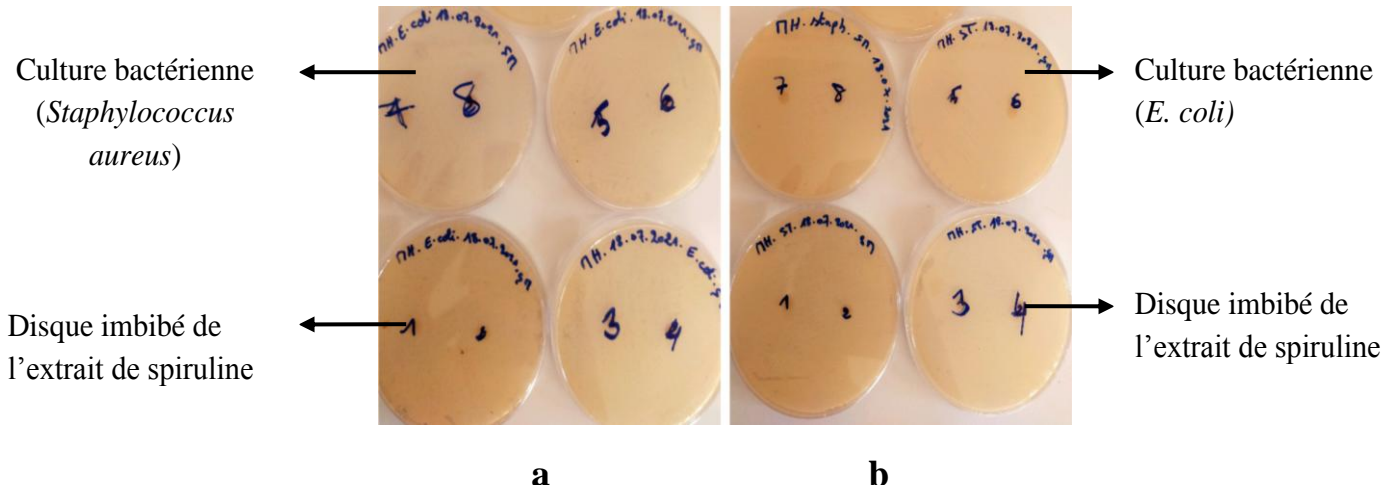


Figure 36: Résultats de l'activité antibactérienne de la spiruline contre : a) *E. coli* et b) *Staphylococcus aureus*



CONCLUSION GENERALE



Conclusion générale

Depuis les années 90, les scientifiques se sont pris sur les propriétés multiples thérapeutiques et nutritionnelles de la spiruline, ce qui a suscité leur curiosité et de là sont nées les nombreuses études publiées que nous avons consultées pour réaliser notre travail.

Ce présent travail répond à un objectif d'extraire et d'identifier les différents pigments de la micro algue *Spirulina platensis*, une souche algérienne cultivée dans la région de Tamanrasset et l'évaluation de sa qualité microbienne ainsi que ses activités antioxydante et antibactérienne.

L'analyse physico-chimique a montré une stabilité du produit avec un potentiel d'hydrogène (7.74) légèrement alcalin, un taux d'humidité de 4.493 %, un taux de matière minérale de 6.775 % et une acidité titrable de 8.225 %.

De même, des analyses quantitatives et qualitatives nous ont amené à conclure que :

- Le dosage quantitatif des caroténoïdes est de 42 mg/ 100 g de poudre de spiruline, et que les extractions par séparation aqueuse à double phase et à l'eau sont les meilleures pour extraire la phycocyanine respectivement en termes de concentration et de degré de pureté (0.091 mg/ml et 0.441).

L'analyse qualitative des spectres des différents pigments a révélé la présence de :

- Cinq pigments caroténoïdes : β carotène, ϵ carotène, α carotène et γ carotène et vauchiéroxanthine (xanthophylles).
- Trois pigments de chlorophylles : chlorophylle a, b et c₃.
- Un pigment de phycocyanine : phycocyanobiline.

-La chromatographie sur couches minces imprégnées à l'huile de paraffine dans les deux systèmes éluant (méthanol/acétone/eau et méthanol/acétone) a permis la séparation de :

- Six pigments de caroténoïdes : β carotène, γ carotène, torularhodine ester méthylique, diméthoxy isozéaxanthine, β -Apo-8' caroténal et cryptoxanthine.
- Deux pigments de chlorophylles dans le système éluant méthanol/acétone/eau : chlorophylle a et b.

Une appréciation de la qualité microbienne de la poudre de spiruline montre qu'elle possède une charge microbienne assez importante de FMAT et FF.

En plus de toutes ces propriétés antioxydante et antibactérienne, les professionnels de l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire, ont pris conscience de l'énorme potentiel commercial de cette micro algue bleue.

Compte tenu des effets préventifs de la microalgue et de ses dérivés, l'industrie pharmaceutique peut développer des médicaments ou compléments de choix pour compléter les traitements médicamenteux parfois lourds liés à certaines maladies (cancer, sida, immunodépression...).

On souhaite que ce travail sera repris pour vérifier nos résultats pour aboutir à des fabrications de produits d'ordre pharmaceutiques et/ou agroalimentaire qui nécessite l'addition des pigments dans leur composition, afin d'améliorer la coloration, l'activité antioxydante et antibactérienne.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- Ahounou, M.N (2018).** *La spiruline : un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation.* Thèse de doctorat. Pharmacie. France: Université de ROUEN. P 25.
- Aoac. (1980).** Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. Washington DC, [en ligne]. [Consulté le 27/07/2021]. Disponible sur le web: https://www.domainex.co.uk/services/analytical-sciences?gclid=Cj0KCQjwoJX8BRCZARIsAEWBFMK8eTC0qAxUc3VCl_bIlbCaQ7L4Gef8AcH3bSxGu4Q7ajrIuXefWTwaAuPyEALw_wcB.
- Aoac. (1999).** Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Washington: DC.
- Aouir, A.(2017).** *Extraction des composés de la spiruline par le champ électrique pulsé.* Thèse. Sciences alimentaires. EL Harrach Alger : Ecole Nationale Supérieure Agronomique, p.184.
- Bennetta, A., Bogorad, L (1973).** Complementary chromatic adaptation in a filamentous green alga. *The Journal of Cell Biology* : p.p.419-435.
- Berenice Fernández-Rojas a , Jesús Hernández-Juárez b , José Pedraza-Chaverri a,
- Bernard, C (2014).** Les cyanobactéries et leurs toxines. *Francophone des Laboratoires*. Vol.2014, Issue 460, pp. 53-68.
- Borner, G. (2000).** Intérêt et limites des analyses microbiologiques des denrées dans une stratégie de maîtrise de la sécurité des aliments : cas de la restauration collective. *Bulletin Vétérinaire de France*. N .153. p.p. 433-442.
- Boukhari N, (2020).** *Optimisation des paramètres influençant l'extraction des protéines de la poudre de spiruline et ses propriétés fonctionnelles par la Méthodologie de Surface de Réponse.* Thèse. Sciences Agronomiques. El Harrach –Alger: Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- Boukherchoufa.,Tebakh.(2006).** *extraction et identification de certains pigments caroténoïdes à partir d'algues brunes.* Mémoire d'ingénieur. Alger :ENSSMAL.
- Boumedine, A. (1991).** *Valorisation des sous produits d'agrumes par extraction caroténoïdes.* Thèse. El-Harrach : INA, p.p. 9-28.
- Boyen, C., Jaouen, P.(2015).** Les Biotechnologies Marines dans le Grand Ouest.p 61.
- Bujard,E.U., Braco, U., et al.1970.** Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (Spirulina) and their Possible Use in Food Formulations 3rd.*international Congress of Food Science and Technology*, Washington.

- Bulgariu, L., Bulgariu, D., (2008).** Cd (II) extraction in PEG (1550)–(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase systems using halide extractants. *Journal of the Serbian Chemical Society*.Vol 73 (3).p.341– 350.
- Cere, F, Burgat, A, Scotto, P.(2014).** *Extraction et séparation de la chlorophylle*.Auzeville.
- Chakraborty, B., Jayaswal, R.P., et al. (2015).** Antimicrobial Activity of Spirulina platensis Extract Against Gram Positive and Gram Negative Bacteria- A Comparative Study. Available online on < www.ijcpr.com > *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research* ; Vol 6(4) ; p.212-214, Research Article.
- Charlemagne, D. (2008).** La spiruline : aliment santé? Mémoire, DIU Alimentation Santé et Micronutrition. Faculté de pharmacie de Dijon.
- Charpy, L., Langlade,M.J., Alliod, R.(2008).** La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? *Institut de Recherche pour le Développement*.
- Cruchot,H (2008).** *La spirulina bilan et préspectives*. Thèse de doctorat. Besancon :Université de Franche-comte-.
- Doke, J.M (2005).** An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from spirulina sp. *International Journal of Food Engineering* ; p5.
- Doumandji A, Boutekrabt L, et al. (2012).**Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal.*Nature et Technologie*.Vol 4(1),40-50.
- Durand, C.(1993).** *La Spiruline, algue de vie*. Bull. Inst. Océanog. Monaco, n° spécial 12: 7-11.
- Falquet J., Hurni J.P. (2006).** Spiruline : aspects nutritionnels. Antenna Technologies.
- Fernandez-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., Pedraza-Chaverri, J.(2014).** Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods.*, p 8.
- Fox R, D (1999).** *Spiruline, technique pratique et promesse* . lieu : edisud, p.246.
- Gassama, D (2002).***Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans les filets de sole : étude comparative des méthodes d'analyses et des résultats de deux laboratoires*. Mémoire de diplôme d'études approfondies de production animale. Dakar : Ecole d'Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire (EISMV).
- Ghazi, F., Sahraoui, S. (2005).***Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes TANTBOUCHT et HAMRAIA*.Thèse de doctorat.El-Harrach : INA, p.p13-49.
- Goulamabasse,T.R (2018).** *La spiruline : activités thérapeutiques et son intérêt dans la lutte contre la malnutrition à Madagascar*. Thèse. Lille: Université de Lille. Faculté de Pharmacie.

- Guiraud , J. P.** (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. 652p.
- Gutiérrez-Salmeán,G., Fabila-Castillo, L., et al.** (2015).Nutritional and toxicological aspects of spirulina (Arthrospira). *Nutr Hosp.* Vol32, (1),p.p. 34–40.
- Havias S.O.**(2020). La spiruline comme nouveau type de business en Ukraine. Université d'état agrotechnologique de Tavria de Dmytro Motornyi.
- Henrikson, R**(1989). *Earthfood Spirulina*. Ronore Enterprises, California.p.180.
- Hickman, Michael, 2013.** Algues bleu-vert. In: *l'Encyclopédie Canadienne, Historica Canada*.
- Hug C., Von der wied D.** (2011). La spiruline dans la lutte contre la malnutrition, Bilan et perspectives. Antenna Technologies.Genève.p.30.
- Iltis, A** (1968). Tolérance de salinité de *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl., (Cyanophyta) dans les mares natronées du Kanem (Tchad). *Cahiers ORSTOM.Série Hydrobiologie*, Vol 2, (3-4), p. 119-125.
- Jarisoa, T** (2005). *Adaptation de la spiruline du sud de Madagascar à la culture en eau de mer. Mise au point de structures de production à l'échelle villageoise*. Thèse. Es Sciences en Océanologie Appliquée. Institut halieutique des sciences marines. Université de Toliara.
- Jourdan, J.P.** (2006). *Manuel de culture artisanale de spiruline*. Révision mars 2013.
- Juin, C** (2015). *Extraction, identification et caractérisation pharmacologique de pigments de Porphyridium purpureum sur cellules de mélanome humain*. Thèse.Biochimie.Universite de la Rochelle.
- Kiet, P.Q., Durand, C.** (2006).Spirulina rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids. In Charpy et al. (ed.) *International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development*: 111-117.
- Lafri, I.** (2018).*optimisation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline HTAM*. Thèse de doctorat. biotechnologie.Blida : Université de Blida 1. Faculté des sciences de la nature et de la vie.
- Lafri, I., Jemni, M., et al.** (2017). Evaluation des méthodes d'extraction de la phycocyanine et son rendement à partir de *Spirulina platensis*, *Agrobiologia*.Vol 7(2), p.p.623-634.
- Lahoucine, H.** (2019). *Etude de l'impact de l'incorporation de la Spiruline sur la qualité organoleptique et physicochimique de la Mayonnaise*. Mémoire de master. Biotechnologie alimentaire. Mostaganem : Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- Laiche, O.T., Bessei, A.** (2009).*Influence du stress salin sur la spiruline (Arthrospira platensis)*. Mémoire. Ouargla.Université Kasdi merbah. Faculté des sciences de l'ingénieur.

- Langlade, M. J., Alliod, R., et al.(2008).** Autres utilisations et recherches en cours.*Colloque international sur la spiruline.*Toliaria Sud-Ouest de Madagascar.
- Liang, S., Liu, X., et al.(2004).** Current microalgal health food R & D activities in China. *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges.* Vol 512, p.p.45–48.
- Louvel, S. (2019).** *La spiruline : Intérêts humanitaires et thérapeutiques.* Thèse.Pharmacie. France : Marseille : faculté de pharmacie., p.p.6-14.
- M'baye, B.K; LO, B ; et al.(2011).** Etude quantitative de quelques pigments de la spiruline en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle. *International Journal of Biological and Chemical Sciences ;* p.p 2035-2038.
- Mahdjoub, W., Gherib, S (2016).** *Etude de l'effet de l'incorporation de la spiruline sur la qualité physico-chimique, microbiologique et toxicologique d'un jus.* Mémoire de master. Microbiologie et Toxicologie Alimentaire. Blida : Université Blida-1.
- Manet, A. (2016).** *La spiruline: Indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine .*Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes-Faculté de Pharmacie de Grenoble.
- Martínez-Galero, E., Pérez-Pastén,R., et al.(2016).** Preclinical antitoxic properties of *Spirulina (Arthrospira).* *Pharmaceutical biology,* vol 54(8), p.p.1345-1353.
- Mobin, S. M., Chowdhury, H., et al. (2019).** Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications—A review. *Energy Procedia.* Vol 160, p.p.752-760.
- Molino, A., Lovine, A., et al.(2018).** Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals..*International Journal of Environmental Research and Public Health.* Vol 15(11), p.2436.
- Nguyen,M., Chari, V., et al. (2014).** Etude comparative des méthodes d'extraction de la phycocyanine de *Spirulina platensis.* . 4ème Colloque QualiREG, le réseau scientifique et technique des acteurs agroalimentaires de l'océan Indien. Antananarivo, Madagascar.
- Niangoran, N.U.(2017).** Optimisation de la culture de la spiruline en milieu contrôlé : éclairage et estimation de la biomasse. Optique / photonique. Université Paul Sabatier - Toulouse III.
- Nicoletti, M. (2016).** Microalgae nutraceuticals. *Foods.*Vol 5(3), p.p 54-59.
- Palla, J.C., Busson, F. (1969).** Etude des caroténoïdes de *Spirulina platensis* (Gom) Geitler (Cyanophycées) *C.R. Acad. Sc. Paris.* t.269 p.p.1704-1707.
- Paniagua, M.J., Dujardin, E., (1993).** Le Tecuitlatl., concentré de spirulines source de protéines comestibles chez les Aztèques, *Cahiers de l'Agriculture.*Vol 2, p.p.283-287.

- Patel, S et Goyal, A (2013).**Current and prospective insights on food and pharmaceutical applications of Spirulina.*current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, vol 7 (2), p.p.681-695.
- Planes P, Rouanet J M., (2002).** Magnesium bioavailability from magnesium-fortified spirulina in cultured human intestinal Caco-2 cells.*Food Chemistry*, Vol 77(2), p.p.213-218.
- Raj, K (2020).**C-phycocyanine de Spiruline plantesis inhibe la nsp 12 requise pour la réplication du Sras-Cov-2 :nouvelle découverte dans la silice.*International journal of pharmaceutical sciences and research(IJPSR)*.vol.11(9).
- Randerath K., 1971.** Chromatographie sur couches minces (traduit de l'ouvrage allemand « DÜnnschichi-chromatographie » par Nguyen- Dang- Tam. 2^{ème} édition Gauthier-Villars in
- C. Akrou- Aissou, 2020,** polycopié des travaux pratiques, 2^{ème} année, 2^{ème} cycle Aquaculture.
- Rodier, J., Bazin, C., et al. (2005).** L'analyse de l'eau : eaux naturelle, eaux résiduaires et l'eau de mer. 8^{ème} Ed. Dunod, paris. p.p1383.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001).** Some physicochemical properties of carotenoids. A guide to carotenoid analysis in foods. *ILSI PRESS International Life Sciences Institute*. Washington DC.
- Roy, S., Liewellyn, C. (2011).** *Phytoplankton pigments characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Press University, Ed. Cambridge.
- Sadoun, A., Benyounes, W. (2005).***culture de la spiruline et détermination de certains composés chimiques*. Mémoire, Ing ISMAL, P : 32-33.
- Seghir, A.M., Benkhirddine, B.I., et al.(2020).***Culture et production de la spiruline Arthrospira platensis dans la région M'sila et l'extraction de phycocyanine*.Mémoire.M'sila :Université Mohamed Boudiaf .
- Sguera, S (2008).** *Spirulina platensis et ses constituants : intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques*. Thèse. Sciences pharmaceutique :Université Henri Poincaré-Nancy 1.
- Sguera, S. (2018).** " Spirulina platensis et ses constituants : intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques ", Sciences pharmaceutiques.
- Sivonen, K., Jones, G.** Cyanobacterial toxins. In : Corus I., Bartram J. (eds.), Toxic cyanobacteria in water. E&FN Spon, London, United Kingdom, 1999.p.p.41-111.
- Soizic, L (2019).** *La spiruline : Intérêts humanitaires et thérapeutiques*.Marseille :Université d'Aix-Marseille.Faculté de Pharmacie.

Tabus, C (2007). *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines.* Thèse. Pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Toulouse : Institut Nationale de Polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest.

Tazi, C., Touahir, N (2011). *Détermination de l'influence des rejets des eaux usées brutes sur la qualité bactériologique et physicochimique des eaux de mer. Cas d'EL KATTER (à proximité de port de Cherchell, wilaya de TIPAZA.* Mémoire d'ingénieur. Environnement. Dely Brahim : ENSSMAL.

Vonarx, J.(2008). Cyanobactérie et cyanotoxines. Planet Vie.

Welker, M., Von Dörhen, H (2006). Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbial.* Vol30 (4), p.p.530-63.

Zaghdoudi, K. (2015). Optimisation de l'extraction des caroténoïdes à partir du persimmon (*Diospyros kaki L.*), de l'abricot (*Prunus armeniaca L.*) et de la pêche (*Prunus persica L.*) : étude photophysique en vue d'une application en thérapie photodynamique (PDT), *Alimentation et Nutrition.* Université de Lorraine.

Les sites web :

[1] <http://data.abuledu.org/wp/?LOM=12592>

[2] : BOURRELLY P., LEFEUVRE J . C

CYANOBACTÉRIES ou CYANOPHYCÉES, anc.

ALGUES BLEUES. In: *Encyclopædia Universalis* [en ligne]. [Consulté le 02/08/2021].

URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/cyanobacteries-cyanophycees-algues-bleues/> .

[3] <https://algae-lab.com/shop/living-algae/culture-sample/spirulina-platensis-m1/>

[4] <https://www.antenna.ch/wp-content/uploads/2017/04/biologie.pdf>

[5]: Antenna technologies (2012). Un module d'apprentissage pour la production de la spirulina [en ligne]. [Consulté le 10/082021]. Disponible sur le web:

< http://www.spirulinelacapitelle.com/docs/prod_spiruline_FR.pdf >

[6]: (Fox R ; Lecture comparée des ouvrages de référence : JP Jourdan et Ripley Fox, (2018).

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjV99T0_p7zAhXUgf0HHRlIA_kQFnoECAyQAQ&url=https%3A%2F%2Fspiruline.fr%2Fdwd%2FZmlsZXMvcHJvamVjdC9lcGxvYWZRzLzIwMjAvMDgvMjQvMjAyMDA4MjQxODM2NDYtRE5BTE9WSUMtTGvjdHVyZS1jb21wYXJlZS1kZS1Gb3gtZXQtSm91cmRhbi5wZGY%3D%2Ff8e64533c02369cf7383941ba5d16619&usg=AOvVaw2-L7Do_2ZL5XIIN0WyZhLn

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjV99T0_p7zAhXUgf0HHRlIA_kQFnoECAyQAQ&url=https%3A%2F%2Fspiruline.fr%2Fdwd%2FZmlsZXMvcHJvamVjdC9lcGxvYWZRzLzIwMjAvMDgvMjQvMjAyMDA4MjQxODM2NDYtRE5BTE9WSUMtTGvjdHVyZS1jb21wYXJlZS1kZS1Gb3gtZXQtSm91cmRhbi5wZGY%3D%2Ff8e64533c02369cf7383941ba5d16619&usg=AOvVaw2-L7Do_2ZL5XIIN0WyZhLn

- [7] : SPIRULINE DES HAUTS DE FRANCE . « Culture de la spiruline en 5 étapes, 2016 » [en ligne]. [Consulté le 27/09/2021].URL: <https://www.spirulinedeshautsdefrance.com/culture-spiruline> .
- [8] <http://vertleburkina.unblog.fr/la-spiruline-outil-de-sante/> (2008)
- [9]<https://pepitem-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/39310f1b-cf15-411b-9f21-d462b10a952e>
- [10]: Casal A (2009). *l'Aliment Idéal et le plus Complet de Demain*. Spiruline France. [Consulté le 02.10.2021]. disponible sur le web : <https://www.spirulinefrance.fr> .
- [11] : <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Chlorophylle.html>
- [12] : YOKOTA A 2018. RTS découverte. [Consulté le 07.10.2021]. disponible sur le web : <https://www.rts.ch/decouverte/sciences-et-environnement/animaux-et-plantes/9252764-peuton-extraire-la-chlorophylle-des-epinards-et-si-oui-comment-peuton-la-garder-fonctionnelle.html>.
- [13] DALMEYDA. V ; (1998). *Les méthodes de chimie analytiques instrumentales*. [consulté le 08/10/2021]. [Dernière mise à jour : 22 mai 2001]. Disponible sur le web :< <http://dalmeйда.chez.com/cours/ccm/index.htm> >.
- [14] : **LECOMTE.M** . *Chromatographie sur papier ou e couche mince(CCM). Application à la mycologie*. [consulté le 08/10/2021]. Disponible sur le web :< <http://www.amfb.eu/Publications/2010/chromatographiepapier.pdf> >.
- [15] : **BRAIA N**. *Coloration permanente et temporaire*. [Consulté le 24/10/2021]. Disponible sur le web : < https://elearning-facsc.univ-annaba.dz/pluginfile.php/26265/mod_resource/content/1/Coloration%20permanente%20et%20temporaire2.pdf#:~:text=La%20t%C3%A2che%20jaune%20Dorang%C3%A9%20correspond,correspond%20%C3%A0%20la%20chlorophylle%20b >.
- [16] : Indicia production (2012), gélose Sabouraud chloramphenicol https://www.humeau.com/media/blfa_files/__TC_370-oeabouraud-CMP_FR_030315_74703137002.pdf



ANNEXES



Annexes

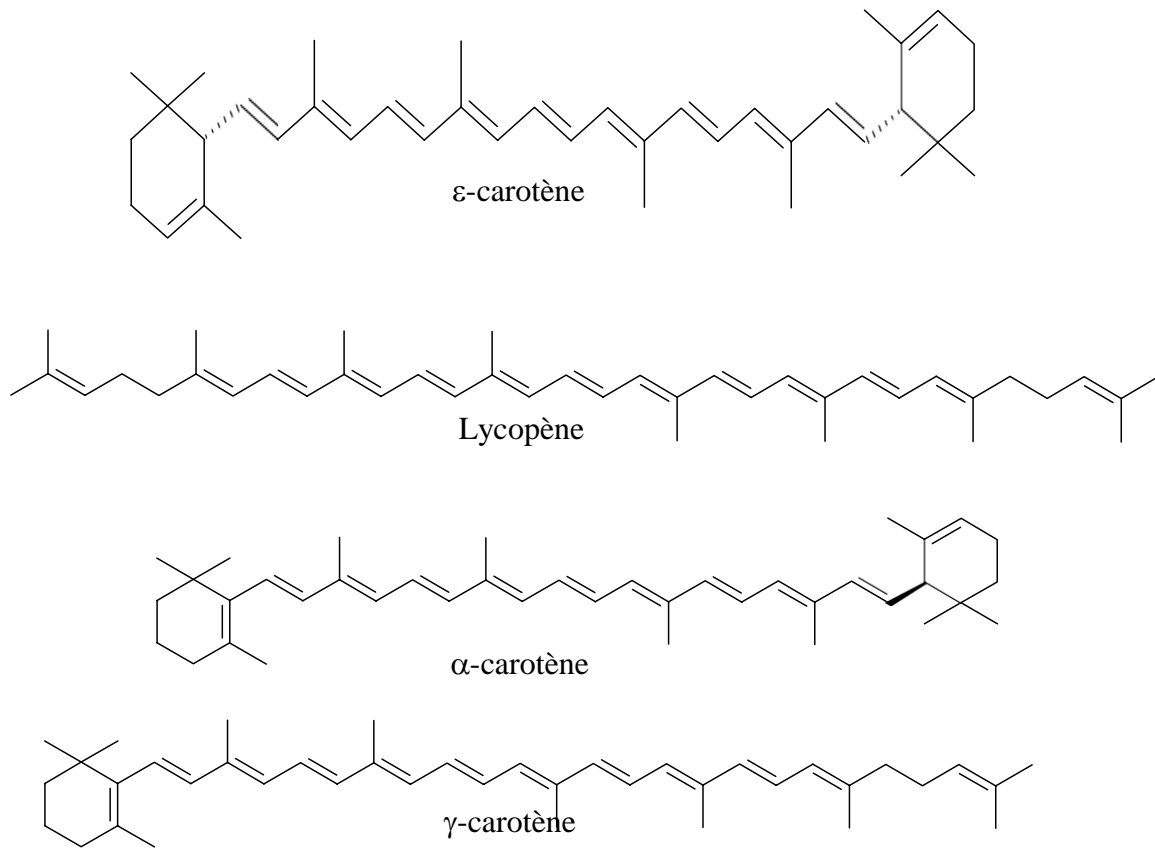


Figure 1 : Structure chimique de quelques caroténoïdes (JUIN, 2015).

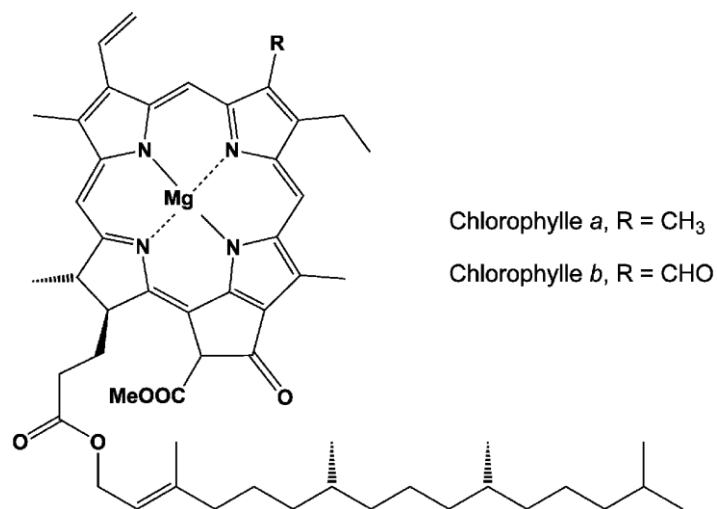


Figure 2 : Structure chimique de quelques chlorophylles
(FOLLY, 2000)

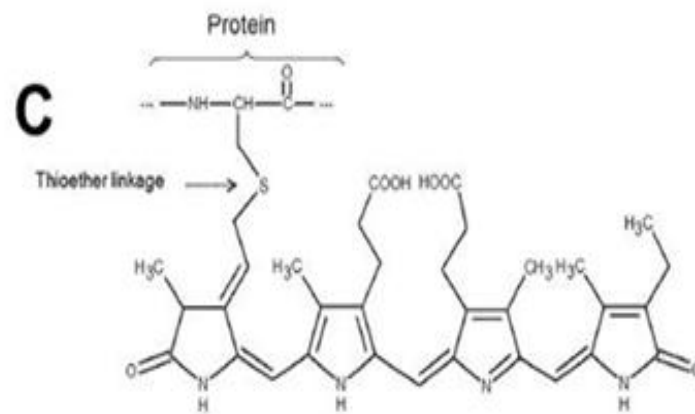


Figure 3 : Structure chimique et tridimensionnelle de la phycocyanine modifié (FERNANDEZ-ROJAS *et al.*, 2014)

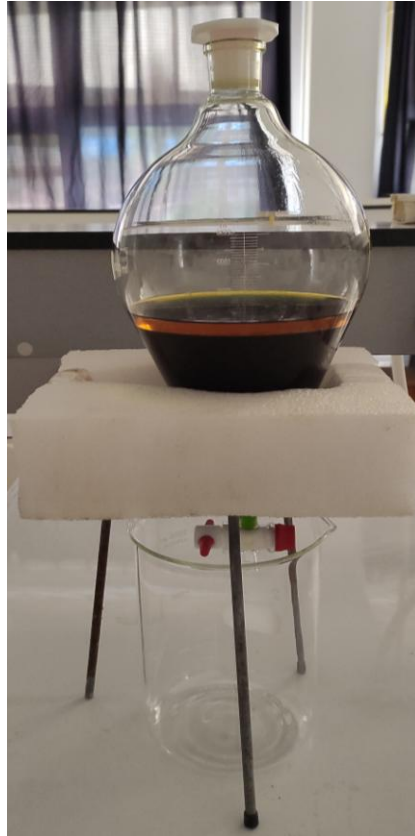


Figure 4: Phase aqueuse et organique obtenues



Figure 5 : Filtration de la phase organique



Figure 6: Suspension de la spiruline avant et après centrifugation



Figure 7 : solutions utilisées dans la séparation aqueuse à double phase de la phycocyanine.



Figure 8 : L'extrait sec des caroténoïdes avec l'hexane



Figure 9: Solution de bichromate de potassium



Figure 10 : La gamme étalon



Figure 11: Solution de DPPH

Tableau 01: RF des caroténoïdes sur des plaques imprégnées de Kieselgur (RANDERATH, 1971).

Composé	Nombre de substituants ⁽¹¹⁾					R _F	
	—OH	∨	= O	—OR	O —COR	Imprég. paraffine (a)	Imprég. graisse (b)
Capxanthine	2		1				0,74
Isozéaxanthine	2						0,49
Zéaxanthine	2						0,54
Diméthoxy-izozéaxanthine				2		0,60	
Cryptoxanthine	1					0,90	0,07
Rhodoxanthine			2				0,26
Torularhodine, ester méthylique					1	0,48	
Echinénone			1			0,61	
β-Apo-8'-caroténal (C ₃₉)			1			0,83	
Acide β-apo-8'-caroténique (C ₃₉), ester méthylique					1	0,69	
Acide β-apo-6'-caroténique (C ₃₈), ester méthylique					1	0,58	
Lutéine (xanthophylle)	2						0,56
Epoxyde de lutéine	2	1					0,72
Violaxanthine	2	2					0,84
Néoxanthine	3	1					0,95
β-Carotène						0,10	0,00
γ-Carotène						0,15	0,00
Dipalmitate de lutéine (physalis, hélène)					2	0,02	

⁽¹¹⁾ Structures d'après W. KARRER, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser, Bâle (1958).
(a) Système : méthanol/acétone (5 : 2) (saturé de paraffine).
(b) Système (méthanol/acétone/eau (20 : 4 : 3) (saturé de graisse).

Tableau 02: RF des chlorophylles sur des plaques imprégnées de triglycéride

Composé	RF
Chlorophylle a	0.13
Chlorophylle b	0.25
Phéophytine a	0.01
Phéophytine b	0.07

Source : (RANDERATH, 1971)

Tableau 03 : Composition du milieu Sabouraud Chloromphénicol

Ingrédients	Mesures en g/l d'eau minérale ou déminéralisée
Peptone de caséine	5
Peptone de viande	5
Glucose monohydraté	40
Chloramphénicol	0.5
Agar	15

Le pH final du milieu Sabouraud Chloromphénicol à 25°C est de $5,6 \pm 0,2$ [16].

Résumé:

Les cyanobactéries également appelées cyanophycées, plus anciens organismes sur terre, Le genre *Arthrospira* renferme des cyanobactéries filamenteuses, dont fait partie *Arthrospira platensis* plus connue sous le nom de Spiruline.

Après une caractérisation physico-chimiques de la spiruline, des analyses quantitatives et qualitatives de ses différents pigments ont eu lieu afin d'évaluer leurs concentrations par différentes méthodes d'extraction et de là les identifier par séparation sur couches imprégnées à l'huile de paraffine. Ces derniers ont révélés :

-2.1mg/ml de caroténoïdes dans 5g de poudre de spiruline dont les composantes sont : β carotène, vauchiéroxanthine (xanthophylles), ϵ carotène, α carotène et γ carotène.

-Les composantes de la chlorophylle sont ; chlorophylle a, chlorophylle b.

-0.091mg/ml de phycocyanine extraite par séparation aqueuse à double phase et une pureté de 0.441 pour la phycocyanine extraite à l'eau.

L'évaluation de la qualité microbienne de la poudre de spiruline nous a menés à dénombrer :

-500 000 UFC/g de flore mésophile aérobie totale.

-40 000 UFC/g de flore fongique.

-0 UFC/g de coliformes totaux.

De part sa richesse en nutriments, la spiruline connaît aujourd'hui des vertus thérapeutiques dont des activités antioxydantes et antibactériennes. Nos résultats n'ont pas aboutis vu le faible taux en composants antioxydants contenus dans la spiruline de l'étude.

De part ses activités thérapeutiques, la spiruline est très recommandée dans les différentes industries pharmaceutiques et agro-alimentaires.

Mots clés: Spiruline, *Arthrospira platensis*, carotenoides, chlorophylle, phycocyanine, extraction, pureté, identification, activités thérapeutiques.

Abstract:

Cyanobacteria, also called Cyanophyceae, are the oldest organisms on earth. The genus *Arthrospira* contains filamentous cyanobacteria, of which *Arthrospira platensis*, better known as Spirulina, is part.

After a physicochemical characterization of Spirulina, quantitative and qualitative analyses of its different pigments took place to evaluate their concentrations by different extraction methods and to identify them by separation on layers impregnated with kerosene oil. These revealed :

-2.1mg/ml of carotenoids in 5g of spirulina powder whose components are β carotene, vaucheraxanthin (xanthophylls), ϵ carotene, α carotene, and γ carotene.

-The components of chlorophyll are chlorophyll b, chlorophyll a.

-0.091mg/ml of phycocyanin extracted by aqueous double phase separation and purity of 0.441 for water extracted phycocyanin.

The evaluation of the microbial quality of the spirulina powder led us to count :

-500 000 CFU/g of total aerobic mesophilic flora.

-40 000 CFU/g of fungal flora.

-0 CFU/g of total coliforms.

Due to its richness in nutrients, Spirulina is now known to have therapeutic virtues including antioxidant and antibacterial activities. Our results were not successful due to the low level of antioxidant components contained in the spirulina under study. Due to its therapeutic activities, spirulina is highly recommended in various pharmaceutical and food industries.

Key words : Spirulina, *Arthrospira platensis*, carotenoids, chlorophyll, phycocyanin, extraction, purity, identification, therapeutic activities.

المخلص :

Cyanobacteria تسمى أيضا cyanophyceae أقدم الكائنات الحية على وجه الأرض ، المعروف أكثر باسم *Arthrospira platensis* ، التي من بينها cyanobacteria يحتوي على *Arthrospira* الجنين *Sprulina*.

وبعد تحديد الوصف الفيزيائي الكيميائي للسبيرولينا ، أجريت تحليلات كمية ونوعية لمختلف أصباغه من أجل تقييم تركيزاتها بطرق استخراج مختلفة ومن ثم التعرف عليها عن طريق الفصل على طبقات محشوة بزيت البارافين. وكشف الأخير عن ما يلي
مغ/مل من الكاروتينويدات في 5 غم من مسحوق سبيرولينا يحتوي على الكاروتين بيتا ، والفاوتشيراكسانثين ، والكاروتين 1-2 -
والكاروتين ٢

مكونات الكلوروفيل هي: الكلوروفيل أ ، الكلوروفيل ب -

المستخرج عن طريق الفصل المائي في مرحلتين ونقاء 0,441 للفيكوكيانين المستخرج 0.091mg/ml phycocyanin
بالماء

:إن تقييم الجودة الميكروبية لمسحوق سبيرولينا قادنا إلى العد

.ألف كلفن/غ مجموع النباتات المتوسطة الهوائية 500 -

.غ النباتات الفطرية/CFU 40 000 -

.مجموع القولونيات/CFU/g 0 -

ولأنه غني بالمغذيات ، فللسبيرولينا اليوم فضائل علاجية تشمل الأنشطة المضادة للأكسدة والأجسام. لم تكن نتائجنا ناجحة نظرا

.لانخفاض مستويات المكونات المضادة للأكسدة في دراسة سبيرولينا

.ونظرا لأنشطته العلاجية ، يوصى بشدة بسبيرولينا في مختلف الصناعات الصيدلانية والغذائية

، الاستخراج ، phycocyanine، كلوروفيل ، carotenoides، *arthrospira platensis*العلامات: سبيرولينا ،
النقاء ، تحديد الهوية ، الأنشطة العلاجية