

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 البحار وتهيئة الساحل
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR EN SCIENCE DE LA MER
OPTION : Biotechnologie marine

**Extraction et purification de la phycocyanine à partir d'une microalgue la
"spiruline" aux possibilités cosmétiques.**

Présenté par :

- BOUDAIFA Sarra
- SI BACHIR Souhila

Soutenu le 14/01/ 2021 devant le jury suivant :

M. MEZOUAR K.	Maître de conférences A (ENSSMAL)	Président
Mme BENTCHIKOU L.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Examinatrice
Mme KAIDI N.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Examinatrice
Mme AISSOU-AKROUR C.	Maître de conférences B (ENSSMAL)	Promotrice

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions le bon Dieu le tout puissant, pour le courage et la force qu'il nous a donné pour mener ce travail à bien jusqu'à son terme.

On voudrait tout d'abord adresser toute notre gratitude à notre promotrice, Mme AISSOU-AKROUR C, on la remercie pour sa présence et son engagement durant toute la période du travail sa tolérance, ses encouragements et ses conseils judicieux qui nous ont aidé à réaliser ce travail.

Nous tenons à témoigner toute notre gratitude à M. MEZOUAR K. qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire.

Nous sommes également très reconnaissantes à Mme BENTCHIKOU L. et Mme KAIDI N. pour l'honneur qu'ils nous ont accordé en acceptant de juger notre travail et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce dernier.

Nos sincères remerciements s'adressent également à Mme GUERROUMI H l'ingénieur du laboratoire de biochimie marine de l'ENSSMAL pour sa précieuse aide.

Nos sincères remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui ont participé de près ou loin à la réalisation de ce travail et nous citons en particulier les membres du laboratoire de « biochimie».

Enfin merci à nos familles et à nos proches pour leur soutien continu durant nos longues études.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents ceux qui nous font toujours passer avant eux, qui ne cessent de donner le meilleur d'eux-mêmes sans regrets, Que dieu vous garde pour moi et vous apporte tout le bonheur et la santé et la bénédiction. J'espère que je serai toujours à la hauteur de vos attentes. Merci à vous.

Ma chère maman NADIA qui peut trouver ici le fruit de ses innombrables privations. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu m'as consenti pour mon instruction et mon bien être.

A la meilleure des sœurs Djamilia. Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments d'amour, d'attachement que j'éprouve à ton égard. Merci d'être toujours à mes coté. Merci d'être la grande sœur que tu es !

A mes chers frères

Karim, Moukran, Mourad, Hakim et Hamid.

Pour les merveilleux moments passés en votre compagnie. L'ambiance familiale chaleureuse et le soutien que vous m'avez témoigné m'ont été droits au cœur.

A ma petite nièce Amel et mon neveux M'hena

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

Ainsi qu'à tout le reste membres de ma famille

A mes copines Romaiissa, Ines, Faiza, Nawel, Nadjwa, Houda, Sara, Sarah, Marwa, Ghania et Warda

A mes amis de l'enssmal Anouar, Raouf, Aymen, Hadjer, Soraya

A mon binôme Sarra BOUDAIFA qui a partagé avec moi ces 3 dernières années avec ses hauts et ses bas.

SOUHILA

Je dédie ce modeste travail à :

A tous ceux qui m'ont aidé, encouragé et donné la volonté pour continuer à terminer le présent travail.

A mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes très chers frères : Rafik, Zaki, Mohamed

A ma chère sœur: Amira

A toute ma famille : Boudaïfa et Sedikki

A Toi mon binôme Souhila

*A mes très chères amies chacune par son nom :
Shahinez, Manel, Maroua, Houda, Boshra, Khalida, Nadia, Assia,*

A mes chers Amis : Mohamed, Anouar, Azedin, Fouad, Karim

A ma promotion : Anouar, Raouf, Sara, Hadjer

SARRA

Liste des matières

Remerciements	II
Dédicaces.....	III
Liste des matières	V
Liste des figures	VIII
Liste des Tableaux	IX
Introduction	1
Généralités.....	3
1 LES CYANOBACTERIES	4
1.1 Écologie.....	4
1.2 Reproduction	4
1.3 La morphologie.....	4
1.4 Classifications :.....	5
2 la spiruline.....	5
2.1 Origine de la spiruline: découverte et histoire.....	5
2.2 Qu'est-ce que la spiruline ?	7
2.3 Taxonomie	8
2.4 Morphologie	10
2.5 Reproduction	10
2.6 Répartition géographique	11
2.7 Composition chimique de la spiruline	12
2.7.1 Protéines et acides aminés	12
2.7.2 Acides nucléiques.....	15
2.7.3 Lipides et acides gras	15
2.7.3.1 Les acides gras.....	15
2.7.3.2 La fraction insaponifiable.....	16
2.7.4 Les glucides.....	16
2.7.5 Les vitamines.....	17
2.7.6 Sels Minéraux et Oligo-éléments	18
2.7.7 Pigments.....	19
3 Phycocyanine	21
3.1 Définition de la Phycocyanine.....	21
3.2 Phycobilisomeet les phycobiliprotéines	21
3.3 Structure de la phycocyanine :.....	22
3.4 Extraction de la phycocyanine :.....	24
3.5 Purification de la phycocyanine	24

3.6	La stabilité de la phycocyanine :	24
3.7	Conservation de la phycocyanine :	25
3.8	Application du PC	25
	Matériel et méthodes	27
1	Matériel végétal	28
2	Analyses physico-chimiques de la souche de spiruline :	29
2.1	Détermination du potentiel d'hydrogène pH	29
2.2	Détermination de la teneur en humidité :	29
2.3	Détermination de l'acidité titrable (Méthode utilisant un indicateur coloré).....	30
3	Méthodes d'extraction:	32
3.1	Méthodes mécaniques.....	32
3.1.1	Extraction à l'eau	32
3.1.2	Extraction par congélation /décongélation :.....	33
3.2	Méthodes chimiques :.....	35
3.2.1	Extraction par solvant :	35
3.3	Méthode innovatrice d'extraction :.....	36
3.3.1	Extraction par sonification :	36
3.4	Le rendement d'extraction :.....	38
4	Conservation de la phycocyanine:	38
5	Caractérisation de la phycocyanine obtenue :.....	39
5.1	Activité antioxydante :.....	39
5.2	Polyphénols totaux :	40
	Résultats et discussion.....	43
1	Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de spiruline	44
1.1	Potentiel d'hydrogène pH.....	44
1.2	Taux d'humidité :	44
1.3	Acidité titrable :	44
2	Extraction de la phycocyanine:.....	44
2.1	Comparaison entre les résultats obtenus par l'utilisation des 4 méthodes :	45
2.2	Comparaison selon le degré de pureté :.....	49
2.3	Comparaison selon le rendement :.....	50
2.4	Spectre d'absorption de l'extrait brut obtenu par les différentes méthodes :	51
3	Caractérisation de la phycocyanine :	55
3.1	L'activité antioxydante par test FRAP :	55
3.2	Polyphénols totaux :	56
	Conclusion générale	62

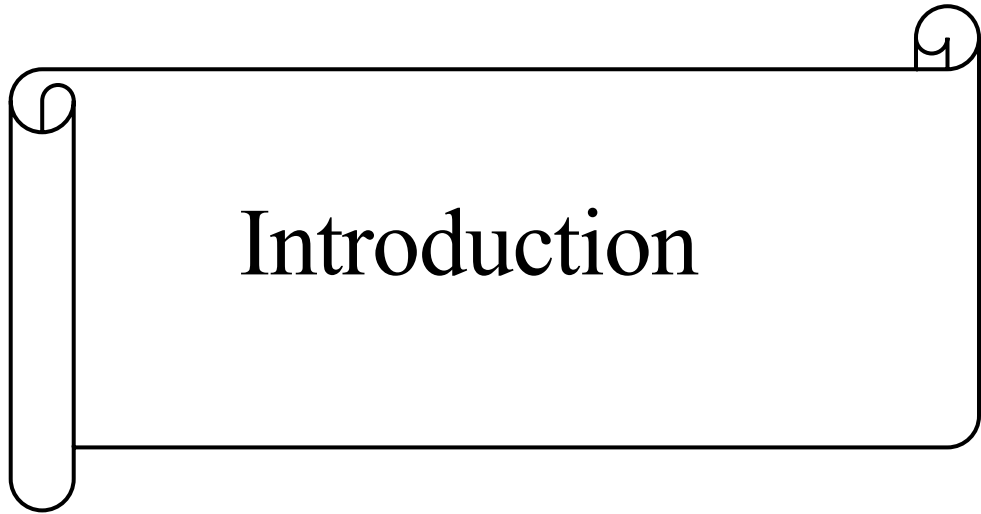
Référence bibliographique	65
Annexes	71

Liste des figures

Figure 1: Cycle biologique de la spiruline modifié (AHOUNOU, 2018)	11
Figure 2 : Composition de la spiruline	12
Figure 3 : Représentation schématique d'un phycobilisome	22
Figure 4: Structure chimique et tridimensionnelle de la phycocyanine (FERNANDEZ-ROJAS <i>et al.</i> , 2014).....	23
Figure 5:Emballage et packaging de la spiruline reçue.....	28
Figure 6: Changement de couleur de la solution de spiruline	31
Figure 7: L'extrait de phycocyanine obtenu par l'extraction à l'eau	32
Figure 8: La solution de spiruline après le cycle de congélation/décongélation	34
Figure 9 : L'extrait de phycocyanine obtenu par l'extraction par solvant.....	36
Figure 10 : L'extrait obtenu après 2ème centrifugation	37
Figure 11 : La phycocyanine lyophilisée.....	39
Figure 12 : Concentrations de la phycocyanine (mg/mL) et degrés de pureté selon le mode d'extraction.	46
Figure 14 : Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par l'eau.....	51
Figure 16 : Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par sonification.	53
Figure 17 : Spectre d'absorption de phycocyanine extraite par congélation/décongélation.....	54
Figure 18 : Couleurs des extraits de phycocyanine après le test FRAP	55
Figure 19 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	57
Figure 20 : Concentration des polyphénols totaux issus de la phycocyanine	58
Figure 21 : Comparaison du taux de polyphénols entre nos résultats et résultats de Lafri <i>et al.</i> ,2018.....	59

Liste des Tableaux

Tableau 1: comparaison morpho-anatomiques des genres <i>Spirulina</i> et <i>Arthrospira</i> (AHOUNOU, 2018 ; SGUERA, 2008).	9
Tableau 2 : Pourcentage moyen des acides aminés de <i>Spirulina platensis</i> selon différents auteurs et la masse d'acides aminés en gramme par kilogramme de Spiruline (CHARPY,2008 ; GOULAMABASSE, 2018).....	14
Tableau 3 : Composition en minéraux de la Spiruline et doses requises (FALQUET, 2006).	19
Tableau 4 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de <i>Spirulina platensis</i> (PIERLOVISI, 2007 ; CHARPY, 2008).....	20
Tableau 5 : Les différentes méthodes d'extraction de la phycocyanine (BENAHMED, 2012) ...	24
Tableau 6: Dosage de polyphénols dans les extraits de la phycocyanine.	41
Tableau 7: Valeurs de pH de la poudre de la spiruline	44
Tableau 8 : Taux d'humidité de la poudre de spiruline.....	44
Tableau 9 : Valeurs des concentrations et des degrés de pureté de la phycocyanine en fonction du mode d'extraction.....	45
Tableau 13 : Les absorbances des extraits et de témoin après test de FRAP.....	55
Tableau 14 : Résultats du dosage des polyphénols.	57



Parallèlement au développement de la recherche pharmaceutique biologique marine, les produits cosmétiques, les médicaments hautement efficaces et faiblement toxiques et les aliments fonctionnels isolés à partir d'organismes marins sont devenus un nouveau domaine de la pharmacie, de la bromatologie et de la cosmétologie. L'évolution de la cosmétologie est depuis ces dernières années, considérable, notamment par le nombre de nouvelles substances qui apparaissent s'appuyant sur des faits précis d'ordre biologique et physicochimique. Cette nouvelle conception s'est définitivement imposée. Ce qui nous a donné la motivation de commencer à rechercher et d'exploiter cette richesse marine pour la fabrication d'un produit bio à base d'algue pour un effet anti-acné sur la peau (FLAVIE, 2011).

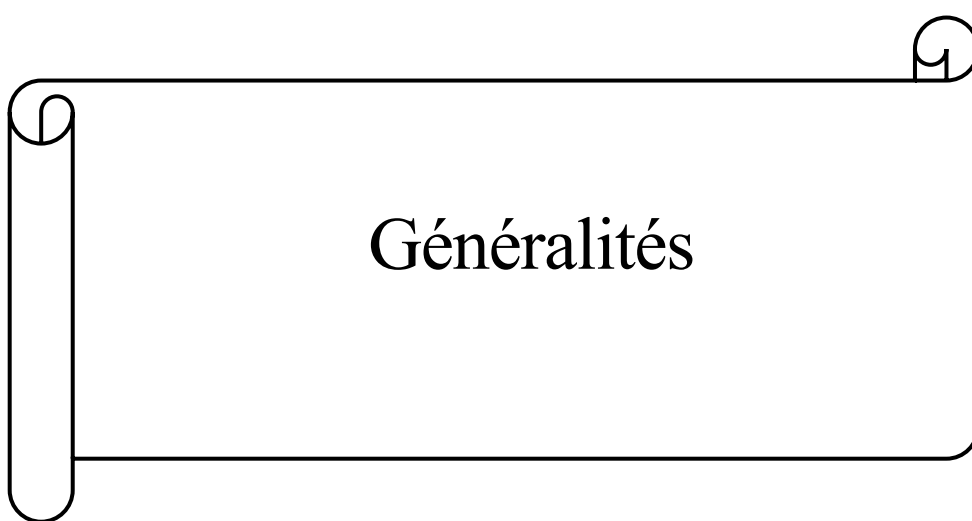
La plupart des cyanobactéries sont toxiques, mais une poignée d'entre elles, ne l'est pas et est propre à la consommation humaine. Le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une microalgue particulièrement intéressante dénommée *Spirulina platensis*, plus connue sous le nom d'algue spiruline (ALAIN, 2006).

Cette cyanobactérie est de plus en plus produite au fil des années, avec une production mondiale avoisinant les 20 000 tonnes par an, quantité destinée à la vente. Elle est vendue sous forme de poudre, de paillettes, de gélules ou encore de comprimés. Elle a été présentée comme le meilleur aliment pour l'avenir « best food for the future » lors de la conférence des Nations Unies sur l'Alimentation en 1974 (AHOUNOU, 2018)(MORGAN, 2019)

La spiruline est une microalgue aux qualités nutritionnelles exceptionnelles par sa composition en protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux et qui fait beaucoup parler d'elle ces dernières années. Elle est déjà utilisée sur tous les continents pour lutter contre la malnutrition. Ceci principalement grâce à son principal pigment fameux, la phycocyanine, donnant à cet organisme sa couleur bleu-vert caractéristique, possédant un pouvoir antioxydant intéressant (SGUERA, 2008).

La première partie de ce mémoire permettra de découvrir les cyanobactéries, la spiruline, son histoire, sa morphologie avec un arrêt sur la composition biochimique qualitative et quantitative de la spiruline et une revue bibliographique permet de faire un point sur tout ce qui concerne la phycocyanine issue de la spiruline.

La deuxième partie sera consacrée aux différentes expérimentations faites concernant l'extraction de ce pigment bleu. La dernière partie permettra de déterminer les propriétés antioxydantes et réductrices susceptibles de justifier les usages pour lesquels la phycocyanine est recommandée en cosmétologie, pour se faire nous effectuerons une étude sur les résultats obtenus.



Généralités

1 LES CYANOBACTERIES

Les cyanobactéries sont des vrais procaryotes, des organismes dépourvus de membrane nucléaire malgré leur système photosynthétique proche de celui des eucaryotes (GOULAMABASSE, 2018), un groupe photo-autotrophe à Gram négatif, sont capables d'effectuer une photosynthèse oxygénée. Cette classe unique de micro-organismes porte de nombreux noms, comme les cyanoprocaryotes, les cyanophytes et les bactéries bleu-vert. Ces noms dérivent de la présence d'un pigment de couleur bleu-vert, la c-phycoyanine (C-PC), qui est un pigment utilisé pour la photosynthèse. Ces bactéries ont un record fossile de 3,3 à 3,5 milliards d'années, (SINGH *et al.*, 2011). Les cyanobactéries se distinguent des bactéries par la présence de chlorophylle A et de pigments accessoires hydrosolubles, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleue (phycoyanine). Elles possèdent aussi des caroténoïdes : β -carotène, échinénone, zéaxanthine, myxoxanthophylle.

1.1 Écologie

Les cyanobactéries sont connues depuis longtemps pour leur impact écologique et agricole; c'est-à-dire, en tant que principaux colonisateurs d'un écosystème, leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et à solubiliser les phosphates. (SINGH *et al.* 2011). La plupart des cyanobactéries sont capables de se déplacer, soit à l'aide de vésicules gazeuses (dans les liquides) soit, dans le cas des cyanobactéries filamenteuses, par glissement (jusqu'à 25 microns par seconde) grâce à des microfibrilles. Ainsi, elles ont colonisé à peu près tous les milieux, qu'ils soient aquatiques ou terrestres, dans des conditions extrêmes puisqu'on les observe dans les glaces des pôles. Elles peuvent vivre aussi en symbiose avec d'autres organismes ; leur mode de vie peut être planctonique (vivant dans la masse d'eau et se laissant transporter par ses mouvements) ou benthique (fixés aux substrats immergés) (SGUERA, 2008).

1.2 Reproduction

La reproduction se fait de façon asexuée (végétative) par une scissiparité (scission simple ou multiple), par bourgeonnement ou encore par fragmentation au hasard (GOULAMABASSE , 2018) chez certaines espèces, des cellules spécialisées (akinetes) peuvent résister à la dessiccation puis "germer" lorsque les conditions redeviennent favorables (FALQUET et HURNI, 1986).

1.3 La morphologie

La morphologie des cyanobactéries varie des formes unicellulaires aux formes filamenteuses ou coloniales. Les colonies sont souvent entourées d'une gaine mucilagineuse ou gélatineuse, selon les conditions environnementales (SINGH *et al.*, 2011).

Ces organismes présentent trois types cellulaires différents :

- Les cellules végétatives de forme variées rondes, ovoïdes, oblongues, quadratiques et avec un contenu cellulaire homogène ou non, avec ou sans vacuole à gaz ;
- Les hétérocystes, cellules spécialisées dans la fixation de l'azote atmosphérique, rencontrés uniquement chez les représentants des ordres des Nostocales et des Stigonematales ;
- les akinètes, cellules de résistance à la paroi épaisse et qui contiennent des réserves permettant aux espèces qui les possèdent (ordres des Nostocales et des Stigonematales) de survivre en conditions environnementales défavorables (THOMAZEAU, 2006).

1.4 Classifications :

Les cyanobactéries sont reconnues à la fois par le Code International de Nomenclature Botanique et par le Code International de Nomenclature Bactériologique. Le premier se base essentiellement sur le mode de reproduction et la morphologie tandis que le second est fondé sur des critères physiologiques et génotypiques de cultures pures. Ces deux classifications reconnaissent cependant les mêmes sections ou ordres et les divergences résident essentiellement au niveau des taxons inférieurs (espèces) (THOMAZEAU, 2006) ; Ils sont composés d'une large gamme de bactéries de différentes formes et tailles. Ils peuvent couvrir 150 genres identifiés à ce jour (CHITTORA *et al*, 2020).

2 la spiruline

2.1 Origine de la spiruline: découverte et histoire

Les algues sont au menu des humains depuis la nuit des temps , un aliment de base en chine , au japon , dès la préhistoire .Il est admis par la communauté scientifique que l'apparition des cyanobactéries date de 3,5 milliards d'années, constituant ainsi les plus anciennes formes de vie sur terre. La spiruline est considérée par les biologistes comme l'un des des premiers végétaux sur terre (FERHAT.W & LEKHAL.S, 2019). (AUDREY, 2016) ;(AHOUNOU, 2018).

Au XV^{ème} siècle au Tchad , la spiruline était récoltée par les Kanembous sous forme de tapis épais vert , puis sécher au soleil , transformer en galettes nommés“ Dihé “ et vendus sur le marché.

C'était les femmes enceintes surtout qui récoltaient cette algue , en croyant de la légende qui raconte que la couleur sombre du dihé protégerait leurs foetus du mauvais oeil (AHOUNOU, 2018).

Au XVI^{ème} siècle : les conquistadors espagnols découvrent une nouvelle nourriture que les aztèques appelait “ Tecuitlat “ récolté à la surface du lac Texecoco et transformer en gateaux bleu-

vert . À cause de l'assèchement des lacs au profit des urbains et agricoles , le tecuitlat tombe dans l'oubli , à la fin du siècle(AHOUNOU, 2018).

En 1844 , Wittrock et Nordstedt, 2 chercheurs qui ont annoncé la présence d'une microalgue bleu-vert hélicoïdale *Spirulina jeneri* f. *platensis*.

En 1930 , le professeur Creac'H de Bordeaux , découvrit aussi des galettes de couleur vertes-bleuâtre , le dihé vendu sur le marché de Massakong au Tchad , quelques échantillons étaient prises en France pour les analyser (JORIS, 2015).

En 1940 , bien que déjà décrite par Wittrock et Nordstedt en 1844, ne fut vraiment redécouverte qu'en 1940 au Tchad par Pierre Dangeard un botaniste algologue qui examina des galettes et trouva qu'il étaient composées d'une algue qui émerveillait le monde par sa teneur en protéine , et mentionne pour la première fois son utilisation alimentaire dans le bulletin de la société linéenne de Bordeaux . puis en 1960 le botaniste belge JEAN Leonard a identifié la substance présente dans la galette comme de la spiruline : trésor de protéine , confirmant le rapport de Dangeard (JORIS, 2015).

1969-1970 :La création de Laboratoire de Ripley.D.Fox docteur en microbiologie pour l'étude de la culture de la spiruline et réaliser des techniques pour faciliter la production de spiruline dans des pays en voie de développement .¹

En 1974 lors de la conférence internationale sur les protéines microscopiques et la conférence alimentaire des Nations Unies, la spiruline est déclarée "Aliment de santé supérieure du XXI^{ème} siècle (AHOUNOU, 2018).

En 1983, la société américaine Earthrise constitua sa ferme de spiruline dans le désert de Californie, et devint leader mondial sur le marché de spiruline une culture mondiale était implantée en plusieurs endroits dans le monde. (SGUERA, 2008).

En 1996, l'OMS déclare la spiruline meilleure nourriture pour l'avenir (AHOUNOU, 2018).

En 2008, la FAO reconnaît l'intérêt de la spiruline, et voudrait élaborer un guide pratique pour la production de cette dernière ou pour diversifier les cultures existantes(AUDREY, 2016).

Entre les 18 et 25 avril 2004 , en Algérie le premier mini-colloque sur la spiruline est installé à Tamnarasset ,par invitation de Kada Hiri , des chercheurs ayant une expérience de la culture et des utilisations sont venus de France pour informer les représentants des services de l'agriculture de

l'intérêt de développement de culture de la spiruline dans la région et pour s'étendre dans tout l'Algérie (FERHAT.W & LEKHAL.S, 2019). Hiri .A et Seggai , ont réussi de la déplacer de son environnement naturel vers un bassin qui produit 20 Kg de spiruline par an à Tamanrasset .

En 2013, un jeune aquaculteur à Oran "Redouane Anouar " a commencé de produire la spiruline , fabrique en masse puis la distribuer aux herboristes sur tout le territoire Algérien.

2.2 Qu'est-ce que la spiruline ?

C'est une cyanobactérie spiralée filamenteuse du genre *Arthrospira* , vivant en eau douce (B.Branger, 2003), elle appartient à l'embranchement des procaryotes .Gram négative .Elle peuvent être unicellulaire ou pluricellulaire dont les cellules s'arrangent en amas de type colonies ou en filaments composé de cellules alignées , de couleur bleu-verte car elle possède le pigment bleu la phycocyanine et le pigment vert la chlorophylle (AHOUNOU, 2018) (LOUVEL, 2019) (HOCINI, 2017) (B.Branger, 2003).

Ce procaryote qui a la capacité d'effectuer la photosynthèse par : l'énergie lumineuse capté par la chlorophylle , l'eau (comme donneur d'électrons) et les composés minéraux , transforme le gaz carbonique et libère l'oxygène . Ce qu'il fait des algues les plus producteurs de l'O₂ dans la planète (90% d'O₂ de la planète) . Ce qui aide dans le maintien de l'équilibre des proportions entre CO₂ et O₂ de l'atmosphère terrestre et permet de lutter contre le réchauffement climatique. (HOCINI, 2017). Elle est dite photo-litho-autotrophe car :

- Photo : par rapport à la photosynthèse (réduit le CO₂ à la lumière).
- Litho : se nourrit de minéraux
- Autotrophe : au carbone et l'azote. Génère sa propre matière organique, ce qui permet de produire des Acides Aminés et protéines (LOUVEL, 2019).

Le rayonnement solaire a un rôle important dans la croissance de la spiruline, car plus l'eau est exposée à un niveau assez élevé de luminosité, plus le pH et la salinité de l'eau sont élevés et donc plus de chance de pousser de cette algue (AUDREY, 2016 ; LOUVEL, 2019 ; PROY, 2019).


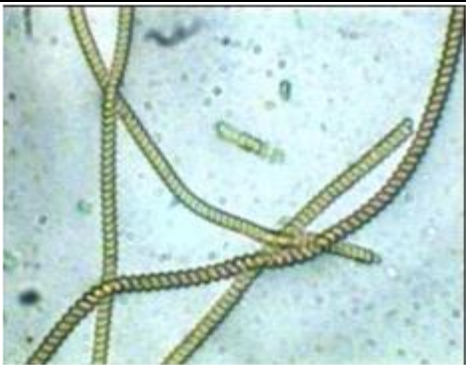
2.3 Taxonomie

La spiruline a été décrite pour la première fois par Wittrock et Nordsted en 1844 sous le nom de *Spirulina jenneri plantensis Nordsted* (AHOUNOU, 2018).

En 1962 STANIER ET VAN NIEL, signalaient que cette algue est dénuée de compartiments cellulaires. C'est pour ça ils ont la classer parmi les procaryotes puis ils proposaient de désigner ce microorganisme de « cyanobactérie », avec un préfixe d'origine Grec « cyano, cyan » du nom du pigment bleu la phycocyanine, cette nouvelle nomination est acceptée et figure à « Bergey's manual of determinate Bacteriology » en 1974 in Durand-Chastel pour la première fois (SGUERA, 2008).

la terminologie de la spiruline est assez confuse , en fonction des recherches et articles , deux noms de genres de spiruline sont donnés *Arthrospira* et *Spirulina* , la confusion entre les deux noms est due à la décision d'unifier les deux genres *Arthrospira* Stizenberger(nom initiale donné à la spiruline et présente une forme avec un septum visible) et *Spirulina* Turpin (forme asseptée) (AHOUNOU, 2018)sous le nom *Spirulina* en 1932 par M. Geitler (BOUDOUR, 2008) sur la base de leur trichome en spirales et sa forme hélicoïdale , , malgré les différences morphologiques entres les deux genres cités si dans le tableau 1 : (AUDREY , 2016 ; SGUERA,2008).

Tableau 1: comparaison morpho-anatomiques des genres *Spirulina* et *Arthrospira* (AHOUNOU, 2018 ; SGUERA, 2008).

	Arthrospira	Spirulina
Trichome	Hélice ouverte	Hélice presque fermée
Paroi cellulaire	Visible si les vacuoles à gaz ne sont pas trop nombreuses	Difficilement visible
Taille et spécificité des cellules	6 à 12µm de large Possible constrictions entre cellules adjacentes	2 à 4µm de large Peu ou pas de constrictions entre cellules adjacentes Forme non fixe Mobilité
Reproduction	Scission simple : fragmentation du trichome en hormogonies à partir des cellules nécrériques Toutes les cellules se divisent sauf les cellules apicales	Scission simple : Fragmentation du trichome en hormogonies (sans les cellules nécrériques) Toutes les cellules se divisent
Mobilité	Mobile par Rotation	Permanente par rotation
Génome	ADN : 43% de G+C	ADN : 44 à 53% de G+C
Représentation		

Parmi les espèces les mieux connus du genre *Arthrospira*, *Arthrospira Platensis* (*Spirulina Platensis*) origine d'Afrique et *Arthrospira maxima* de l'Amérique centrale (HOCINI ,2017 ; PROY,2019).

✓ **Systématique :** (AHOUNOU, 2018).

Embranchement	Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Sous classe	Oscillatoriothricales
Ordre	Oscillatoriales
Famille	Oscillatoriaceae
Genre	<i>Spirulina</i>

2.4 Morphologie

La spiruline est un microorganisme qui a une longueur moyenne de 250 μm et 3-4 μm de large, composé de filaments mobiles bleu-vert de 10-12 μm non ramifiés et enroulés en spirales, 6 ou 7 spires en générale (de forme hélicoïdale observable qu'en milieu liquide au microscope) qui ressemble à un minuscule ressort à boudin, d'où le nom spiruline, en latin *Spira* signifie enroulement. Plus précisément, ces filaments bleu-verts appelés trichome sont formés de cellules transparentes empilées bout à bout (AHOUNOU, 2018 ; HOCINI, 2017 ; AUDREY, 2016 ; PROY, 2019 ; LOUVEL, 2019). L'enroulement du trichome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au dessus de spirale, plusieurs facteurs environnementaux tel que la température a une influence sur l'orientation de l'hélice, ce qui lui permet de se déplacer dans l'eau en adaptant le mouvement d'un vis.

Elle a une structure procaryote qui possède une membrane pluristratifiée de 4 couches (AHOUNOU, 2018 ; HOCINI, 2017). Et elle contient du peptidoglycane, ce qui la confère une protection contre la pression osmotique, de conserver sa forme spiralée et de vivre dans des milieux salinisés (PROY, 2019). Les vacuoles de l'air permettent aux filaments de flotter, de se protéger de l'ensoleillement excessif et d'atteindre les fonds remplis de sel nutritif (AUDREY, 2016 ; PROY, 2019 ; LOUVEL, 2019)

Les filaments d'*Arthrospira* sont motiles se déplaçant par des mouvements en vrilles plus d'un μm par seconde, cette motilité lui permet de se protéger des fortes expositions de soleil et ils prennent des formes irrégulières, on trouve des formes spiralées classiques ondulées, droites. Cette particularité est en relation avec les conditions écologiques rencontrés dans leur habitat (température, facteurs liés au changement génétique (AHOUNOU, 2018 ; LOUVEL, 2019).

La spiruline passe en état de repos et s'arrête de se reproduire quand la température est élevée, perd sa couleur et devient blanc nacré ce qui transforme son contenu protéique en polysaccharides et donne un goût sucré (LOUVEL, 2019 ; PROY, 2019).

2.5 Reproduction

Chaque jour la spiruline se développe de 25%, sa quantité se doublant en 4 jours selon les conditions environnantes. Elle a un mode de reproduction asexué effectué par scission simple, division binaire (cellule se divise en deux cellules égales), par bourgeonnement ou fragmentation au hasard des filaments. (GOULAMABASSE, 2018)

Les étapes fondamentales :

- Maturation le filament mature de la spiruline se devise en plusieurs morceaux en formant des cellules spécialisées appelés “nercedies “ de forme biconcave ressemble à un disque de séparation.
- Fragmentation de trichome : à ce niveau le trichome se fragmente et forme 2 nouveaux cellules de courtes chaines glissantes appelé hormogonies.
- Fission binaire : les hormogonies croissent par division binaire en prenant la forme hélicoïdale connu de la spiruline, chacune des cellules donne 2 cellules par scissiparité (AHOUNOU, 2018)

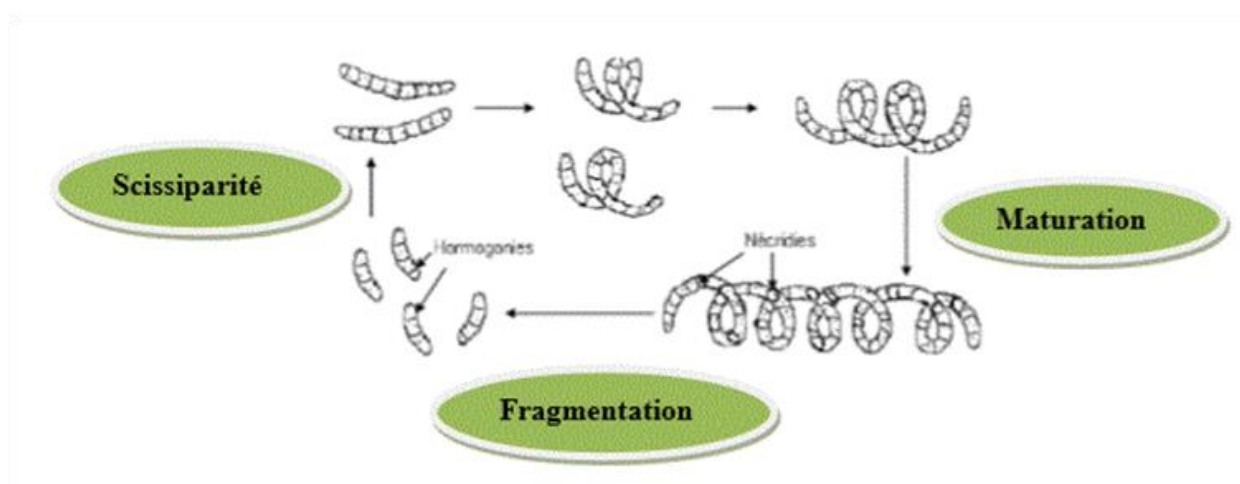


Figure 1: Cycle biologique de la spiruline modifié (AHOUNOU, 2018)

2.6 Répartition géographique

la spiruline se développe préférentiellement dans des eaux natronées (riche en carbonate de sodium ou natron (Na_2CO_3), plus communément dans les eaux saumâtres (20-70 g de sel/litre d'eau), chaudes et ensoleillé (T° entre $35-40^\circ\text{C}$) ainsi que dans les lacs alcalins des régions tropical et semi-tropical (PH entre 8.5 et 11), dans des zones minéralisés riche en nutriments azotés et phosphorés, l'urée, sulfate de magnésium, apportés par les affluents des lacs et des sols et riche en gaz carbonique et oxygéné tels que les lacs de l'Afrique (Tchad, Tunisie, Ethiopie), de l'Asie (Thaïlande, Inde, ...), de l'Amérique latine (Pérou, Mexique ..) (BOUDOUR, 2008).

Elle est limitée dans la ceinture tropicale entre 35°C latitude Nord et 35°C latitude Sud à cause de son caractère thermophile et des besoins en lumière (SGUERA, 2008).

2.7 Composition chimique de la spiruline

La plupart des études des constituants de la Spiruline ont été réalisées sur *Spirulina platensis*. Cette espèce sert de référence car sa composition est relativement constante même si elle varie selon la souche, les conditions de culture (moment de la récolte, mode de séchage, enrichissement des intrants...) et le mode de conditionnement. Les méthodes d'investigation analytiques (spectroscopie, chromatographie, ...) ont permis d'identifier et de doser l'ensemble de ces constituants avec une grande précision. Chacun des éléments composant la Spiruline apporte ses actions propres et l'effet global de l'ensemble s'y ajoute pour donner un effet synergique lié à un dosage naturel idéal. (CHARPY, 2008)

En général la spiruline est composée de 70% de protéines, 20% de glucides, 5% de lipides, 7% de minéraux et de 3 à 6% d'eau. Cette composition est très complète et variée : avec un excellent apport en protéines, une bonne répartition des lipides, des glucides, des vitamines, des minéraux et des oligo-éléments.(GOULAMABASSE, 2018).

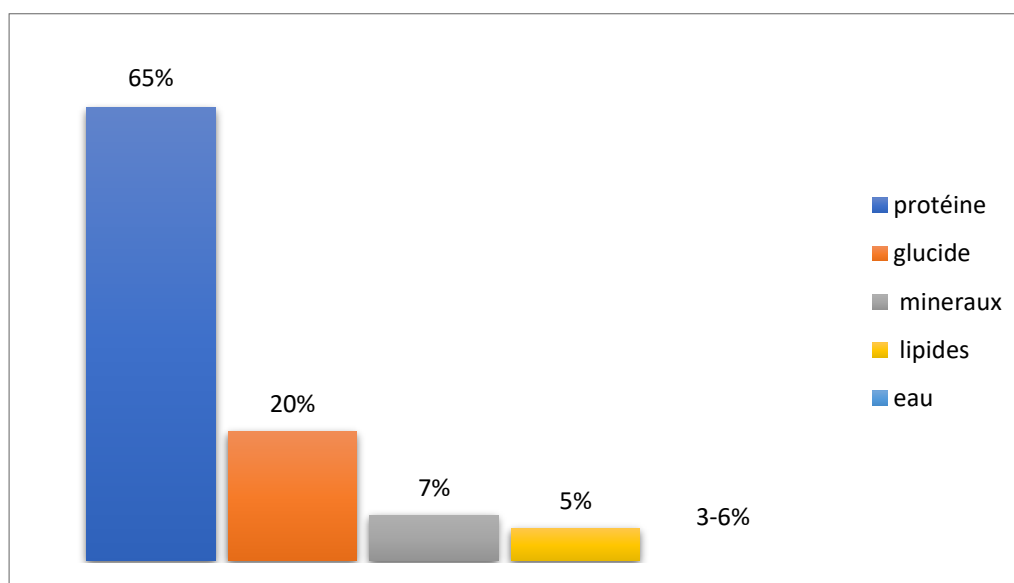


Figure 2 : Composition de la spiruline

2.7.1 Protéines et acides aminés

La spiruline est caractérisée par un très fort taux de protéines pouvant atteindre jusqu'à 70 % du poids sec de l'algue. C'est l'aliment le plus riche en protéines connu à ce jour puisqu'elle en contient deux fois plus que le soja et trois plus que la viande ou le poisson. Ces teneurs varient cependant en fonction du moment de la récolte et de la technique de séchage utilisée : elles seront maximales quand la spiruline sera récoltée en début de la photopériode et quand le séchage se fera par pulvérisation. Sur le plan qualitatif, elle offre un éventail complet d'acides aminés dont 47 % sont des acides aminés essentiels, c'est-à-dire qui ne peuvent être synthétisés par l'organisme et

doivent obligatoirement être amenés par l'alimentation. A ce titre, la spiruline peut se voir attribuer le statut d'aliment protéique complet. Cependant, comme dans la plupart des végétaux, certains acides aminés ne sont présents qu'en faible quantité : c'est le cas des acides aminés soufrés (Méthionine et Cystéine) et de la Lysine.

Les protéines de la spiruline ont une très haute digestibilité (coefficient de digestibilité (DC), est la proportion d'azote contenu dans les aliments effectivement absorbé) de l'ordre de 75 à 83 %, qui s'explique par le fait que l'algue est entourée d'une enveloppe fragile constituée de polysaccharides. Qui rend le contenu cellulaire beaucoup plus accessible aux enzymes de la digestion par rapport aux parois pecto-cellulosiques classiques. Ces protéines seront donc facilement assimilables, même chez des personnes souffrant de pathologies intestinales freinant l'assimilation des nutriments. La spiruline conserve la plupart de ses vertus nutritives car sa consommation ne requiert ni cuisson, ni traitement préalable (PIERLOVISI, 2008).

Les algues présentent également un bon rapport d'efficacité protéique (PER), la méthode la plus simple et la plus utilisée évaluer les protéines par des tests d'alimentation animale. Pour les algues bleu-vert, bien que inférieures à celles des animaux protéines, le PER est beaucoup plus élevé que la plupart des végétales protéine (GUTIERREZ-SALMEAN *et al.*, 2015).

La Spiruline possède la plupart des acides aminés dont les acides aminés essentiels (Tableau 2) (CHARPY, 2008).

Tableau 2 : Pourcentage moyen des acides aminés de *Spirulina platensis* selon différents auteurs et la masse d'acides aminés en gramme par kilogramme de Spiruline (CHARPY,2008 ; GOULAMABASSE, 2018).

Acides Aminés	Jacquet1974	Clément 1975b	Fox 1999	Borowitzka	Masse en g/Kg de spiruline
Acides aminés essentiels * (%)					
Isoleucine	5.60	6.40	5.98	5.70	35
Leucine	8.00	9.00	8.71	8.70	54
Lysine	4.20	4.80	5.28	5.10	29
Méthionine	2.25	2.60	2.85	2.60	14
Phénylalanine	4.40	4.60	5.09	5.00	28
Thréonine	4.70	5.50	5.58	5.40	32
Tryptophane	1.00	1.60	1.48	1.50	9
Valine	5.70	6.90	7.72	7.50	40
Acides aminés non essentiels (%)					
Alanine	7.25	7.90	8.24	7.90	47
Arginine	6.60	6.70	7.92	7.60	43
Acide aspartique	9.30	9.20	9.0	9.10	61
Cystéine	0.95	0.90	0.93	0.90	6
Acide Glutamique	NC	12.90	13.20	12.70	91
Glycine	4.80	5.00	5.07	4.80	32
Histidine	1.60	1.60	1.50	1.50	10
Proline	3.60	3.90	4.32	4.10	27
Sérine	5.00	5.60	5.46	5.30	32
Tyrosine	4.30	4.90	NC	4.60	30

2.7.2 Acides nucléiques

Chez *Spirulina platensis*, on rapporte des valeurs de 4,2 à 6% d'acides nucléiques totaux dans la matière sèche (30% ADN et 70% ARN) La teneur en acides nucléiques (ADN et ARN) est un point nutritionnel important car la dégradation biochimique d'une partie de leurs composants (les purines : adénine et guanine) produit en dernier lieu de l'acide urique. Or, une élévation du taux d'acide urique plasmatique peut produire à la longue des calculs rénaux et des crises de goutte. On admet généralement que la dose maximum admissible à long terme d'acide nucléique se situe aux alentours de 4 g par jour, pour un adulte. Il faudrait, donc consommer 80 g de spiruline sèche pour atteindre cette dose (la quantité de spiruline usuellement consommée ne dépasse pas 10 g de matière sèche). 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.

Il faut ajouter que 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, tels que l'âge, le sexe ou encore l'obésité.... La teneur en acides nucléiques des spirulines est très inférieure à celle de la généralité des unicellulaires (GOULAMABASSE, 2018).

2.7.3 Lipides et acides gras

La spiruline n'est pas un aliment gras, les lipides ne représentent, généralement, que 6 à 8% de son poids sec, mais ce pourcentage peut atteindre 11% selon les modes d'extraction ou la souche de Spiruline utilisée.

La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés (AGPI). Elle se subdivise en deux fractions : une fraction saponifiable « ou acides gras » (83%) et une fraction insaponifiable (17%).

2.7.3.1 Les acides gras

Les acides gras font partie intégrante des lipides qui sont des nutriments indispensables au système nerveux, système cardiovasculaire et à la peau. Ils jouent un rôle énergétique et constituent au maintien de la chaleur corporelle. De plus, ils véhiculent les vitamines liposolubles (A, D, E, K) et contribuent à leur absorption (GOULAMABASSE, 2018). La fraction saponifiable: représentant 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la spiruline, est essentiellement composée de monogalactosyl diglycéride et de digalactosyl diglycéride (23%), de sulfoquinovosyl diglycéride (5%) et de phosphatidyl glycérol (25,9%) ,Les triglycérides ne sont présents qu'à de très faibles taux (0,3%). La phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine et le phosphatidyl inositol ne sont pas présents en quantité appréciable. Il est à noter que 4,6% de phospholipides sont encore indéfinis.(Charpy, 2008) ; en plus la spiruline est considéré comme une bonne source de gamma-

linoléique, linoléique et les acides oléiques. Le premier a reçu beaucoup attention car il n'y a pas beaucoup de sources de nourriture qui contiennent une quantité importante ; en fait, la spiruline est considérée la source végétale avec la plus grande quantité (représentant environ 20% de son acide gras total contenu). L'importance de l'acide gamma-linolénique repose sur le fait qu'il est le précurseur des prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes; ainsi, comme ils sont médiateurs de l'inflammation et des processus immunitaires, ils participer au cours de conditions telles que l'arthrite, diabète, maladies cardiovasculaires et vieillissement cellulaire Enfin, l'acide gamma-linolénique est à l'étude en tant que un agent potentiellement antinéoplasique comme cela a été montré qu'il peut supprimer la croissance (GUTIERREZ-SALMEAN et al., 2015).

2.7.3.2 La fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable est composée essentiellement de stérols, de terpènes, d'hydrocarbures saturés (paraffines) et de pigments. Cette fraction représente 1,1% à 1,3% de la matière sèche de la spiruline.

a. Les stérols

Bien que certaines études révèlent l'absence de stérols, il semblerait que ces derniers représentent néanmoins 1,5% de la fraction lipidique non polaire de la Spiruline. Aucune publication ne dépasse cependant la valeur de 0,015% du poids sec de la cyanophycée.

b. Les terpènes

Les terpènes représentent de 5 à 10% de la fraction insaponifiable. Chez *Spirulina platensis*, ils sont essentiellement représentés par l'alpha et le bêtaamyrine, un triterpène pentacyclique.

c. Les hydrocarbures saturés : paraffines

Les hydrocarbures saturés à longues chaînes (paraffine) constituent 25% des lipides insaponifiables chez *Spirulina platensis*, soit 0,1 à 0,3% de la matière sèche. Les paraffines sont fréquemment retrouvées dans diverses sources alimentaires. Ce type de molécules et en particulier le n-heptadécane peut être toxique (CHARPY, 2008).

2.7.4 Les glucides

Les glucides représentent 15 à 25 % du poids sec de l'algue. Les sucres simples et les polyols ne sont présents qu'en très faible quantité. Les glucides assimilables sont représentés par du rhamnosane et du glucosane aminés, respectivement environ 2 % et 10 %. On note aussi la présence de glycogène (0,5 %).

La paroi de la spiruline est une paroi type bactérie Gram-négative constituée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides et ne renfermant que très peu de cellulose. Elle ne peut être digérée mais sa fragilité rend le contenu cellulaire plus accessible aux enzymes de la digestion par rapport aux parois pectocellulosiques classiques. Parmi les cyclitols, on remarque une forte quantité de méso-inositol phosphate : la spiruline est en effet une excellente source de phosphore organique et d'inositol (plusieurs fois supérieur à la teneur en inositol de la viande de bœuf et des végétaux qui en sont les plus riches). Parmi les glucides de la spiruline, plusieurs polysaccharides ont été étudiés *in vitro* pour leurs activités biologiques. Ainsi, le Calcium-*spirulan* ou le Sodium-*spirulan* (polysaccharides sulfatés chélatés à un atome de calcium ou de sodium) ont fait l'objet d'études scientifiques *in vitro* pour leur propriétés anticoagulantes, antivirales et immunostimulantes, et l'immulina, polysaccharide de très haut poids moléculaire (environ 1 million de daltons) semble lui aussi stimuler l'immunité(PIERLOVISI, 2008).

2.7.5 Les vitamines

Les vitamines sont des composés organiques qui agissent en petites quantités et ayant un rôle dans le développement, le fonctionnement et l'entretien de l'organisme. Hormis la vitamine D qui est synthétisée au niveau de la peau, les vitamines doivent être apportées par l'alimentation en quantité minimales, quelques milligrammes voire microgrammes par jour (GOULAMABASSE, 2018).

La spiruline contient une large gamme de vitamines, elle est très riche en vitamines du groupe B, notamment en vitamine B12 puisqu'elle en contient 4 fois plus que le foie de veau. 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. D'autre part, elle se distingue par sa richesse en β -carotène (jusqu'à 80 % des caroténoïdes totaux) convertible chez l'Homme en vitamine A. 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. La vitamine E est retrouvée à des taux comparables aux germes de blé (PIERLOVISI, 2008) et la vitamine C n'existe qu'à l'état de trace dans la Spiruline(CHARPY, 2008).

Vitamines A et E, connues pour leurs propriétés antioxydantes, ont un intérêt biologique chez l'Homme et assurent aussi 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 : ainsi, un séchage à basse température, tout comme une granulométrie grossière limitent la dégradation de ces molécules (PIERLOVISI , 2008).

La teneur en vitamines de matière sèche de Spiruline est variable car elles concernent différentes productions avec des procédés de conservation variés. En effet, les vitamines sont sensibles à la chaleur. D'après certaines études, les teneurs en vitamines seraient diminuées d'environ un tiers dans le cas de séchage sur des tambours chauffants. La granulométrie du produit final intervient également dans la préservation immédiate et la conservation à long terme des vitamines notamment pour le β -carotène. Une granulométrie plus élevée permettrait une meilleure conservation. Dans ce cas, le séchage par pulvérisation est déconseillé (CHARPY, 2008).

2.7.6 Sels Minéraux et Oligo-éléments

La richesse de la spiruline en fer (10 grammes de spiruline correspondent à environ 80 % des apports journaliers recommandés AJR), dont la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande, se révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques. Calcium et phosphore sont présents à des taux comparables à ceux retrouvés dans le lait et dans des proportions qui excluent tout risque de décalcification par apport excessif de phosphore. La spiruline est aussi une bonne source de magnésium bio disponible chez l'Homme. Le potassium est richement représenté dans la spiruline, atout intéressant dans les pays industrialisés où le rapport sodium/potassium est souvent trop élevé. Enfin, Il est possible d'enrichir des souches de spiruline en certains oligoéléments (Zinc, Sélénium...) en modifiant leur milieu de culture (PIERLOVISI 2008).

Tableau 3 : Composition en minéraux de la Spiruline et doses requises (FALQUET, 2006).

Minéraux	Teneur(mg/kg)	Doses requises (mg/jour)
Calcium	1300-1400	1200
Phosphore	6700-9000	1000
Magnésium	2000-2900	250-350
Fer	580-1800	18
Zinc	21-40	15
Cuivre	8-10	1.5-3
Chrome	2.8	0.5 – 2
Manganèse	25 – 37	5
Sodium	4500	500
Potassium	6400 – 15400	3500
Sélénium	0.01 – 50	0.05

Les minéraux spécialement intéressants chez la spiruline sont le fer, le zinc, le magnésium, le calcium, le phosphore et le potassium.

2.7.7 Pigments

La spiruline renferme de la chlorophylle a, typique chez les végétaux, des caroténoïdes dont le principal est le β -carotène et des phycobiliprotéines. Ces pigments présentent un intérêt dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

✓ Les phycobiliprotéines

Ce sont des pigments protéiques constitués d'un chromophore et d'une apoprotéine liés par une liaison covalente de type thioéther. La structure du chromophore (groupement tétrapyrrolique de type -biline), proche de celles des acides biliaires de l'organisme, est à l'origine de la bonne assimilation intestinale des phycobiliprotéines. ...)(PIERLOVISI, 2008). Parmi elles, on trouve : La phycocyanine, responsable de la coloration bleue représente entre 12,6 % et 20% du poids sec. Cette protéine qui n'est retrouvée que dans la spiruline, contient un noyau renfermant un ion fer et un ion magnésium, et est donc considérée comme le précurseur de l'hémoglobine (noyau avec un

ion fer) et de la chlorophylle (noyau avec un ion magnésium), à la charnière entre le monde végétal et animal. Elle fait l'objet de nombreuses recherches abordées plus loin (Manet, 2016). et l'allophycocyanine, pigments de couleur bleue rare dans la nature ; la phycoérythrine et l'allophycoérythrine, pigments rouges. Les phycobiliprotéines s'associent au niveau de la membrane externe des thylacoïdes pour former une structure macromoléculaire : le phycobilisome qui capte la lumière et la véhicule vers les photosystèmes. antivirale, immunostimulante, inducteur de l'hématopoïèse (PIERLOVISI, 2008).

✓ La chlorophylle :

Dont la chlorophylle *a* (typique des végétaux) hauteur de 1 % de la masse sèche, pigment responsable de sa coloration verte. Si les plantes l'utilisent pour la photosynthèse, elle permet au corps humain de capter le magnésium organique nécessaire au maintien de l'équilibre acido-basique. Sa structure moléculaire ressemble à l'hémoglobine mais la molécule centrale est le magnésium et non le fer. De plus la chlorophylle s'associe à un cofacteur, la porphyrine (composant également présent dans la spiruline), pour chélater les métaux lourds, mercure, plomb, arsenic, ou nickel et les éliminer de l'organisme. La chlorophylle augmente le péristaltisme et soulage ainsi la constipation, elle normalise aussi la sécrétion digestive acide et la pepsine responsable d'ulcères digestifs. Cependant la chlorophylle est détruite à haute température d'où l'importance d'un séchage à basse température (MANET, 2016).

Tableau 4 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de *Spirulina platensis* (PIERLOVISI, 2007 ; CHARPY, 2008).

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

3 Phycocyanine

3.1 Définition de la Phycocyanine

Le terme 'phycocyanine' vient du grec « phyco » signifiant algue et « cyanine » venant de la couleur cyan, qui est dérivée du grec « kyanos » et signifie bleu-vert (WIHITTON et POTTS, 2000). La phycocyanine est un pigment respiratoire de nature polypeptidique (GIRARDIN-ANDREANI, 2005) appartient à la famille des phycobiliprotéines (PBP), caractérisée par une couleur bleue profonde et intense. (LIANGQIAN *et al.*, 2018), Elle n'a pas d'odeur particulière et elle est non toxique mais légèrement sucrée. Lors de la dissolution dans l'eau le pigment donne une couleur bleue brillante avec haute fluorescence rouge (BENAHMED, 2012).

Ce pigment est présent dans les cyanobactéries et les algues eucaryotes telles que Rhodophyta et Cryptomonads (GLAZER & STRYER, 1983). La PC est classé en trois types: C-PC (obtenu à partir de cyanobactéries), R-PC (obtenu à partir d'algues rouges) et R-PCII (obtenu à partir d'espèces *Synechococcus*) (FERNANDEZ-ROJAS *et al.*, 2014).

3.2 Phycobilisome et les phycobiliprotéines

Les cyanobactéries possèdent une large variété de composants colorés incluant les caroténoïdes, les chlorophylles et les phycobiliprotéines. Les phycobiliprotéines, dont fait partie la phycocyanine sont des chromoprotéines constituées d'une partie protéique et d'un pigment. Leur agrégation en complexe macromoléculaire forme le phycobilisome.

Les phycobilisomes sont attachés en matrices régulières à la surface externe de la membrane du thylacoïde, siège de la photosynthèse. Leur principale fonction est de servir de récepteur des rayons lumineux pour l'appareil photosynthétique de la spiruline et convertir cette énergie lumineuse en énergie électrochimique (SGUERA, 2008). Ces macrocomplexes protéiques sont composés d'un cœur sur lequel sont fixées des projections radiales (ou bras) (Figure 3).

Pour la spiruline, le cœur est composé de molécules d'allophycocyanine entourées de molécules de phycocyanine périphériques. La phycocyanine est le constituant principal alors que l'allophycocyanine fonctionne comme le pigment construisant un pont entre les phycobilisomes et les lamelles photosynthétiques du thylacoïde.

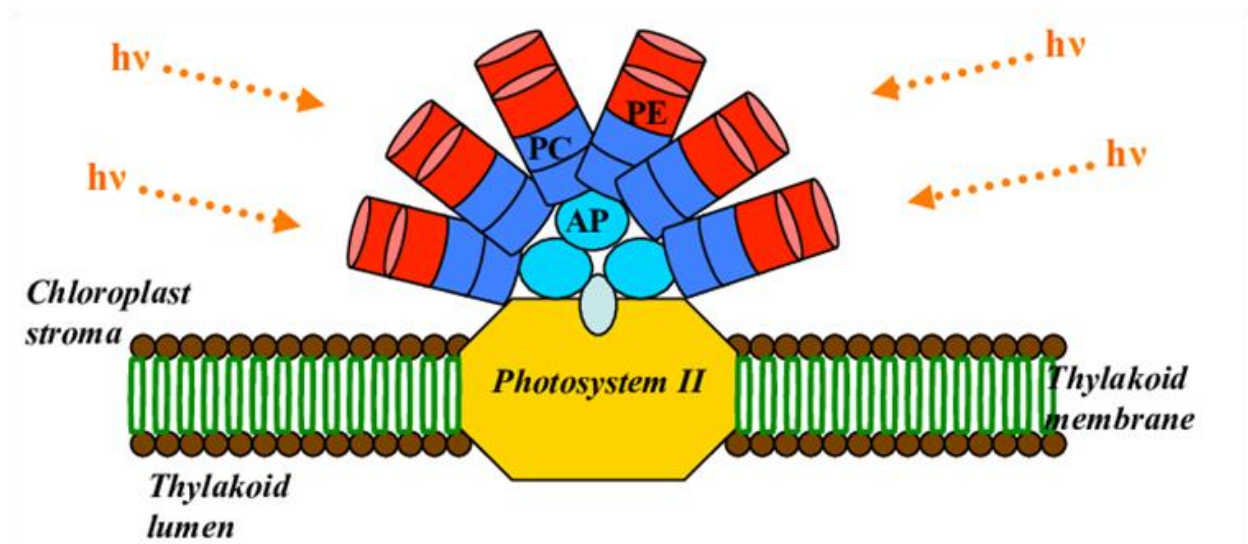


Figure 3 : Représentation schématique d'un phycobilisome

La phycobiliprotéine est l'un des composants du phycobilisome contiennent toutes un groupement protéique et plusieurs chromophores de différents types liés à l'apoprotéine par des résidus cystéine via des ponts thioethers

Il existe trois types d'apoprotéines, classées selon leurs caractéristiques spectrales, correspondant aux phycobiliprotéines nommées phycocyanine ($\lambda_{\max} = 618 \text{ nm}$) allophycocyanine ($\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$) et phycoérythrine ($\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$) Et Selon les molécules colorées, les phycobiliprotéines peuvent être divisées en trois catégories : la phycoérythrine (PE, PE est rouge), la phycocyanine (PC, PC est bleue) et l'allophycocyanine (AP, AP est vert bleuâtre).

La partie protéique ou apoprotéine est formée par deux sous-unités protéiques α et β de 15 à 20 kDa formant un hétérodimère appelé aussi « monomère ». Les groupes bilins ou phycobilines constituant le chromophore correspondent à des groupements prosthétiques linéaires isomériques de type tétrapyrrole. Ils sont classés selon leur configuration moléculaire qui diffère par la disposition des doubles liaisons et leur confère des propriétés spectroscopiques nettement distinctes visualisée par une absorbance significative dans les UV. Ainsi la phycourobiline de couleur orange absorbe dans le bleu-vert, la phycoérythrobiline de couleur rouge absorbe dans le vert, la phycobilivioline absorbe dans l'orange et la phycocyanobiline de couleur bleue absorbe dans le rouge (SGUERA, 2008).

3.3 Structure de la phycocyanine :

La phycocyanine est composée 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 (Figure 4) (BENAHMED DJILALI, 2012).

Les deux sous unités composant la phycocyanine forment des monomères $\alpha\beta$ puis s'agglutinent en trimères $\alpha_3\beta_3$ et en hexamères $\alpha_6\beta_6$ qui est l'unité fonctionnelle de la phycocyanine.

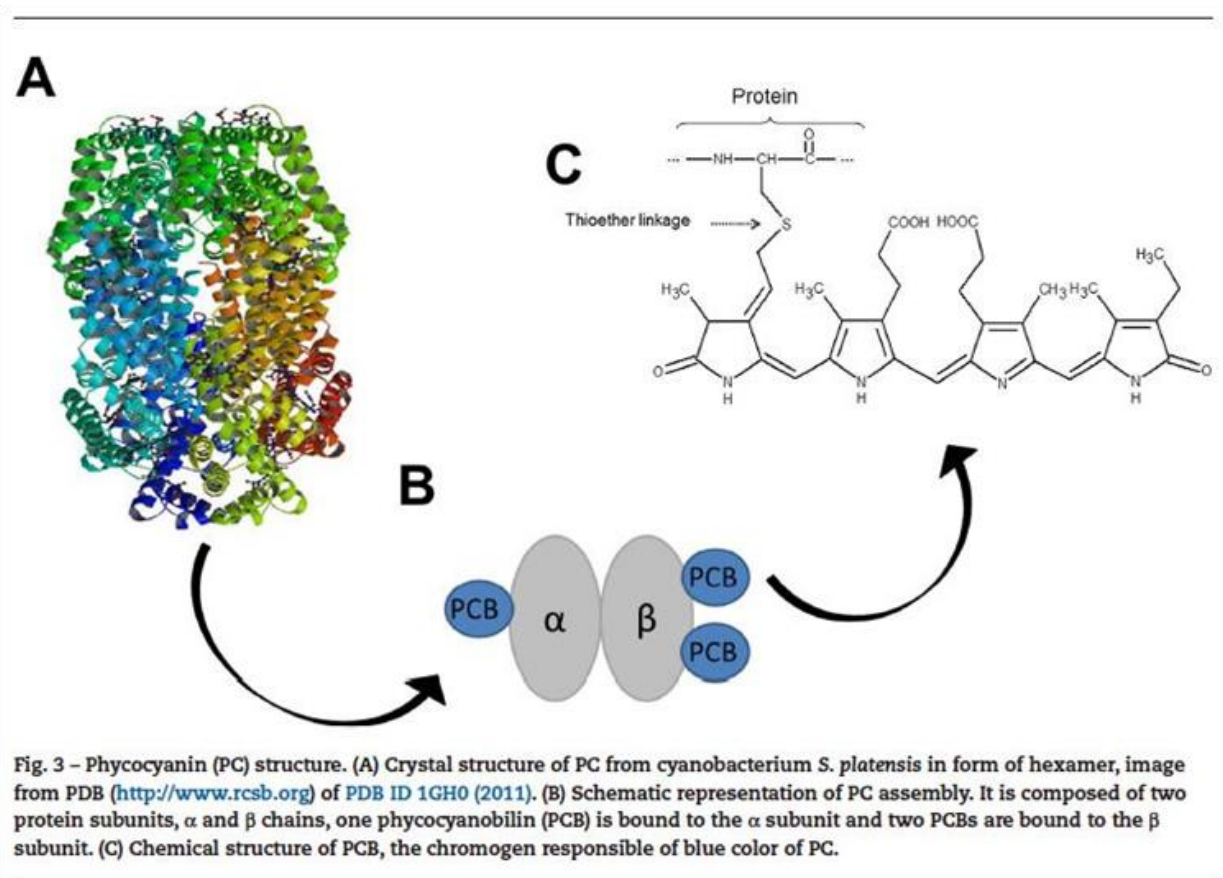


Figure 4: Structure chimique et tridimensionnelle de la phycocyanine (FERNANDEZ-ROJAS et al., 2014)

3.4 Extraction de la phycocyanine :

Les phycobiliprotéines sont solubles dans les solvants aqueux, ce qui n'est pas le cas des chlorophylles et caroténoïdes. L'extraction de la PC peut se faire par différentes méthodes :

Tableau 5 : Les différentes méthodes d'extraction de la phycocyanine (BENAHMED, 2012)

Méthodes d'extraction	Références
<ul style="list-style-type: none"> • L'utilisation d'un tampon phosphate (0,1M, pH 7). • L'utilisation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 M). • Alternance de cycle congélation (-25 à -15°C) décongélation (4 à 30°C). • Destruction mécanique. • Exposition à des pressions élevées. • extraction aqueuse biphasée • L'utilisation de l'anhydride carbonique. 	<ul style="list-style-type: none"> • DOKE (2005); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2008). • Niu <i>et al.</i> (2007). • MINKOVA <i>et al.</i> (2003); Soni <i>et al.</i> (2006). • SCHMIDT <i>et al.</i> (2005). • PATIL ET RAGHAVARAO (2007). • SONI <i>et al.</i> (2008).

3.5 Purification de la phycocyanine

La pureté de la C-PC est évaluée sur la base du rapport entre les absorbances de phycobiliprotéines à 620 nm et de tous les acides aminés aromatiques de toutes les protéines présentes dans la préparation à 280 nm.

Rito-Palmaraes *et al.* (2001) ont jugé que la C-PC dont le rapport A_{620}/A_{280} est supérieur à 0,7 est d'une bonne qualité alimentaire. Tandis que A_{620} / A_{280} de 3,9 était considéré comme réactif et A_{620} / A_{280} supérieur à 4,0 qualité analytique (ERIKSEN, 2008).

Il a été récemment rapporté que l'extraction aqueuse biphasée suivie de la chromatographie d'échange d'ions a comme résultat une C-PC extrêmement pure avec un rapport A_{620}/A_{280} de 6,69 (BENAHMED, 2012).

3.6 La stabilité de la phycocyanine :

La stabilité de la phycocyanine est le pH et la température dépendant.

La phycocyanine est stable pour un pH compris entre 5 et 7,5 à 25° C. Cependant, il a été démontré qu'aux températures plus basses (4° C), il reste stable plus longtemps périodes. De plus, le PC résiste à des températures élevées (jusqu'à 72°C pour les expositions courtes) sans être endommagé.

3.7 Conservation de la phycocyanine :

Les solutions trouvées par les industriels pour permettre une conservation à long terme de la phycocyanine à température ambiante sont les suivantes :

Soit, la phycocyanine est, après extraction et concentration, conservée sous forme de poudre sèche déshydratée ce qui diminue considérablement son efficacité car le séchage altère les molécules ainsi que leur structure tridimensionnelle et aboutit à la perte ou à la diminution des propriétés biologiques et de fluorescence de la molécule ;

Soit, la phycocyanine est conservée sous forme liquide en milieux aqueux, ce qui implique des procédés coûteux et complexes d'extraction, de clarification et de filtration stérile suivis d'un conditionnement en mono doses (par exemple des ampoules en verre}, car après ouverture le milieu se contamine en bactéries et la consommation doit donc être immédiate (POTTECHER, 2014).

3.8 Application du PC

Les pigments d'algues, tels que la phycocyanine, ont des valeurs commerciales en tant que colorants naturels dans les nutraceutiques, les industries cosmétiques et pharmaceutiques, outre leur santé avantages grâce à leur sécurité pour l'homme, soit ingérées ou appliquées par voie externe, les phycobiliprotéines, en particulier phycocyanine, sont très attractifs.

Au niveau physiologique, la phycocyanine est un antioxydant important notamment pour protéger les protéines plasmatiques contre les modifications oxydatives. La structure chimique de la phycocyanine présente une ressemblance structurale très proche avec la bilirubine (qui est un produit de la dégradation de l'hémoglobine) et des propriétés assez voisines. La phycocyanine est une molécule de grand intérêt notamment en raison de ses propriétés bénéfiques pour la santé humaine et animale. La phycocyanine est consommée notamment pour ses propriétés antioxydantes et aussi pour sa capacité à favoriser la production de cellules souches(POTTECHER, 2014).

La phycocyanine peut être utilisées dans divers aliments, tels que : les produits laitiers, bonbons, glaces, boissons, etc... En outre, la phycocyanine a des propriétés fluorescentes qui sont utilisées dans les immun-essais comme traceurs biochimiques. Et elle est utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme indicateur sensible. De plus, ces pigments peuvent avoir des applications dans l'industrie cosmétique, par exemple sous forme de crème pour la peau qui stimuler la synthèse du collagène. Plusieurs études cliniques sur des femmes ont démontré avec l'application des produit a base de phycocyanine ou la consommation de 5g de spiruline par jour pendant 2 mois permet de lutter contre l'acnés , d'éliminer les cellules mortes, de fabriquer des cellules cutanées

saines et de réguler la sécrétion de sébum , freiner l'apparition des rides ,Réduit l'apparition des boutons d'acné , points noirs et améliore la cicatrisation , protège du vieillissement lié aux UV (ALAIN, 2006).

Aussi, la phycocyanine a montré des capacités à protéger l'organisme contre divers troubles chroniques comme le cancer, le diabète, maladie coronarienne, maladies neurodégénératives ou pour améliorer les fonctions cognitives En particulier, selon des recherches publiées, la phycocyanine pourrait être utilisée comme néphroprotecteur ou comme protecteur des cellules pancréatiques humaines.

Des récentes études ont montré que la Phycocyanine inhibe la protéine nécessaire à la réplication du SARS-CoV-2, ce pigment bleu interagit avec le RdRp nsp12 – ou système protéique nsp12 – du SARS-CoV-2, qui est également la cible des recherches de plusieurs médicaments , puisque le SARS-CoV-2 a montré avoir la capacité de se répliquer dans les cellules hôtes en utilisant des ARN dépendants de polymérase d'ARN – ou RdRp. Bien que ce ne soit pas une procédure officielle de traitement, nous croyons que la phycocyanine possède des fonctions immunomodulaires qui pourraient être utiles à la régénération individuelle du système immunitaire .donc le renforcement de ce dernier en forme de complément alimentaire pour les personnes infectées pourrait être l'une des stratégies qui éviterait une infection virale des personnes saines (RAJ, 2019).

Par conséquent, les phycobiliprotéines (la phycocyanine) sont des produits naturels de grande valeur, proviennent de microalgues, qui semblent être un cas réussi de biotechnologie bleue et une nouvelle augmentation de leur utilisation est attendue dans l'avenir (CHRISTAKI *et al.*, 2017).



Matériel et méthodes

1 Matériel végétal

La spiruline utilisée dans notre étude provient de la région de Tamanrasset, elle est située à 1824 m d'altitude près de Tamanrasset dans le Sahara algérien, à la Guelta Taguemart (N 23°01.- E 5°25.473').

Elle est produite au sein de la société "SPIRULINA ALGERIE EURL" qui se trouve dans la wilaya d'Oran, sa production est faite d'une manière artisanale. Le milieu de culture utilisé est celui du spécialiste de la recherche et du développement de la *spiruline* M. Hiri. Le choix de ce milieu était due au faite que ce milieu est le plus convenable pour la souche (milieu initial de la souche) ; un milieu constitué d'eau principalement, de sels minéraux et d'autres composants chimiques ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, Chlorure de Sodium (NaCl) Phosphate d'Ammonium (NH_4) 3PO_4 ...) avec un pH compris entre 7,5 et 9 et une agitation mécanique continu à l'aide d'une pompe à air avec des coupures de 20 minutes de temps en temps. Lorsque la biomasse est obtenue, une filtration est réalisée à l'aide d'un système de filtration (un tissu de nylon 30 microns) et une pompe à vide ou bien un récipient, la récupération de spiruline se fait par raclage délicat avec 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 (Température entre 150 et 200° C) pour provoquer une rapide évaporation de l'eau en quelques secondes et obtenir une poudre fine. Cette poudre est conservée dans une boîte fermée hermétiquement à l'abri de la lumière, d'air et de l'humidité. Puis mise dans des sacs de nature opaque pour être commercialisée.

La procédure entamée pour l'obtention de la spiruline, était d'abord de la commande en ligne en mois de juin, la réception a été faite au mois d'octobre. La spiruline reçue était sous forme d'une poudre fine similaire à la farine, emballée dans du plastique (emballage primaire) et du papier à l'extérieur de couleur opaque (packaging).



Figure 5: Emballage et packaging de la spiruline reçue

2 Analyses physico-chimiques de la souche de spiruline :

2.1 Détermination du potentiel d'hydrogène pH

➤ Principe :

Cette grandeur chimique mesure le caractère acide ou basique d'une solution aqueuse. Indique la quantité d'ions H^+ contenue dans une solution liquide. Le pH détermine la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans le produit à analyser à l'aide d'un pH-mètre.

➤ Mode opératoire :

Nous avons dilué 4 g de spiruline dans 100 ml de l'eau distillée puis nous avons déterminé le pH selon les étapes suivantes ;

- Sortir la sonde de l'eau distillée.
- La rincer avec de l'eau distillée
- Plonger la sonde dans la solution dont on veut mesurer le pH. Attendre la stabilité quelques secondes.
- Lire la valeur du pH à l'aide du Ph mètre InoLab de L'ENSSMAL.

2.2 Détermination de la teneur en humidité :

La détermination du taux d'humidité de la souche de spiruline utilisée dans notre étude est faite selon le protocole d'AKROUR-AISSOU.C (protocole des travaux pratiques de 4^{ème} année aquaculture).

➤ Principe :

L'humidité a été déterminé par méthode gravimétrique et le séchage a été effectué par étuvage à $103 \pm 2^\circ$ jusqu'à stabilité du poids selon la méthode officielle d'étuvage par perte de dessiccation.

➤ Mode opératoire :

- Régler l'étuve à $103^\circ C$
- Sécher une capsule à l'étuve pendant 10 à 20 minutes et la refroidir dans un dessiccateur.
- Peser la capsule sans couvercle, soit P_0 ce poids.
- Peser 1g de l'échantillon dans la capsule avec une précision de 0,001, soit P_1 ce poids.
- Mettre la capsule avec l'échantillon fermée dans l'étuve à $103^\circ c$ pendant 40 min.
- Retirer la capsule de l'étuve, la mettre sans couvercle dans un dessiccateur, et la laisser refroidir pendant 20 min.
- Après refroidissement, peser la capsule avec l'échantillon soit P_2 ce poids.
- Répéter l'opération jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

➤ Expressions des résultats :

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$(\%) \text{ d'humidité} = (P_1 - P_2) / (P_1 - P_0) \times 100$$

Avec :

P_1 : le poids de la capsule avec l'échantillon à t_0

P_0 : le poids de la capsule vide.

P_2 : le poids de la capsule avec l'échantillon à t_n (poids constant).

2.3 Détermination de l'acidité titrable (Méthode utilisant un indicateur coloré)

La détermination de l'acidité est faite selon le protocole de Mme AISSOU-AKROUR.C

➤ Principe

Titration de l'acidité avec une solution d'hydroxide de sodium de concentration 0.1 mol/l en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

➤ Mode opératoire :

- On pèse 2.5 g de la spiruline, et on les place dans une fiole conique avec 50 ml d'eau distillée chaude.
- On mélange jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène.
- On adapte un réfrigérant à reflux à la fiole conique.
- On chauffe le contenu au bain marie pendant 30 mn pour faciliter la dissolution.
- Après refroidissement, on transvase quantitativement le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter jusqu'au trait repère avec de l'eau distillée bien mélangée puis filtrer.

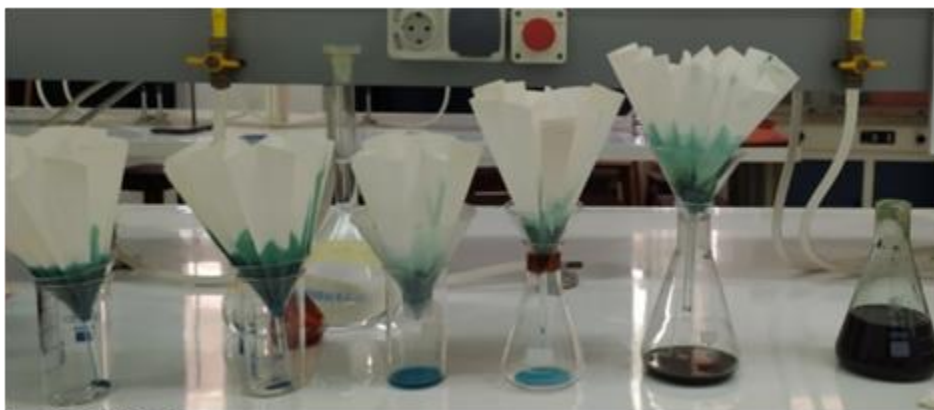


Figure 5 : La filtration du mélange obtenu

- On ajoute 0,5 ml de phénolphtaléine tout en agitant.
- On verse à l'aide de la burette, la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistant pendant 30 s.

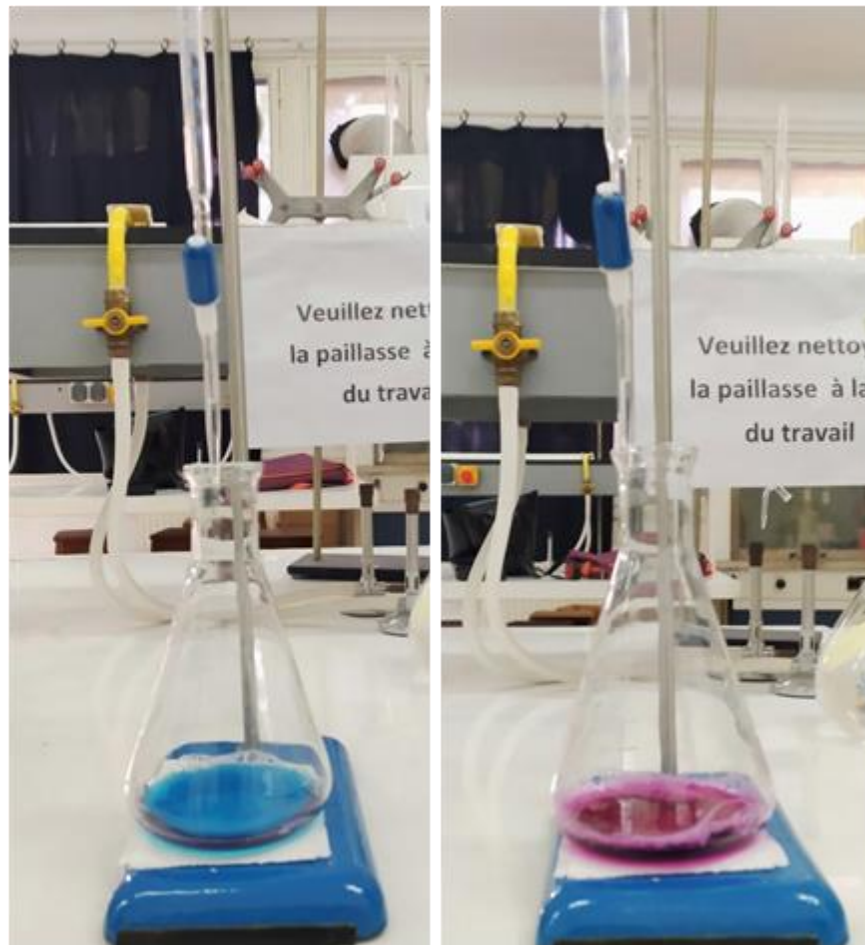


Figure 6: Changement de couleur de la solution de spiruline

➤ Expression des résultats

L'acidité titrable est exprimée en grammes d'acide citrique pour 100 g de produit selon l'équation suivante :

$$A\% = 250 \cdot V_1 \cdot 100 / (V_0 \cdot M \cdot 10) \cdot 0.07 = 175 V_1 / (V_0 \cdot M)$$

Soit :

M : Masse en gramme du produit prélevé

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

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

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

3 Méthodes d'extraction:

Il existe de nombreuses techniques de rupture de cellules utilisées pour l'extraction des composés bioactifs.

3.1 Méthodes mécaniques

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 :

- On prépare une suspension de 4g de spiruline dans 100 mL de l'eau dans l'obscurité.
- La solution obtenue, subit une décantation puis une centrifugation (9000 tours pendant 15 mn) à 4°C.
- On prélève alors le surnageant puis on effectue une dilution avec de l'eau distillé jusqu'à 100 mL.



Figure 7: L'extrait de phycocyanine obtenu par l'extraction à l'eau

➤ Expressions des résultats :

Nous avons mesuré la densité optique par spectrophotomètre BHIMADZU de l'ENSSMAL de la solution récupérée (le surnagent dilué) à 615 nm, 652 nm, 620 nm et 280 nm.

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

$$\% \text{ en phycocyanine} : 1,873 \times (\text{Abs}_{620} - 0.474 \times \text{Abs}_{652}) * f/C$$

Avec :

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

f : le facteur de dilution en volume (mL).

3.1.2 Extraction par congélation /décongélation :

Cette méthode est faite selon le protocole de MINKOVA *et al.*, 2003.

➤ Principe :

Cette méthode d'extraction est basée sur le processus de destruction d'une cellule en provoquant l'éclatement de la membrane plasmique, c'est la méthode la moins rapide mais qui a la meilleure efficacité d'extraction du pigment bleu.

La phase de congélation /décongélation permet la fragilisation des parois et membranes cellulaires, suite à un refroidissement brusque et à la concentration du soluté intra et extracellulaire, la formation de cristaux intra et extracellulaire entraîne des cassures dans la cellule, l'extraction a été réalisée par des étapes de congélation suivi d'une décongélation répétées des cellules dans du tampon phosphate (CHEBIRA, 2015).

L'extraction par congélation/décongélation a l'avantage d'être simple, reproductible et n'entraîne pas la perte des fonctions biologiques de la protéine.

➤ Mode opératoire :

- On met 100 mg de spiruline sec dans 200 ml de tampon.
- La solution subit des cycles de congélation /décongélation (-20/20°C) jusqu'à la destruction des cellules (l'éclatement de la membrane) (deux cycles dans notre cas jusqu'à l'obtention de la couleur bleu-vert de l'extrait).



Figure 8: La solution de spiruline après le cycle de congélation/décongélation

- La solution obtenue subit une centrifugation
- On ajoute 20% de sulfate d'ammonium saturé $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (une solution est saturée quand elle ne peut plus dissoudre de soluté) au surnageant récupéré.
- On le laisse reposer pendant 2 heures
- On centrifuge la solution obtenue pour la deuxième fois.
- On récupère le culot après la troisième centrifugation.

Expression des résultats :

Les lectures au spectrophotomètre UV-Visible sont effectuées à des longueurs d'ondes de 615 nm, 620 nm, 652 nm et 280 nm et la teneur en phycocyanine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{PC (mg/ml)} = (\text{Ab}_{615} - 0.474 \times \text{Ab}_{652}) / 5.34$$

Et la pureté selon la formule suivante :

$$\text{Pureté} = \text{Ab}_{620} / \text{Ab}_{280}$$

Ab à 620 nm indique la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indique la concentration totale de protéines

3.2 Méthodes chimiques :

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 d'extraction 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. Par conséquent, en fin d'extraction on obtient une nouvelle solution.

➤ Mode opératoire :

- On verse 4 g de spiruline dans 120 ml de tampon phosphate, au début on l'incube à l'obscurité à
- 4 °C pendant 12h (pour permettre la lyse des cellules.
- On centrifuge pour la première fois et on récupère le surnageant bleu.
- On ajoute 120 ml du tampon phosphate au précipité et on incube 12h à l'obscurité.
- On centrifuge une deuxième fois.
- On mélange les deux surnageant.



Figure 9 : L'extrait de phycoerythrine obtenu par l'extraction par solvant

➤ **Expressions des résultats :**

Le taux (%) en phycoerythrine est calculé selon la formule de BENNETT & BOGORAD :

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

La pureté de l'extrait de phycoerythrine a été surveillée par spectrophotométrie par le rapport

Ab_{620} / Ab_{280}

Avec :

Ab à 620 nm indique la concentration de la phycoerythrine.

Ab à 280 nm indique la concentration totale des protéines.

3.3 Méthode innovatrice d'extraction :

Diverses technologies innovatrices sont actuellement proposées telles que l'extraction par ultrasons, l'extraction assistée par champs électrique pulsé et l'extraction à haute pression. Dans cette étude on s'intéresse à l'extraction par ultrasons.

3.3.1 Extraction par sonification :

➤ **Principe :**

Les ultrasons (UAE : ultrasound assisted extraction) sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence se propageant dans les solides, les liquides, les gaz. L'extraction assistée par ultrasons est basée sur le principe de fonctionnement de la cavitation, ce phénomène dissipe une énergie considérable au niveau du point d'implosion. L'efficacité de ce traitement provient de la cavitation

Matériel et méthodes

dans laquelle les points chauds locaux et les pressions élevées peuvent faciliter la rupture de la paroi cellulaire et libérer les composés d'intérêt. Pour la fréquence de travail varie de 28 à 50 kHz pendant 20 à 40 mn selon les protocoles. (AOUIR.A, 2017).

L'efficacité de ce traitement est liée à des paramètres tels que le pH, la température, le temps d'exposition aux ultrasons et la force ionique du milieu de suspension. (CHEBIRA.H, 2015)

➤ Mode opératoire :

- On pèse 10 mg de spiruline dans 100 mL de tampon.
- On met la solution sous l'action de l'ultrason pendant 5 min.
- On effectue une centrifugation (9000 tour/15min) à 4°C.
- On prélève le surnageant.
- On rajoute 100 mL de tampon phosphate au culot, on la remet sous l'action de l'ultrason pendant 2 à 3 min.
- On effectue une 2^{ème} centrifugation.

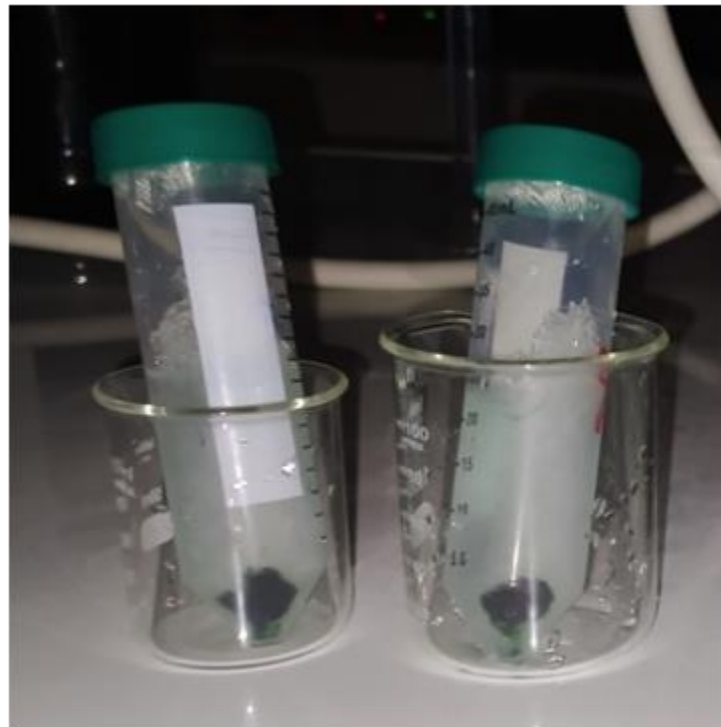


Figure 10 : L'extrait obtenu après 2^{ème} centrifugation

- On prélève le surnageant puis on le mélange au premier.

➤ Expression des résultats :

Une mesure des absorbances est effectuée à 615, 652, 620 et 280 nm.

Le taux de la phycocyanine récupérée est calculé par la formule de BENNET et BOGORAD (1973) :

$$\text{PC (mg/mL)} = (\text{DO}_{615} - 0.474 \times \text{DO}_{652}) / 5.34$$

La pureté de phycocyanine est calculée par la formule : $\text{DO}_{620} / \text{DO}_{280}$

DO à 620 nm indique la concentration de phycocyanine.

DO à 280 nm indique la concentration totale des protéines.

3.4 Le rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction (Yield) en mg/g de matière sèche était calculé à l'aide de l'équation d'après (Silveira *et al.* 2007):

$$\text{Yield (mg/g)} = (\text{CPC}) \text{ V} / \text{DB}$$

Avec :

Yield : est le rendement

CPC : est la concentration de phycocyanine (mg/ mL).

V : est le volume du solvant (mL).

DB : est la biomasse séchée (g).

4 Conservation de la phycocyanine:

La phycocyanine collectée grâce aux différentes méthodes d'extraction a subi une ultrafiltration par utilisation de membranes semi-perméables dont le diamètre des pores est compris entre 0,001 et 0,1 micromètre puis, nous avons procédé à une lyophilisation au sein du laboratoire de recherche annexe de l'ENSSMAL qui se trouve à Sidi Fredj.

Nous avons utilisé un Lyophilisateur de CHRIST BETA 1-8 à une température de -60° et une pression de 0.08 mbar ce que nous a aidé à éliminer l'eau de nos extrais et éviter l'apparition de phénomènes oxydatifs qui dégradent la protéine bleue. Ainsi, la phycocyanine peut être conservée pendant plusieurs années alors que sous forme liquide, les réactions d'oxydation la dégraderaient en quelques mois.



Figure 11 : La phycocyanine lyophilisée

5 Caractérisation de la phycocyanine obtenue :

5.1 Activité antioxydante :

➤ Principe :

Un antioxydant est par définition une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrice.

Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions soit en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou en désactivant directement les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent être à l'origine des radicaux libres. Ces propriétés, on les trouve plus dans la famille des thiols et des phénols.

➤ Mode opératoire :

L'activité antioxydante a été déterminée par le test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

Détermination du pouvoir réducteur de la phycocyanine (test FRAP) selon le protocole de BOUGANDOURA et BENDIMERAD, 2013 :

- Mélanger 1 millilitre de l'extrait obtenus des différentes méthodes avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%.

- Incuber l'ensemble dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min.
- Ajouter 2.5mL d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction et centrifuger les tubes pendant 10min à 3000 rpm.
- Combiner une aliquote (2,5mL) de surnageant avec 2,5mL d'eau distillée et 0,5mL d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%.
- Faire la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

➤ Expressions des résultats :

La lecture se fait par spectrophotométrie à 700 nm ; Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

5.2 Polyphénols totaux :

La méthode utilisée pour le dosage des polyphénols totaux est la calorimétrie.

➤ Principe :

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant naturel.

Ce dosage s'effectue au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu ; ce dernier est constitué par un mélange d'acide phototungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue est mesurée à 750 nm. La méthode est standardisée par rapport à l'acide gallique.

➤ Mode opératoire :

Le dosage de polyphénols a été effectué selon la méthode décrite par *BENARIBA et al.*, 2013 :

- Mélanger 0,1mL de chaque extrait avec 2mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% avec une agitation des tubes ;

Matériel et méthodes

- Incuber le mélange pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 100 µL du réactif de Folin Ciocalteu à 0,2 N ;
- Incuber pour la 2^{ème} fois pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière (le pigment phycocyanine est sensible à la lumière).
- Mesurer l'absorbance (DO) à 750 nm contre un blanc.

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 ; 600 ; 700 ; 800 ; 900 ; 1000 µg/mL).

Tableau 6: Dosage de polyphénols dans les extraits de la phycocyanine.

Concentration de l'acide gallique (µg/mL)	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000		
Volume de l'acide gallique (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		
Volumes des extraits (mL)												0.1	
Le blanc : eau-distillée (mL)													0.1
Na ₂ CO ₃ (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
1 ^{er} Incubation pendant 5 min à température ambiante													
Folin Ciocalteu(mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		
2 ^{ème} Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité													
Mesure de DO à 700 nm													

➤ Expressions des résultats :

Les résultats obtenus exprimés en μg Eq acide gallique/ mg d'extrait sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Polyphénols } (\mu\text{g Eq acide gallique/ mg d'extrait}) = a \cdot f / C$$

a : concentration des polyphénols ($\mu\text{g} / \text{mL}$) déterminée à partir de courbe étalon.

f : facteur de dilution.

C : concentration de chaque extrait.



Résultats et discussion

1 Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de spiruline

1.1 Potentiel d'hydrogène pH

Les valeurs de pH obtenues par les 3 essais sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 7: Valeurs de pH de la poudre de la spiruline

Les essais	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai
Ph	7,62	7,88	7,31

Le pH moyen de la spiruline étudiée est de 7,60. Le pH est légèrement basique puisque la culture de la spiruline est réalisée dans un milieu alcalin. Nos résultats sont conformes à ceux obtenus par DOUMANDJI *et al.*, 2012, ce pH est égal à celui recommandé par les normes françaises qui varie entre 7 et 9. Le pH alcalin est dû aux conditions de séchage appropriées après la récolte de la spiruline. Cependant ce pH représente deux avantages : meilleure absorbance de gaz carbonique de l'air, et une protection contre les contaminations (des micro-organismes indésirables ...) (JOURDAN, 2011).

1.2 Taux d'humidité :

Les résultats du taux d'humidité de la poudre de spiruline obtenus par les 3 essais figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8 : Taux d'humidité de la poudre de spiruline

Les essais	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai
Taux d'humidité (%)	2,844	3,429	3,615

Le taux moyen d'humidité de la poudre de la spiruline est de 3,296 %.

On remarque que cette teneur est inférieure à 10% ,condition recommandée pour le stockage à long terme des poudres de cette microalgue (BECKER, 1994) et cela empêche le développement des moisissures et de plusieurs types de bactéries (VONSHAK, 1997).

1.3 Acidité titrable :

La spiruline présente une acidité titrable un peu élevée (6.25%). Ceci est peut-être lié à sa composition riche en acides organiques (ELYAH, 2003).

2 Extraction de la phycocyanine:

Différentes méthodes conventionnelles d'extraction primaire telles que la congélation/décongélation (méthode mécanique), la méthode chimique (extraction par solvant), et la méthode

innovatrice (extraction par sonification) ont été expérimentées pour trouver le meilleur protocole d'extraction en termes de concentration de la phycocyanine, rendement d'extraction et degré de pureté.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction de la phycocyanine. Les plus importants sont le type de solvant, le rapport biomasse-solvant et le temps d'extraction (ABALDE *et al.* 1998) et ces facteurs se diffèrent selon la méthode d'extraction utilisée.

2.1 Comparaison entre les résultats obtenus par l'utilisation des 4 méthodes :

Les résultats obtenus par les quatre méthodes : deux méthodes mécaniques : extraction à l'eau et extraction par congélation/ décongélation ; une méthode chimique : extraction par solvant (tampon phosphate) et une méthode innovatrice : extraction par sonification sont résumés dans le tableau 9 et figure 12.

Tableau 9 : Valeurs des concentrations et des degrés de pureté de la phycocyanine en fonction du mode d'extraction.

Méthodes d'extraction	Concentration (mg/mL)	Degré de pureté
Eau	0,35	0,8
Congélation/décongélation	0,172	0,35
Solvant	0,406	0,74
Sonification	0,433	0,4

La phycocyanine extraite par les différentes méthodes a montré une variation de la concentration de la phycocyanine et de son degré de pureté.

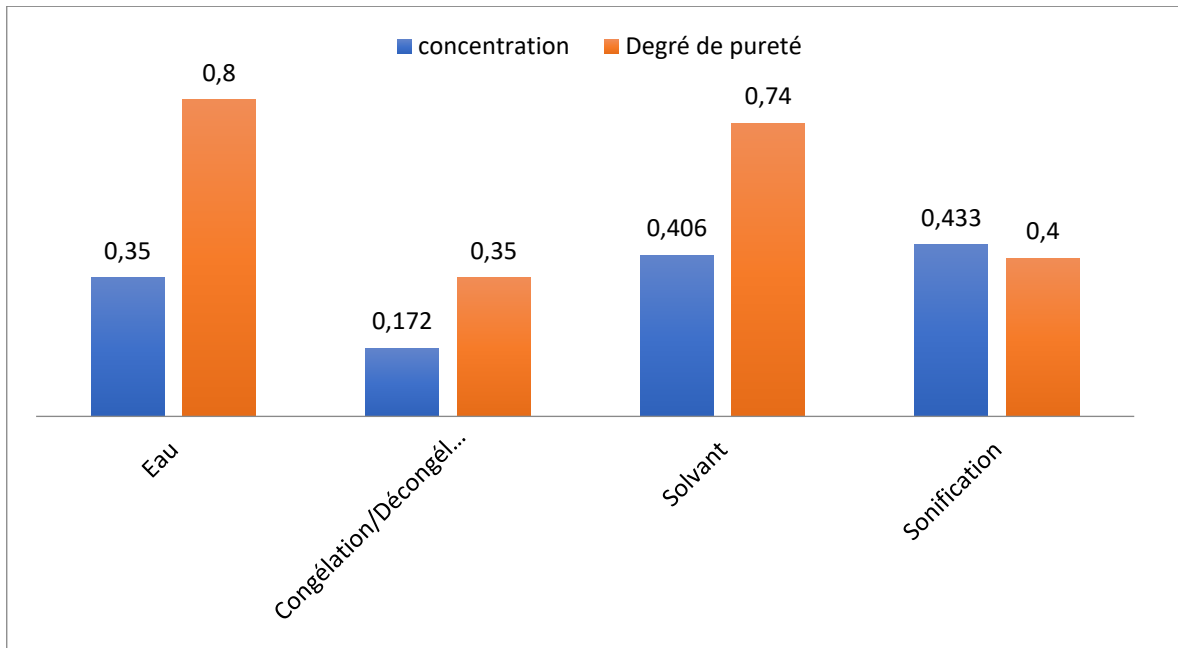


Figure 12 : Concentrations de la phycocyanine (mg/mL) et degrés de pureté selon le mode d'extraction.

Selon les résultats obtenus on remarque que les méthodes d'extraction avaient un effet significatif sur la concentration de la phycocyanine. En effet, on remarque que la méthode d'extraction par ultrason montre une quantité maximale de récupération de phycocyanine (0,433mg/mL) avec un degré de pureté relativement faible de 0,4. Par contre, la plus faible concentration en phycocyanine est obtenue par congélation/décongélation (0,172mg/mL) avec un degré de pureté aussi faible de 0,35. En revanche, l'extraction par l'eau et l'extraction par le solvant ont donné des concentrations de 0,35 mg/mL et 0,406mg/mL respectivement, et des degrés de pureté de 0,8 et 0,74.

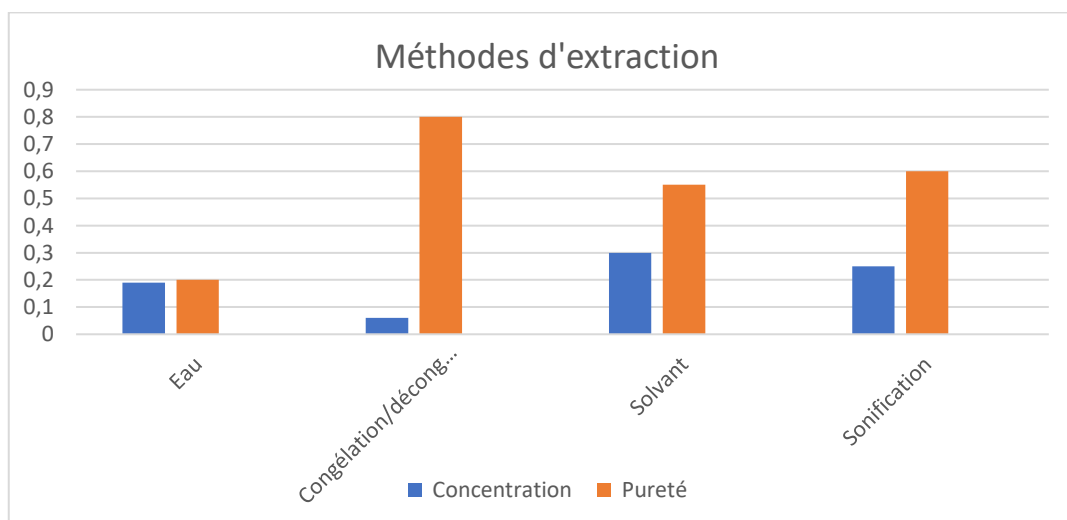


Figure 13 : Concentrations et degrés de pureté de la spiruline algérienne en fonction du mode d'extraction selon LAFRI et al., 2018.

En comparant nos résultats avec ceux de LAFRI *et al.*, 2018, on remarque que les résultats obtenus sont approximatifs, avec une légère élévation dans nos résultats ; sachant que les méthodes d'extraction et la spiruline utilisées dans les deux études sont les mêmes. D'après nos résultats, les valeurs obtenues par sonification sont plus élevées (0,433mg/mL) avec un degré de pureté faible de 0,35. Par comparaison avec les résultats de LAFRI *et al.*, 2018; on a constaté que la concentration élevée a été obtenue par l'extraction par solvant (0,3mg/mL) dans leur étude avec un degré de pureté moyen de 0,55. L'extraction par l'eau dans notre étude, nous a permis de récupérer une phycocyanine très pure de 0,8 avec de faible concentration (0,35mg/mL), par contre LAFRI *et al.*, 2018 ont obtenu un degré de pureté de 0,2 avec une concentration légèrement faible de 0,19 mg/mL .

Une quantité importante de phycocyanine a été récupérée dans les deux recherches (0.406 et 0.3mg/mL respectivement), en utilisant la méthode d'extraction par solvant avec un rapport de pureté élevé de 0,55 d'après LAFRI *et al.*, 2018 et de 0,74 selon nos résultats obtenus.

L'extraction par solvant est la meilleure pour l'extraction de phycocyanine en termes de concentrations et de degré de pureté à partir de la souche algérienne cultivée dans la région de Tamanrasset.

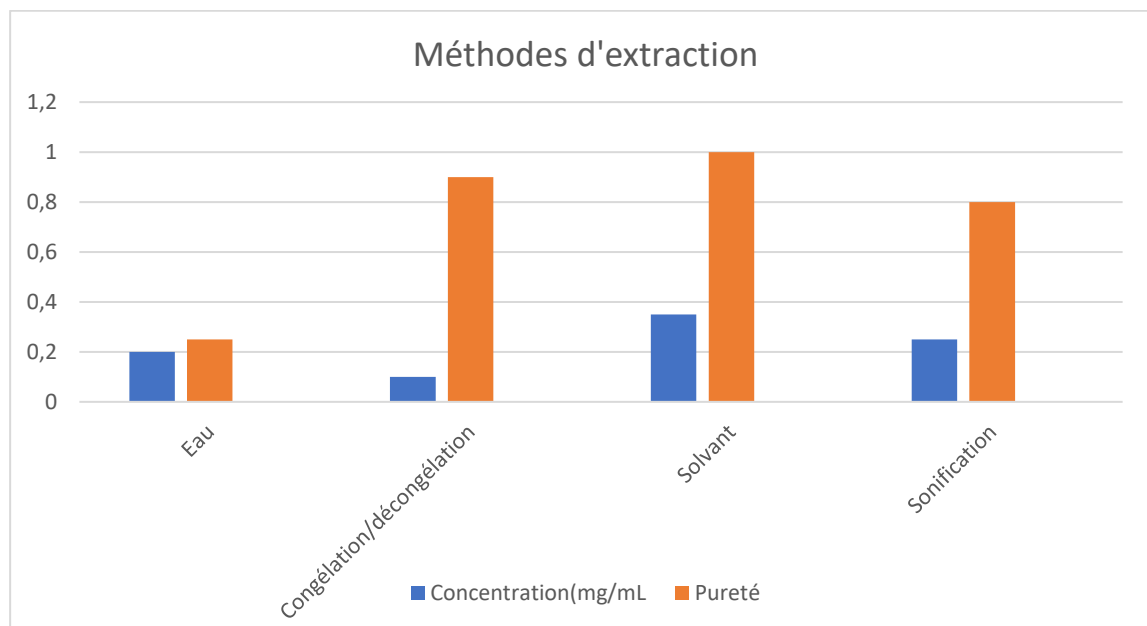


Figure 14 : Concentrations et rapports de pureté de la spiruline tunisienne en fonction du mode d'extraction selon LAFRI *et al.*, 2018

De même, on a comparé nos résultats aux résultats obtenus à partir d'une souche tunisienne (de la région de Djerba) étudiée par LAFRI *et al.* 2018, où on a remarqué que les concentrations de la

phycocyanine obtenues par les deux études sont différentes. Nos résultats de concentration sont les plus élevés sachant que les extractions sont faites par les mêmes méthodes. Dans nos résultats l'extraction par sonification a donné la concentration la plus élevée (0,433mg/mL) et selon les résultats de LAFRI *et al.*, 2018, cette méthode a donné la plus faible concentration (0,25mg/mL). Aussi chez la souche tunisienne la concentration de la phycocyanine extraite par l'eau est de (0,20mg/mL) avec un faible degré de pureté (0,25), contrairement à nos résultats dont on a obtenu la pureté la plus élevée (0,8).

Selon la littérature, la biomasse fraîche est la meilleure pour l'extraction de la phycocyanine pour éviter une perte de 50% de pigment par diverses méthodes de séchage. Ceci explique les résultats de notre travail (l'évaluation des concentrations en phycocyanine à partir de la spiruline sèche) sont faibles par rapport aux résultats de SILVEIRA *et al.*, 2007 où l'extraction par solvant a donné la plus grande quantité de phycocyanine, environ 4,20 mg/ mL, suivi de l'extraction par l'eau avec une concentration de phycocyanine de 3,73 mg/ mL.

Nous savons que la phycocyanine est une protéine pigmentaire présente chez les cyanobactéries (autre que la spiruline), les glaucophytes et les algues rouges. Parmi ces espèces on peut citer la *calothrix sp* et les *synechoccus sp*.

Calothrix sp est une cyanobactérie filamenteuse, de la famille des calotrichaceae biotechnologiquement importante pour la production des pigments, enzymes et toxines actives. La phycocyanine est le principal pigment produit par la *Calothrix sp* et la *Synechoccus sp*, l'un des cyanobactéries unicellulaires phytoplanctoniques de la famille de Synechococcaceae, des phototrophes oxygénées.

Selon les résultats rapportés par ABALDE *et al.*, 1998, une concentration de phycocyanine de 27 µg/mL obtenue à partir la *Synochococcus sp* avec un degré de pureté très élevé 4,85. Cette espèce est de haute pureté utilisée dans la recherche pharmaceutique. Et selon SANTIAGO-SANTOS *et al.*, 2004 qui ont rapporté qu'à partir de *calothrix sp* on obtient une phycocyanine de concentration de 30 µg/mL et de degré de pureté de 3,5. L'extraction dans les deux études est faite par solvant ; en comparant ces deux résultats avec nos résultats on remarque que la concentration de la phycocyanine dans la spiruline étudiée est beaucoup plus élevée mais avec un degré de pureté faible.

Une concentration de 1,28 mg/mL en phycocyanine est obtenue par la méthode de congélation/décongélation à partir de de *Salpa fusiformis* selon les résultats de MINKOVA *et al.*, 2003, cette concentration est plus élevée par rapport à la concentration de la phycocyanine obtenue

(0,172mg//mL) à partir la spiruline étudiée par la même méthode d'extraction ainsi que par les autres méthodes.

Espèce	Concentration(mg/mL)
<i>Calothrix sp</i>	0.07
<i>Synochococcus sp</i>	0.3
<i>Salpa fusiformis</i>	1.28
Spiruline	0.433

Tableau 10 : Valeurs des concentrations de phycocyanine chez les différentes espèces.

2.2 Comparaison selon le degré de pureté :

Pour notre expérimentation la pureté de l'extrait brut de phycocyanine obtenu par les différentes méthodes varie entre 0,35 et 0,8.

La précipitation de la phycocyanine avec sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (extraction par congélation/décongélation) est considérée comme une première étape de purification, on a obtenu un degré de pureté de 0,4 où on a remarqué qu'il existe une différence importante vis-à-vis des résultats de SGUERA en 2008 ainsi qu'aux résultats obtenus par RAZAFINDRAPAHY en 2013. L'extraction par l'eau, nous a révélé un degré de pureté de phycocyanine de 0.8 qui est très faible par rapport aux résultats de SGUERA, 2018, ce faible degré de pureté de notre étude est probablement dû aux techniques de purification utilisées (précipitation, centrifugation ...).

Les degrés de pureté de la phycocyanine de ce travail sont moyens au voisinage de 0,7, selon la littérature notre phycocyanine extraite est de qualité alimentaire. En outre, la phycocyanine extraite par l'eau est considérée comme une qualité analytique, donc elle peut être utilisée dans la cosmétologie.

Pour améliorer ce degré de pureté, d'autres techniques de purification basées sur la chromatographie, l'ultrafiltration et le procédé d'extraction en deux phases peuvent être utilisées pour obtenir une molécule de phycocyanine de grande pureté conservant toutes ses propriétés fluorescentes et l'intégrité structurale démontrée par spectrophotométrie (SGUERA, 2008).

2.3 Comparaison selon le rendement :

Les résultats présentés dans le graphe ci-dessous montrent les rendements d'extraction par les différentes méthodes :

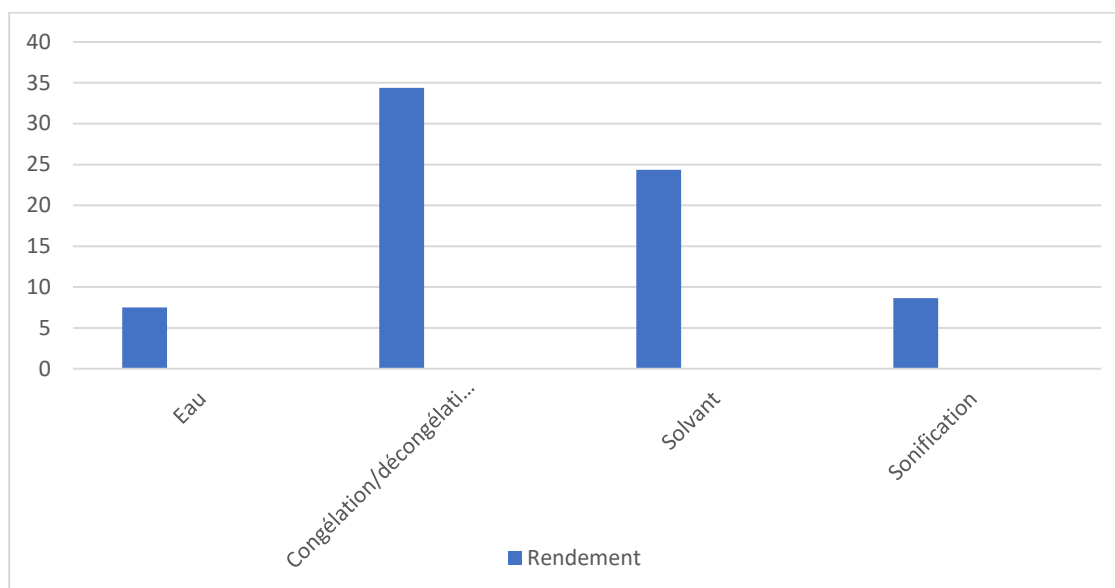


Figure 15: Rendement d'extraction de phycocyanine par les différentes méthodes

Selon ces résultats on distingue une différence de rendement entre les quatre méthodes.

Le rendement en phycocyanine peut varier selon la méthode d'extraction, de 7,5 mg/g de matière sèche pour l'extrait obtenu par la méthode d'extraction par l'eau à 34,4 mg/g pour l'extrait obtenu par la méthode de congélation/décongélation à partir de la spiruline en présence de tampon phosphate.

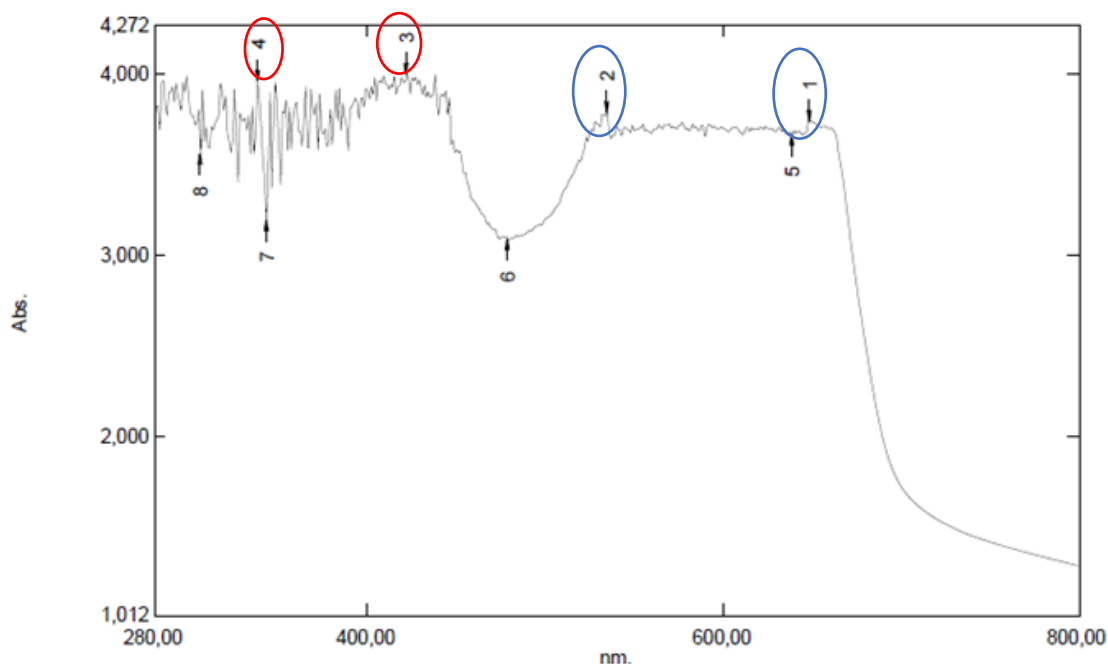
Une comparaison de rendement a été effectuée entre nos résultats et des résultats récents.

Tout d'abord, selon les résultats obtenus par MORAES *et al.*, 2011, le rendement par la méthode de sonification (0,57 mg/g) est très faible par rapport à nos résultats (8,66 mg/g). Mais selon NGUYEN *et al.*, 2018, les résultats de rendement en utilisant la méthode de congélation/décongélation sont très élevés (253,78 mg/g) par rapport à nos résultats par la même méthode (34,4 mg/g).

L'extraction par l'eau et l'extraction par solvant ont donné des faibles rendements de 7,5 mg/g et 24,36mg/g respectivement. Ces derniers sont inférieurs par rapport aux résultats obtenus par ABALDE *et al.*, 1998(respectivement 13.42µg/g et 9.47µg/g).

2.4 Spectre d'absorption de l'extrait brut obtenu par les différentes méthodes :

Dans notre travail, on a obtenu des différents spectres selon les méthodes d'extraction utilisées.



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	649,00	3,744
2	↑	535,00	3,788
3	↑	422,00	4,000
4	↑	338,00	3,962
5	↓	639,00	3,662
6	↓	479,00	3,083
7	↓	343,00	3,190
8	↓	306,00	3,555

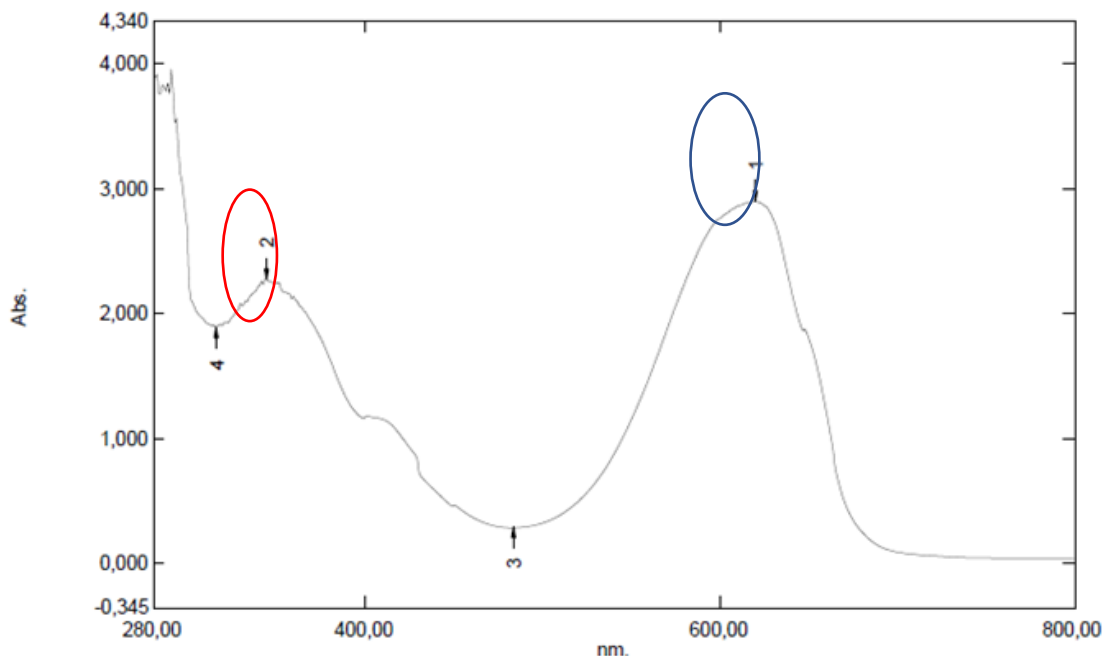
Figure 13 : Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par l'eau.

Selon le graphe on remarque la présence de quatre pics : le 1^{er} est situé à 649 nm et le 2^{ème} est situé à 535 nm qui appartiennent à la zone d'absorption des chromophores de la phycocyanine. Les deux autres pics 3 et 4 sont situés à 422 nm et 338 nm.

L'apparition de deux pics dans la zone d'absorption de la phycocyanine signifie que l'absorbance est faite par de deux types de chromophore. Ceci est expliqué par une étude de PECCI et FUJIMORI en 1969 où ils ont montré qu'il existait deux sortes de chromophores, l'un absorbant vers 595 nm, l'autre vers 630 nm justifié par le phénomène de dichroïsme circulaire de la solution

de phycocyanine sur deux rayons lumineux polarisés respectivement circulaire gauche et circulaire droite : ils ne subissent pas la même absorption.

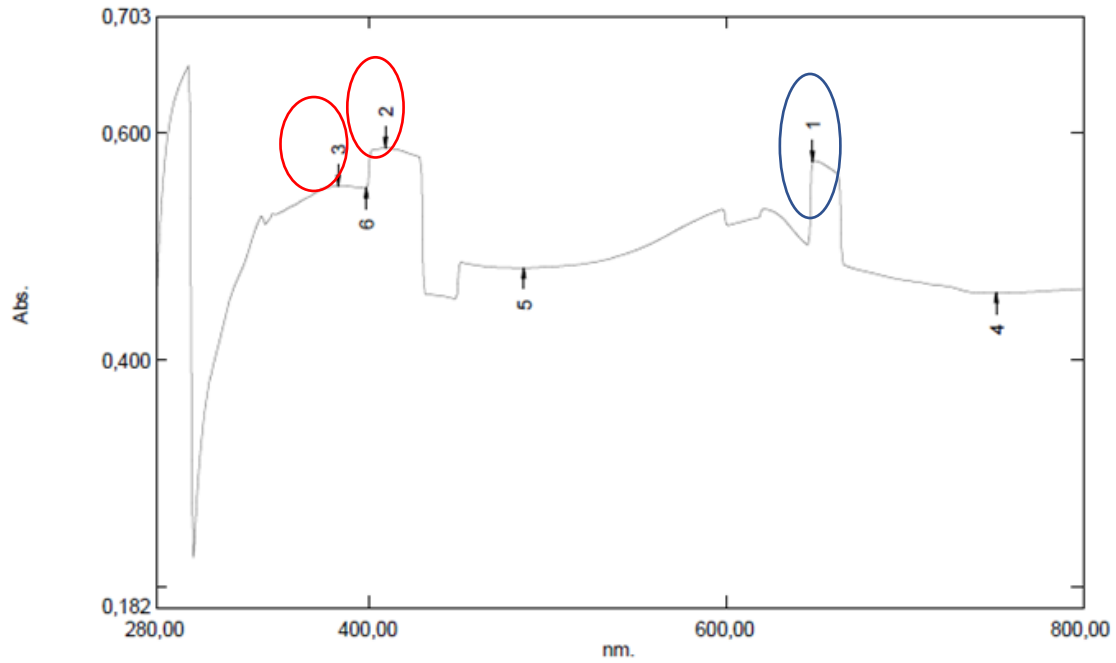
L'apparition de deux autres pics est due à la présence d'autres molécules dans l'extrait de la phycocyanine.



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↕	620,00	2,897
2	↕	344,00	2,278
3	↕	483,00	0,288
4	↕	315,00	1,888

Figure 15 : Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par solvant

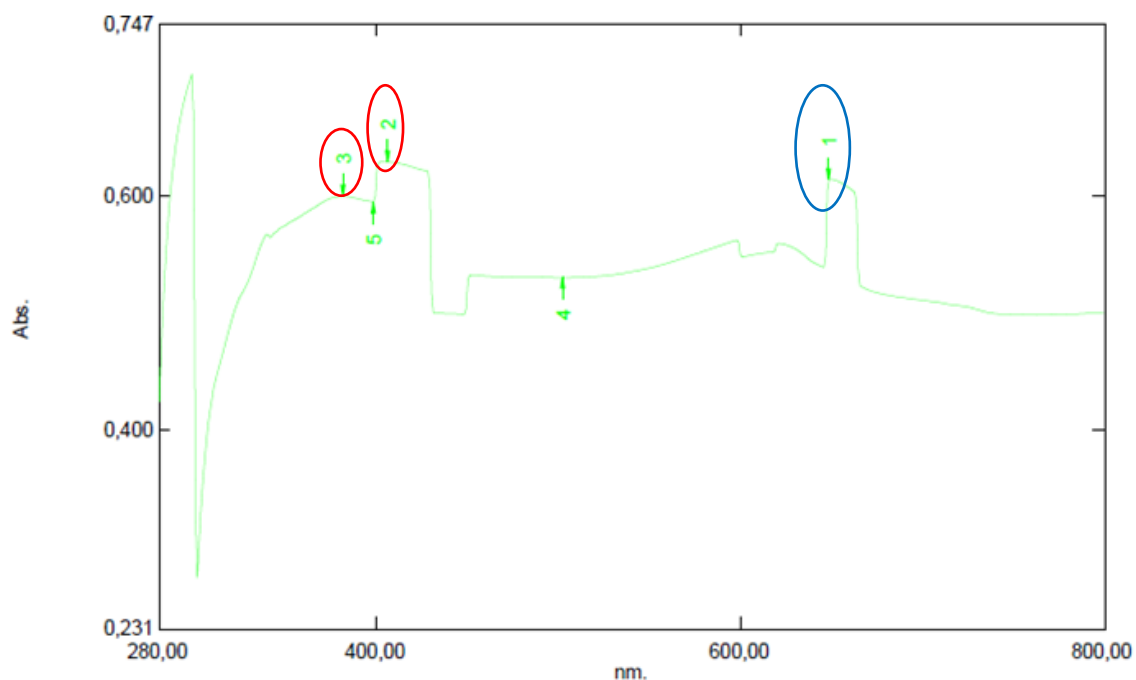
On remarque dans ce graphe la présence de deux pics d'absorption à différentes longueurs d'onde le 1^{er} est situé à 620nm (longueur d'onde d'absorption maximale de la phycocyanine) et l'autre est à 344 nm qui signifie la présence d'autres molécules qui ont absorbé à cette longueur d'onde. Ces molécules peuvent être des cellules dégradées (pigments ou bien des protéines) présentes dans l'extrait de la phycocyanine obtenus par cette méthode d'extraction par solvant.



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	649,00	0,618
2	↑	410,00	0,638
3	↑	382,00	0,605
4	↓	487,00	0,531
5	↓	398,00	0,602

Figure 14 : Spectre d'absorption de la phycocyanine extraite par sonification.

On remarque dans ce graphe l'apparition de trois pics : le 1^{er} pic est situé à 649 nm correspond à l'absorption optimale de la phycocyanine et les deux autres pics 2^{ème} et 3^{ème} correspondent à des longueurs d'onde où notre molécule n'absorbe pas. Ces absorbances pourraient être dues à des contaminations dans l'extrait (la présence d'autres molécules que la phycocyanine) et cette contamination peut être dû soit à la méthode utilisée pour l'extraction, soit par les produits utilisés dans l'extraction et ces derniers influencent sur la qualité de la phycocyanine ainsi sur son degré de pureté.



No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	●	649,00	0,614
2	●	406,00	0,629
3	●	381,00	0,599
4	↓	502,00	0,530
5	↓	398,00	0,595

Figure 15 : Spectre d'absorption de phycocyanine extraite par congélation/décongélation

Selon le graphe on remarque trois pics, le 1^{er} est situé à une longueur d'onde de 649 nm qui correspond à l'absorbance maximale de la phycocyanine, les deux autres pics sont situés à 406 nm et à 381 nm correspondent à l'absorbance d'autres molécules présentes dans nos échantillons. Ceci pourrait expliquer le faible degré de pureté (0,35) de la phycocyanine obtenue par la méthode congélation/décongélation.

Selon la littérature, il y a une différence dans les propriétés de spectre de la phycocyanine selon la biomasse à partir de laquelle est extraite, selon SARADA *et al.*, 1999, la phycocyanine extraite d'échantillons séchés a montré des variations de spectres par rapport à la phycocyanine provenant de la biomasse fraîche. La phycocyanine extraite de la biomasse fraîche a montré un pic tandis que celle extraite de d'échantillon séché a montré des pics supplémentaires.

3 Caractérisation de la phycocyanine :

3.1 L'activité antioxydante par test FRAP :

Les absorbances des extraits bruts de phycocyanine et de témoin sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Les absorbances des extraits et de témoin après test de FRAP

Extrait obtenu par	Eau	Congélation	Solvant	Sonification	Acide ascorbique (témoin)
DO à 700 nm	0,104	0,05	0,073	0,052	0,681



1- Extraction par l'eau	4- Extraction par congélation décongélation
2- Extraction par solvant	5- Acide ascorbique (témoin)
3- Extraction par sonification	

Figure 16 : Couleurs des extraits de phycocyanine après le test FRAP

Quelques études antérieures ont montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme une évaluation de l'activité antioxydante des extraits et peut être considéré comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (JEONG *et al.*, 2004) (KAMRAN *et al.*, 2007).

Après avoir mesuré l'absorbance de chaque extrait à la longueur d'onde de 700 nm, on a remarqué une différence dans leurs absorbances, ce qui signifie que le pouvoir réducteur de la phycocyanine varie d'une méthode à l'autre.

D'après ces résultats, les quatre extraits présentent un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide ascorbique qui présente une DO de 0,681. La méthode par laquelle on a obtenu un pouvoir réducteur le plus élevé est l'extraction par l'eau (DO= 0.104). Avec un extrait de couleur bleu foncé, la plus intense par rapport aux couleurs des autres extraits. Cependant l'extraction par congélation/décongélation et par sonification, nous ont donné des faibles valeurs du pouvoir réducteur de la phycocyanine (DO= 0.05) et (DO= 0.052). Ces deux extraits présentent une couleur claire.

En comparant les valeurs du pouvoir réducteur obtenu avec les valeurs du témoin positif de couleur bleu foncé (DO=0,681). On constate que le pouvoir réducteur de la phycocyanine diminue graduellement selon les méthodes d'extraction utilisées : par l'eau (DO=0,104), par solvant (DO= 0,076), par sonification (DO=0,052) et par congélation/décongélation (DO=0,050).

On note que pour avoir une phycocyanine avec plus d'activité de réduction de fer, il est préférable d'utiliser la méthode d'extraction par l'eau.

3.2 Polyphénols totaux :

Les analyses quantitatives des phénols totaux, ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 19). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg EAG/g ES (Tableau 14).

EAG : Equivalent acide gallique.

ES : Extrait sec.

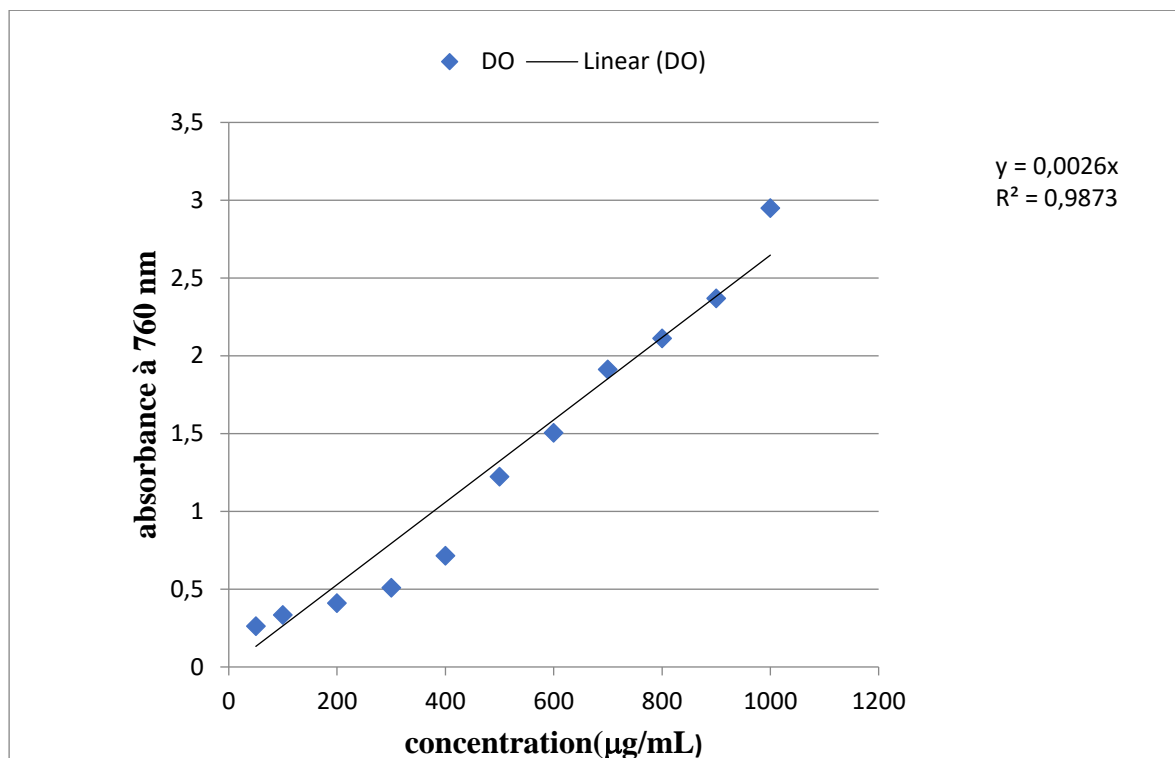


Figure 17 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

D'après la figure 19, on remarque que le coefficient de régression de la courbe d'étalonnage est proche de 1 ($R^2 = 0,9602$) ; Cette courbe est donc utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols des échantillons.

Tableau 11 : Résultats du dosage des polyphénols.

Extrait obtenu par	Concentration des polyphénols (mg/g)	Equation de la courbe d'étalonnage	R ²
Eau	1,478	Y=0,0026x	0,9602
Congélation /décongélation	0,435	Y : l'absorbance d'extrait X : la concentration des polyphénols	
Solvant	0,510		
Sonification	0,228		

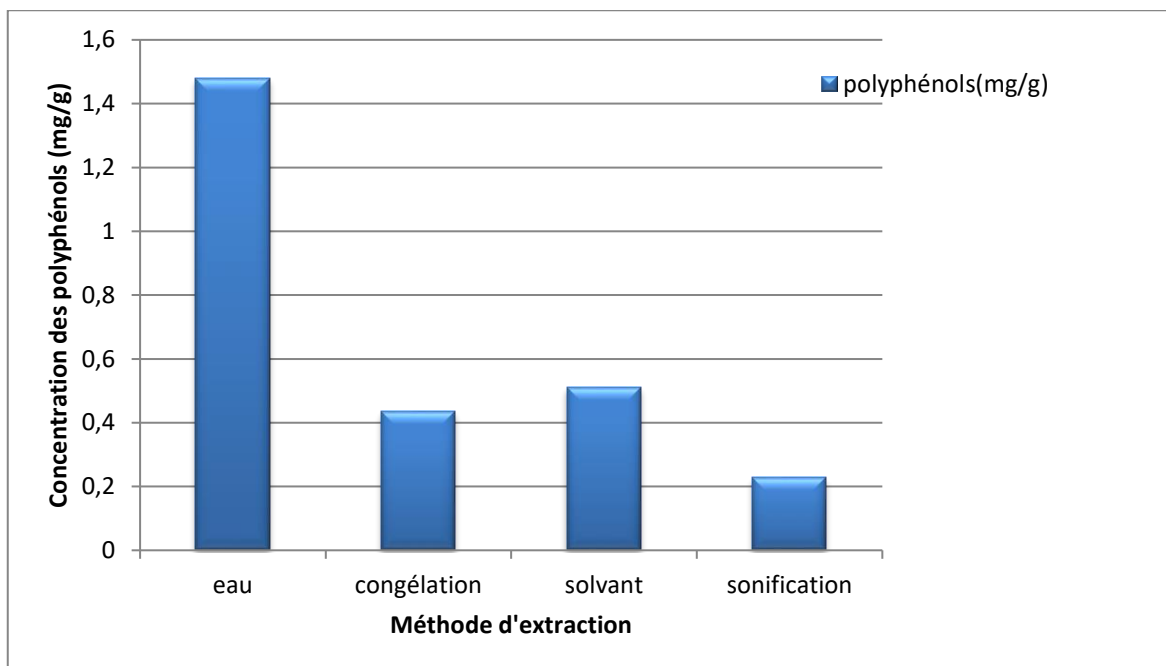


Figure 18 : Concentration des polyphénols totaux issus de la phycocyanine

Les concentrations en polyphénols totaux des différentes fractions varient entre 0,228 et 1,478 mg /g. La concentration la plus élevée (1,478mg/g) des phénols a été mesurée dans l'extrait de phycocyanine obtenu par l'eau, comparée aux concentrations de polyphénols mesurées dans les extraits de phycocyanine obtenus par les méthodes d'extraction par : solvant, congélation/décongélation et sonification, dont les valeurs sont respectivement 0,510, 0,435 et 0,228 mg /g.

Selon ces résultats , on déduit que le contenu phénolique dans les extraits examinés dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction (polarité de l'eau est la plus élevée) (BOURGOU *et al.*, 2016) et aussi de la méthode utilisée pour l'extraction de la phycocyanine.

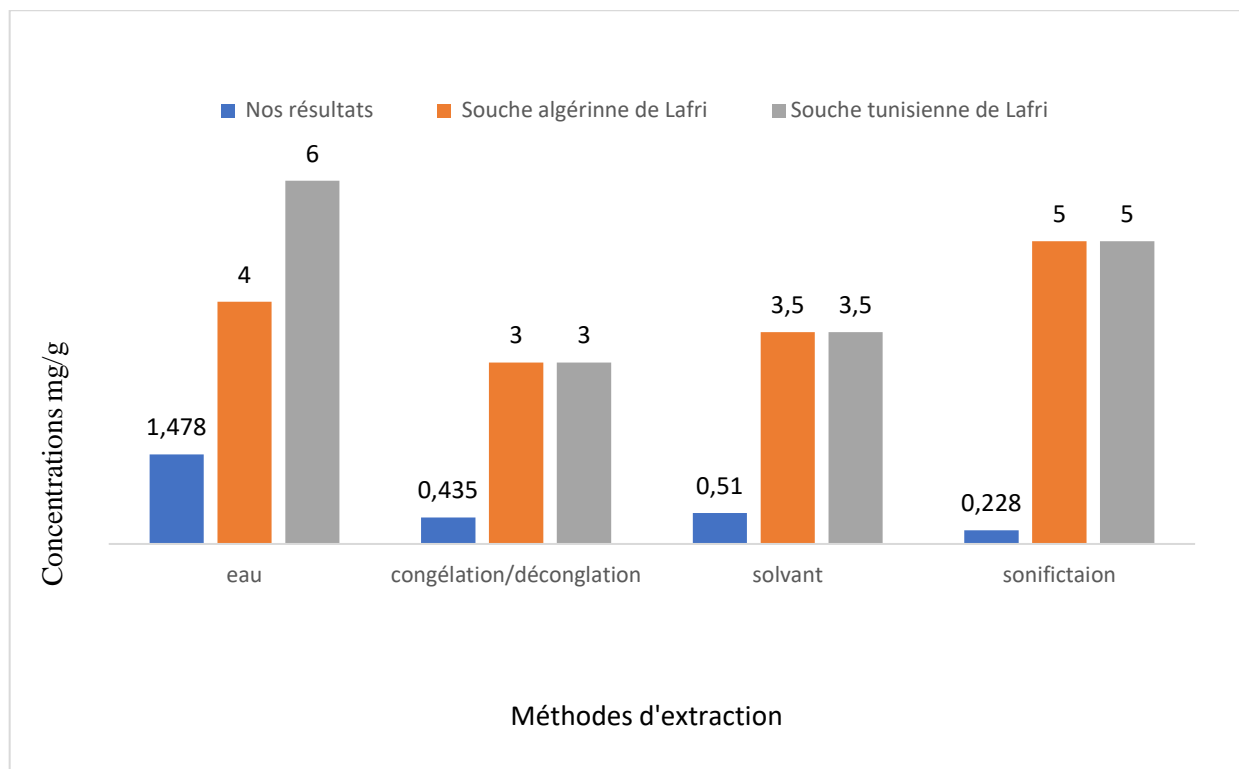


Figure 19 : Comparaison du taux de polyphénols entre nos résultats et résultats de Lafri et al.,2018.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par LAFRI et *al.*, 2018, on constate que la concentration en polyphénols de ces auteurs est élevée par rapport à nos résultats. LAFRI et *al.*,2018 ont obtenu des valeurs de la teneur en polyphénols comprise entre 4 et 5 mg/g de matière sèche pour la souche algérienne et 3 à 6mg/g de matière sèche pour la souche tunisienne.

Par contre, les valeurs obtenues dans notre étude sont supérieures à celles obtenues (4.9µg/g) par BUJARAD et *al.*, 1970.

Cette différence peut être liée aux méthodes d'extraction, facteurs écologiques (climat, sol, humidité...), et aussi à la souche de spiruline utilisée pour l'extraction de la phycocyanine.

➤ Relation entre les polyphénols et l'activité antioxydante

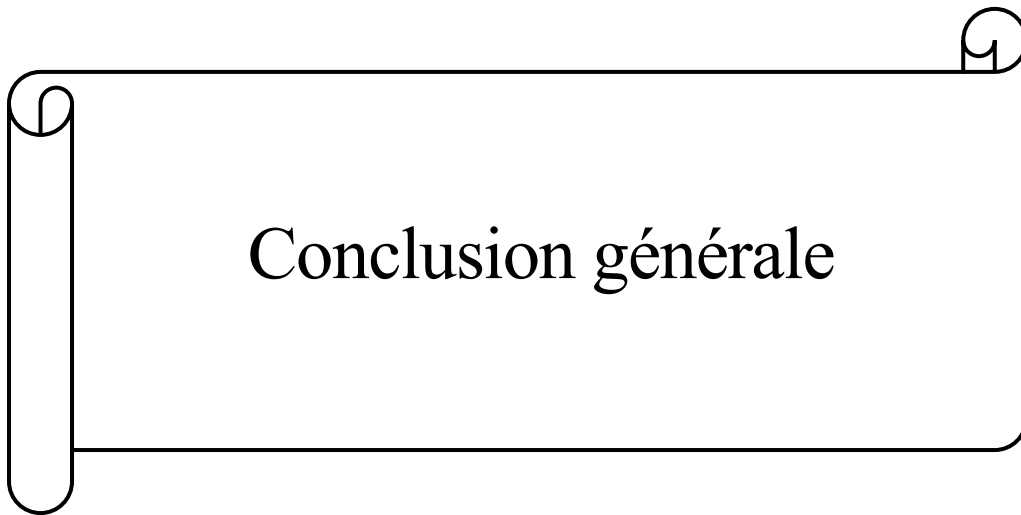
A partir des résultats obtenus par le test de FRAP et en comparant avec les résultats de dosage de polyphénols des extraits en fonction de la méthode d'extraction, on déduit que la concentration en polyphénol a un effet sur l'activité antioxydante.

➤ Conclusion

A partir de notre étude on a conclu que l'extraction de la phycocyanine par solvant est la plus efficace en termes de concentration et de degré de pureté. Ainsi que l'extraction à l'eau nous a permis de récupérer une phycocyanine pure aux possibilités cosmétiques.

Concernant le rendement, l'extraction par congélation/décongélation a permis d'obtenir un rendement supérieur comparativement aux autres méthodes (extraction par solvant, par ultrason, et par l'eau).

En revanche, Une quantité importante de polyphénols a été mesurée à partir de la phycocyanine obtenue par l'extraction à l'eau et ceci est dû principalement à la polarité élevée de l'eau. Cette concentration en polyphénols a un effet sur l'activité antioxydante de la phycocyanine.



Conclusion générale

Le présent travail, répond à un objectif d'évaluation de l'activité antioxydante de la phycocyanine issue de la spiruline. Ainsi que son activité réductrice. Une dualité fonctionnelle qui fait d'elle un composant très recommandé dans les différentes industries pharmaceutiques et cosmétiques.

Les résultats des différentes analyses physico-chimiques témoignent la stabilité du produit, à travers la mesure du potentiel d'Hydrogène (7.62) légèrement basique, du taux d'humidité qui est de 3.296 % et l'acidité titrable de 6.25%.

Après la phase de caractérisation physico-chimiques de la spiruline utilisée dans cette recherche, nos travaux nous ont amené à conclure que l'extraction par solvant (tampon phosphate) est la meilleure pour l'extraction de phycocyanine en termes de concentration et de degré de pureté à partir de la souche algérienne cultivée dans la région de Tamanrasset, comparativement aux autres méthodes utilisées pour l'obtention de ce pigment.

Une étude a été effectuée sur les résultats d'extraction obtenus, a montré une teneur appréciable de la phycocyanine en polyphénols obtenus par l'extraction à l'eau, une activité réductrice importante, au même temps un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

Du fait des diverses vertus antioxydantes que possèdent la phycocyanine, la formulation d'une crème anti-acné a été prévue pour évaluer l'efficacité de ce pigment contre l'acné et son effet à régler la sécrétion de sébum.

A cause de la crise sanitaire liée à la propagation du virus Covid 19, on n'a pas pu arriver au stade de la formulation de la crème.

Il apparaît clairement que la spiruline devrait connaître dans les prochaines années un développement très important, plus particulièrement dans les pays en voie de développement. On envisage aussi dans le futur l'incorporation de la phycocyanine dans divers produits cosmétologiques pour des effets anti-ride, anti-vieillessement et anti-chute des cheveux.

Perspectives et recommandations :

On souhaite que ce travail sera repris pour vérifier les résultats obtenus dans notre étude et d'être complété pour arriver à fabriquer une crème à base de phycocyanine indiquée dans le traitement de l'acné.

On recommande aussi d'identifier génétiquement les souches à fort rendement en phycocyanine ; d'explorer d'autres domaines d'application de la phycocyanine en thérapeutique, pharmaceutique et alimentaire et d'exploiter la richesse marine pour la recherche d'une formule anti-âge, anti-acné et anti-chute des cheveux la plus complète et la plus efficace



Référence bibliographique

ABALDE J., BETANCOURT L., et al (1998). Purification et caractérisation de la phycocyanine marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science* , p.p. 109-136.

AHOUNOU., M.N. (2018). La spiruline un complément alimentaire en conseil à l'officine .Enquete d'utilisation . Thèse de Doctorat. Medecine et pharmacie.France: Université de ROUEN ., p.p. 11-40.

ALIAN., G. (2006). Étude d'opportunité des biotechnologies marines sur la production et l'utilisation des microalgues. 28 p .

AUDREY., M. (2016). La spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine. Thèse de doctorat, U.F.Rde pharmacie , Alpes , p.p. 6-46.

BELMARS., D. (2015). Contribution a l'identification des cyanobacteries du barrage zit el-emba (skikda). Mémoire de Master, Université Sciences de la Nature et de la Vie.Batna : p 8-10.

BENAHMED .,D.A. (2012). Analyse des aptitudes technologiques de poudres de dattes (Phoenix-dactylifera.l) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes.Thèse de doctorat. Microbiologie.Algérie : Université M'hamed Bougara-Boumerdes , p.p. 11-19.

BENNETT., A., BOGORAD L (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*: p.p. 419-435.

BOUDOUR, A. (2008). Recherche et essais de purification de *Spirulina* sp dans différents. Mémoire de Magister . sciences de la nature .Algérie : Badji Mokhtar , Annaba.:Université des sciences ., p.p.2-13.

BOUGANDOURA., N., BENDIMERAD. N., (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq, p 6.

BRANGER., B. (2003). La spiruline comme complément alimentaire dans la malnutrition du nourrisson au Burkina-Faso. : p 6.

BUJARD E., BACO U., et al (1970). Composition and nutritive value of blue green algae (*Spirulina*) and their possible use in food formulations. *Journal of Food Science and Technology*.20(4)., p.p.330-350.

- CHARPY (2008).** La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? France: Marseille., p 67.
- CHRISTAKI., E et al. (2017).** Phycobiliproteins: A New Perspective in Natural Pigments Derived from Microalgae. *Journal of Oceanography and Marine Research.*, p4.
- DOKE J. M (2005).** An Improved and Efficient Method for the Extraction of Phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering.*, p 5.
- ELYAH., A (2003).** Quel avenir pour la spiruline ? Mémoire Bibliographique. Algologie. France : Université de Montpellier II ., p 30 .
- ERIKSEN N.T. (2008).** Production de phycocyanine - un pigment avec des applications en biologie, biotechnologie, aliments et médecine., p 13.
- FALQUET., J., HURNI J.-P (2006).** Spiruline Aspects Nutritionnels. Suisse : Edition Antenna Technologies., p 41.
- FERHAT., W., LEKHAL ., S (2019).** Culture et production de la spiruline *Arthrospira Platensis* dans la région d'El Oued. Thèse de doctorat. Algologie. Algérie: université El Oued., p 165 .
- FERNANDEZ-ROJAS B et al. (2014).** Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods.*, p 6.
- FIAVIE.,L. (2011).** Les produits cosmétiques biologiques : labels, composition et analyses critique de quelques formules., p 12.
- GIRARDIN-ANDREANI., C.(2005).** Spiruline: système sanguin, système immunitaire et cancer . *Phytothérapie.*, p 10.
- GOULAMABASSE T.R. (2018).** La spiruline : activités thérapeutiques et son intérêt dans la lutte contre la malnutrition à Madagascar. Thèse de doctorat. Pharmacie. France : Université de Pharmacie de Lille ., p.p. 8-40.
- HAMEDI., S. (2019).** Caractérisation génétiques , physiologiques , biochimiques et biodiversité des diatomées. Thèse de doctorat. Science de la nature et de la vie . Algérie : U.S.N.V , Oran ., p.p. 5-10.
- HOCINI, M. (2017).** Production de la Spiruline en Algérie (*Arthrospira platensis*) : Bilan et perspectives. Mémoire d'ingénieur. Science de la nature et de la vie. Algérie : U.S.N.V. Bejaia., p.p.2-15.

JEONG S.M., KIM S.Y., et al (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, p.p 3389–3393.

JORIS., V. (2015). Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium. Thèse de Doctorat, Université de sciences des procédés, sciences des aliments (SP-SA), Montpellier., p.p. 60-77.

JOURDAN J.P (2011).Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline. Diplôme M.I.T. Industrie chimique.France : Paris., p 10.

KAMRAN A et KARUNAKARAN R.J (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India.*Lebensmittel-Wissenschaftund Technologie.*, p.p. 344–352.

LAFRI., et al., (2018). Optimisation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline HTAM. Thèse de doctorat. Science de la nature et de la vie. Algérie : Université de BLIDA 1., p.p.52-80.

LIANGQIAN., J et al.(2018). Phycocyanine: un médicament potentiel pour le traitement du cancer. Dans Zhejiang Binmei Biotechnology Co., Ltd. [en ligne]. [consulté le 10/09/2020]. Disponible sur le web: <http://www.binmeibio-fr.com/info/phycocyanin-a-potential-drug-for-cancer-treat-25691323.html>.

LOUVEL., S. (2019). La spiruline : Intérêts humanitaires et thérapeutiques. Thèse de doctorat. 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 cultivée en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle. *International Journal of Biological and Chemical Sciences.*, p.p.2035-2038.

MINH., N. (2014). Etude comparative des méthodes d'extractions de la phycocyanine de *Spirulina Platensis*. Madagascar .,p2-15.

MINKOVA K., ANTOVA R., et al (2003). Purification de la C-phycocyanine de la spiruline (*Arthrospira fusiforme.*, p 5.

NGUYEN M., CHARI V., et al (2018). Etude comparative des méthodes d'extraction de la phycocyanine de *Spirulina platensis*. LCSNSA - Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments .,p.p. 12-20.

- NIANGORAN., M. (2017).**Optimisation de la culture de la spiruline en milieu contrôlé : éclairage et estimation de la biomasse. Thèse de Doctorat.Algologie.France. l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier., p.p.36-39.
- PIERLOVISI., C. (2008).** Composition chimique de la spiruline. Colloque international « Spiruline et développement » ., p.p. 25-28.
- POTTECHER., F. (2014).** Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications. WO2014045177A1. World Intellectual Property Organization. [en ligne]. [Consulté le 11/08/2020].Disponible sur le web:<https://patents.google.com/patent/WO2014045177A1/fr:p10-13>.
- PROY., M. (2019).**La spiruline et son utilisation a l'officine. Thèse de doctorat. Pharmacie .France : UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE: p 9-24.
- RAJ., T. K. (2019).** C-phycocyanin of spirulina plantesis inhibits nsp12 required for replication of sars-cov-2: a novel finding in-silico., p.p.1-2 .
- RAMIREZ., L. (2013).** Production de bio-carburants de 3ème génération à partir de microalgues. Thèse de Doctorat. Chimie .France. Lyon.: : Universite Claude Bernard – Ecole doctorale de chimie ., p.p.15-17.
- REIS A., MENDES A., et al (1998).** Production, extraction et purification des phycobiliprotéines de *Nostoc* sp. Bioresour. Technol . , p.p. 181–187.
- SAGGAI., A. (2007).** Compatibilité des eaux des nappes de la region de ouargla pour la culture de spiruline *Arthrospira Platensis* (souche de Tamanrasset). Mémoire de Magister. Science de la nature et de la vie. Algérie : Faculte des sciences de l'ingenieur , Ourgla: p.p.10-20.
- SALMEÁN., G et al. (2015).** Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*). *Nutricion Hospitalaria* .,p.p. 12-20.
- SGUERA., S. (2008).** *Spirulina platensis* et ses constituants: intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques (PhD Thesis). France : UHP-Université Hen ri Poincaré ., p.p. 6-34.
- SIDDHURAJU P., BECKER K (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vignaunguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*.101(1)., p.p. 10-19.

SILVEIRA S. T., BURKERT J. F. M., et al (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98(8), p.p. 1629-1634.

THANGAM.,R. (2013). C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest ., p.p. 15-20.

Site Web :

¹<https://www.spirulinedescalanques.com/histoire-de-la-spiruline/>

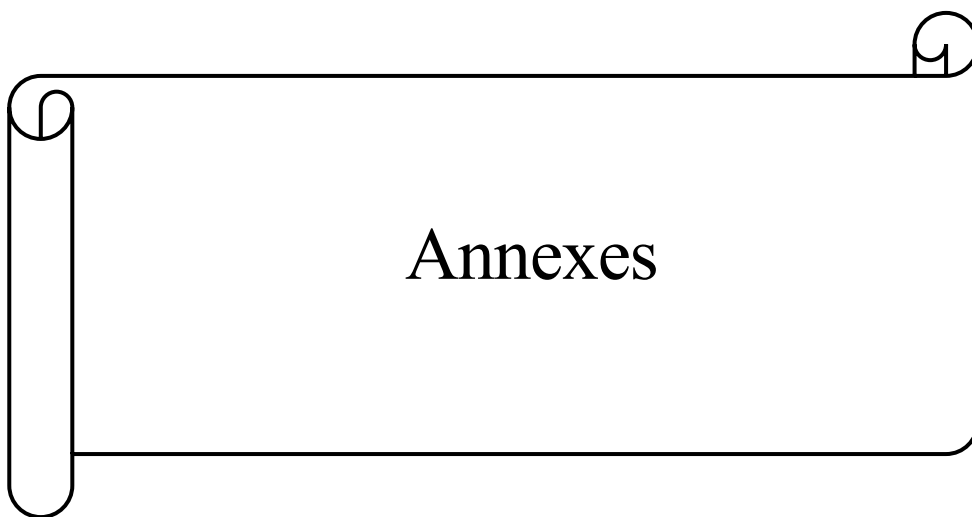
²<http://www.aps.dz/economie/88638-ouargla-disponibilite-des-conditions-pour-booster-la-culture-de-la-spiruline-dans-le-sud>

¹<http://www.liberte-algerie.com/actualite/la-spiruline-ou-le-super-aliment-247045/print/1>

<https://www.spirulinedescalanques.com/histoire-de-la-spiruline/consulté>

¹<https://www.spirulinedescalanques.com/histoire-de-la-spiruline/>

¹<http://www.liberte-algerie.com/actualite/la-spiruline-ou-le-super-aliment-247045/print/1>



:

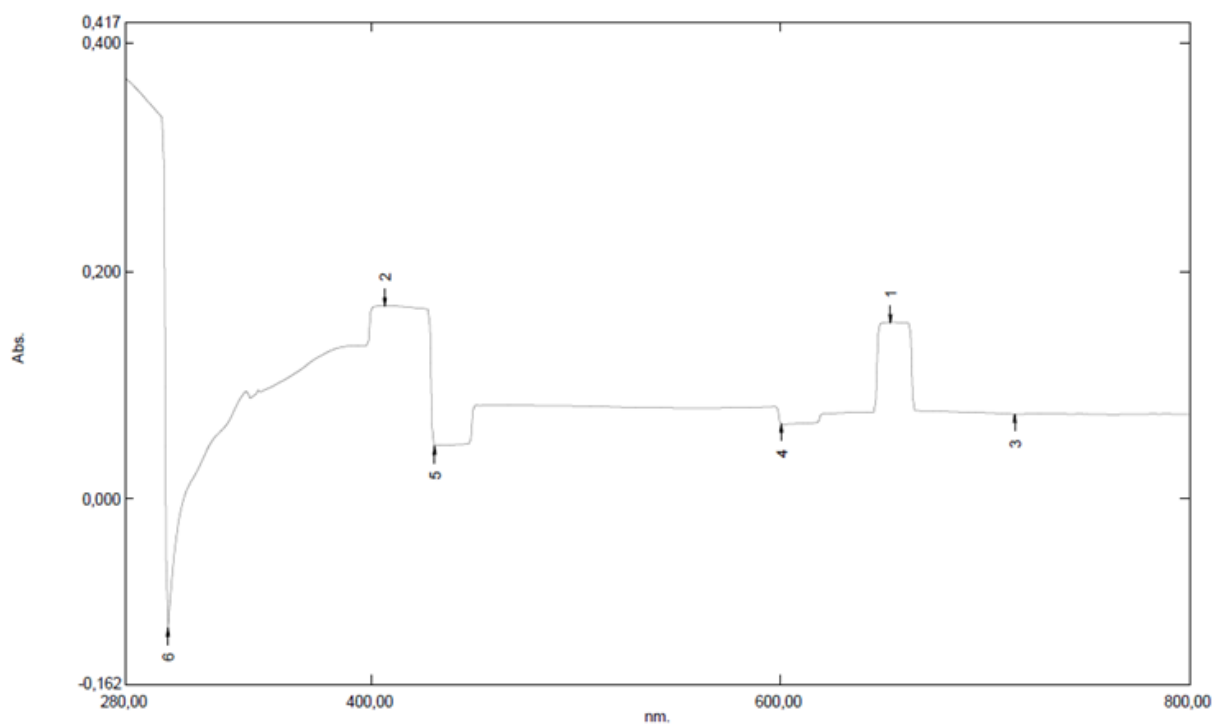


Figure1: Absorbance du tampon phosphate utilisé dans les méthodes d'extraction par solvant et par sonification.

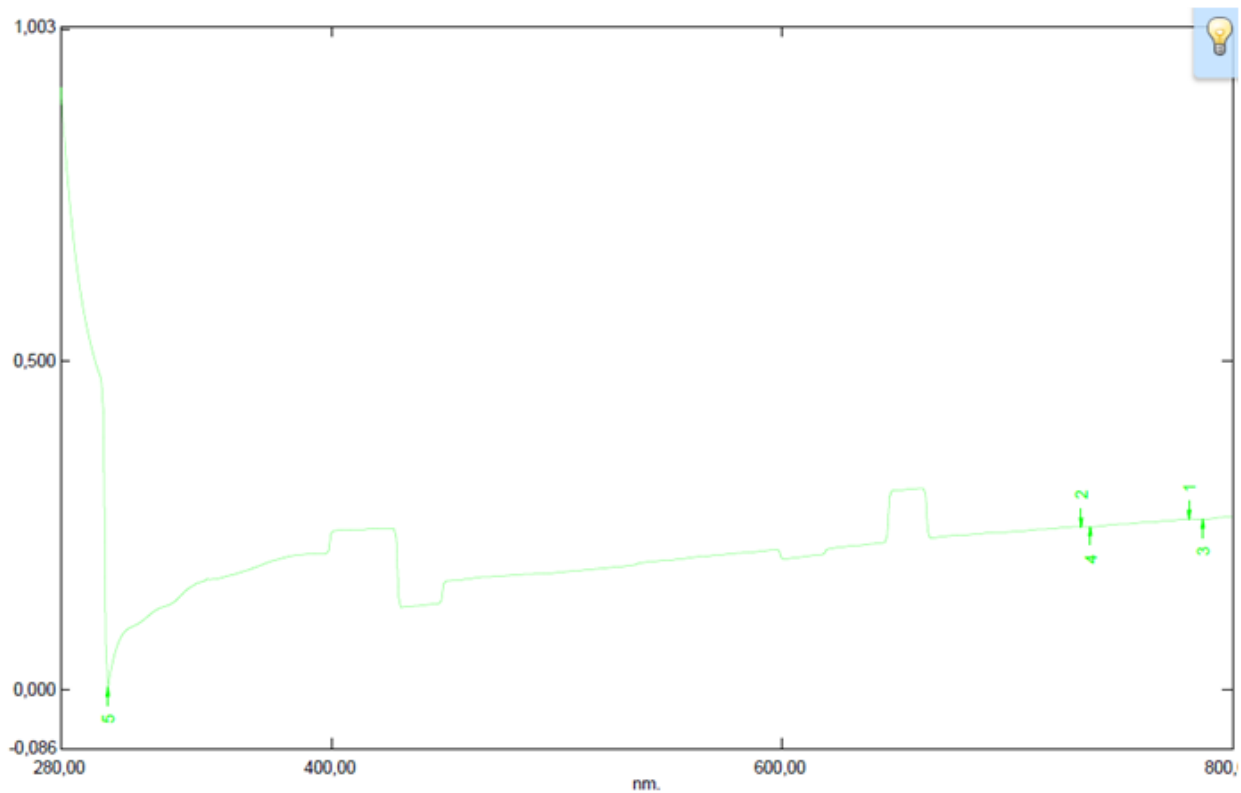


Figure2: absorbance de blanc utilisée dans la méthode d'extraction de

congélation/décongélation

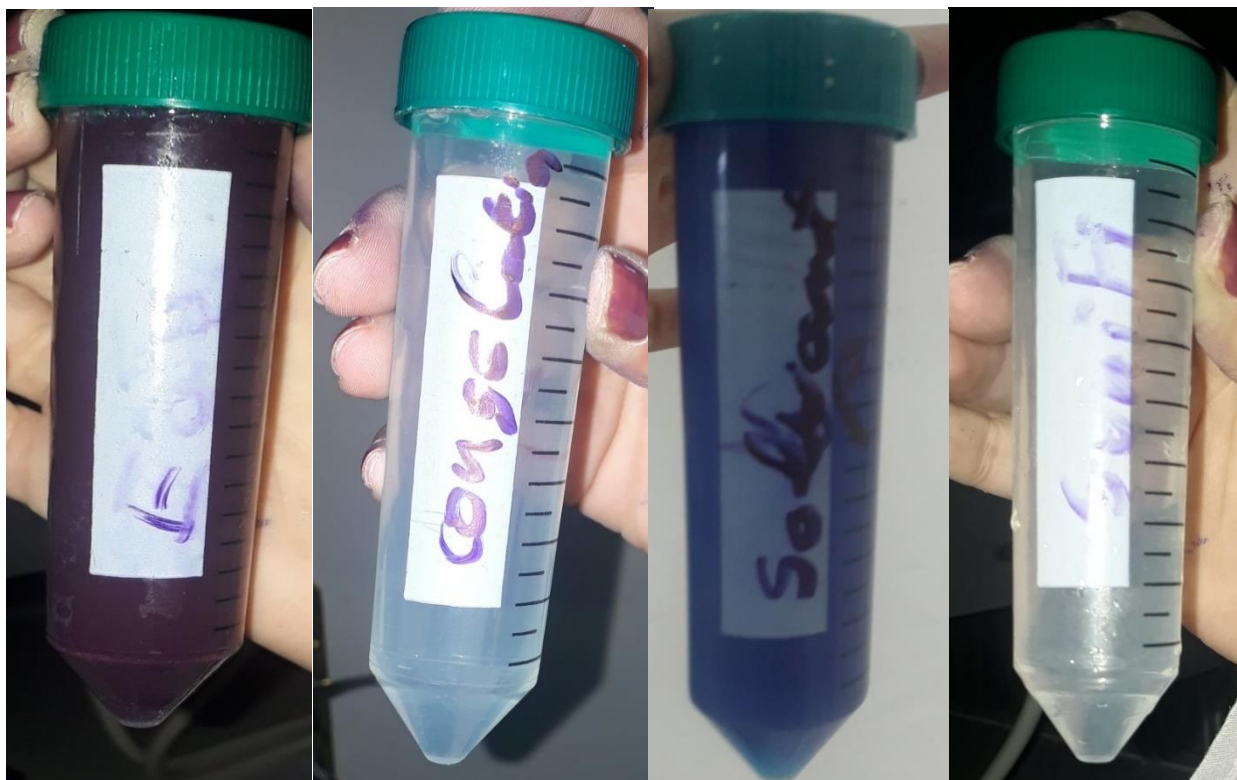


Figure 3: la phycoerythrine obtenue par les 4 méthodes d'extraction

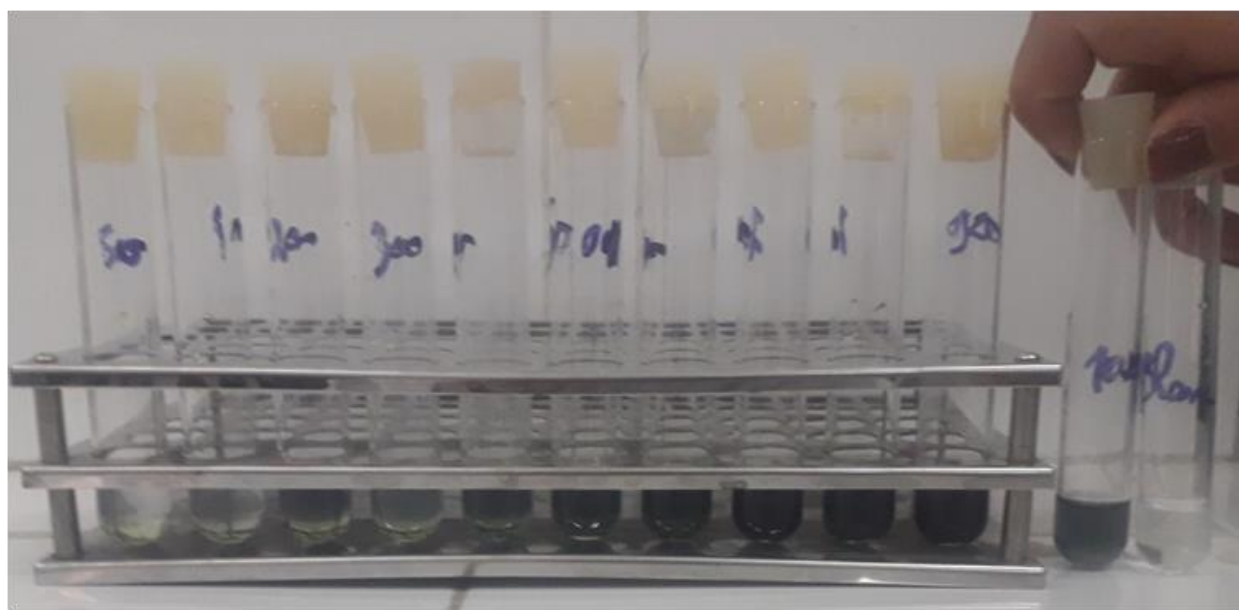


Figure4:gamme d'étalonnage d'acide gallique

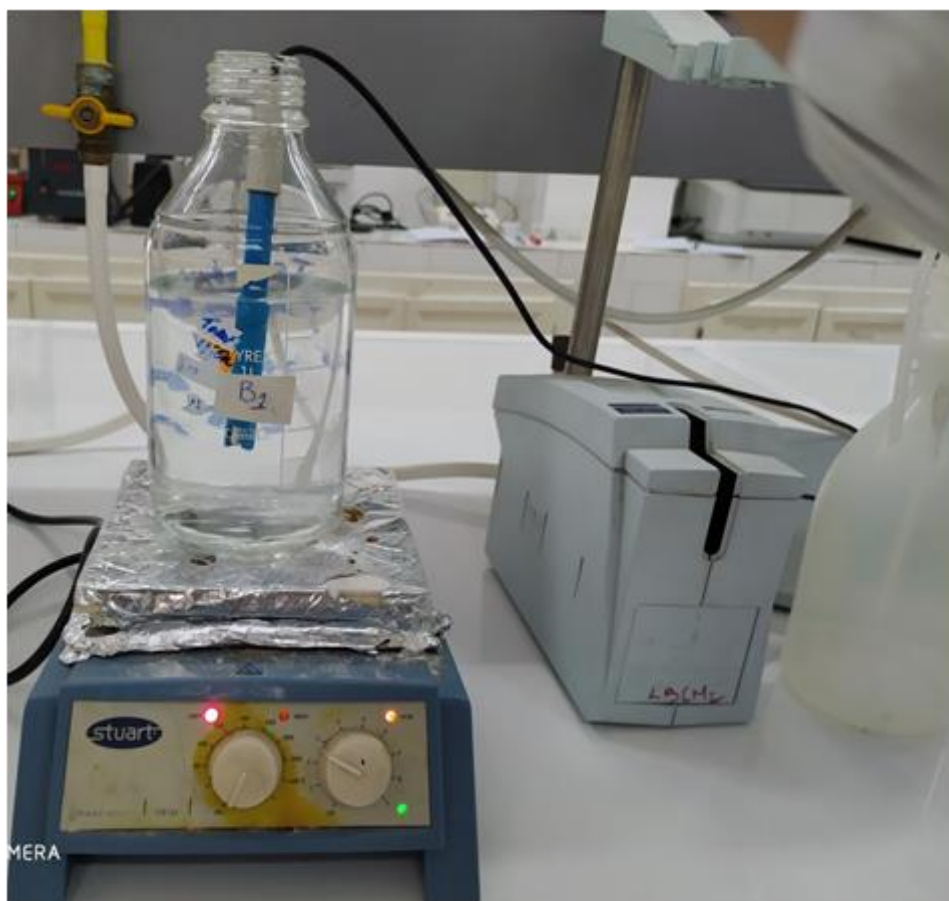


Figure5:préparation de tampon phosphate (pH =7)

Résumé :

Le groupe des cyanobactéries, compte parmi l'une des plus anciennes formes de vie sur Terre Parmi elles existent le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une bactérie particulièrement intéressante dénommée *Spirulina platensis* plus présentée comme une « algue miracle aux mille vertus ».

En effet, le potentiel de cette micro-algue semble être important et ceci principalement grâce à son principal pigment, la phycocyanine, donnant à cet organisme sa couleur bleu-vert caractéristique, qui présente plusieurs activités biologiques : antioxydant (utilisé dans les produits cosmétiques), anti radicalaire, anti-inflammatoire, anti-tumorale, amélioration du système immunitaire (utilisé comme complément alimentaire) hépato protection et détoxification.

L'objectif de ce travail est l'élaboration d'un produit cosmétique bio par l'issue du principal pigment de la spiruline pour ses effets antioxydants puissants qui ont joué un rôle dans le mécanisme de l'acné et l'apparition de boutons.

Cependant avant de démarrer cette partie du travail, il nous a semblé nécessaire de commencer par une caractérisation physico-chimique de la spiruline, puis nous avons évalué plusieurs méthodes d'extraction de la phycocyanine issue de cette algue bleue, dans le but de déterminer la méthode optimale en termes de rendement, concentration et pureté.

Nous avons testé quatre méthodes d'extraction de la souche, soit physiques l'extraction par l'eau et l'extraction par congélation/décongélation, soit chimiques l'extraction par solvant ou par les méthodes innovatrices telles que l'extraction par ultrason.

La pureté de l'extrait brut de la phycocyanine obtenue par les différentes méthodes varie entre 0,35 et 0,8. Les méthodes d'extraction par lesquelles on a obtenu un degré élevé de pureté au voisinage de 0,8 sont l'extraction par l'eau et par solvant avec une concentration de 0,3 mg/mL et 0,406 mg/mL respectivement.

Concernant le rendement en phycocyanine peut varier selon la méthode d'extraction, de 7,5 mg/g de matière sèche à 34,4 mg/g pour dont les résultats de l'extraction par congélation/décongélation ont permis de récupérer une quantité importante de phycocyanine.

Mots clés : spiruline, phycocyanine, méthode d'extraction, pureté, rendement, concentration

Abstract:

The group of cyanobacteria, is one of the oldest forms of life on Earth Among them exist the genus *Spirulina* or *Arthrospira*, filamentous cyanobacteria which includes a particularly interesting bacterium called *Spirulina platensis* more presented as a "miracle alga with a thousand virtues".

Indeed, the potential of this microalgae seems to be important and this mainly thanks to its main pigment, phycocyanin, giving this organism its characteristic blue-green color, which has several biological activities: antioxidant (used in cosmetic products), anti radical, anti-inflammatory, anti-tumor, improvement of the immune system (used as a food supplement) hepato protection and detoxification.

The objective of this work is the development of an organic cosmetic product by issuing the main pigment of spirulina for its powerful antioxidant effects which play a role in the mechanism of acne and the appearance of pimples.

However, before starting this part of the work, it seemed necessary to us to start with a physicochemical characterization of spirulina, then we evaluated several methods of extracting phycocyanin from this blue alga, in order to determine the optimal method in terms of yield, concentration and purity.

We tested four methods of extracting the strain, either physical water extraction and freeze / thaw extraction, or chemical solvent extraction or innovative methods such as ultrasonic extraction.

The purity of the crude phycocyanin extract obtained by the different methods varies between 0.35 and 0.8. The extraction methods by which a high degree of purity in the region of 0.8 has been obtained are water and solvent extraction with a concentration of 0.3 mg / mL and 0.406 mg / mL respectively.

Regarding the phycocyanin yield may vary depending on the extraction method, from 7.5 mg / g of dry matter to 34.4 mg / g for which the results of the extraction by freezing / thawing have made it possible to recover a significant quantity phycocyanin.

Key words: spirulina, phycocyanin, extraction method, purity, yield, concentration

تلخيص

مجموعة البكتيريا الزرقاء ، هي واحدة من أقدم أشكال الحياة على الأرض ومن بينها جنس سبيرولينا أو آرثروسبيريرا ، البكتيريا الزرقاء الخيطية التي تتضمن بكتيريا مثيرة للاهتمام بشكل خاص تسمى سبيرولينا بلاتنيسيس ويتم تقديمها على أنها "طحلب معجزة بألف فضائل".

في الواقع ، يبدو أن إمكانيات هذه الطحالب الدقيقة مهمة ، ويرجع ذلك أساساً إلى صبغتها الرئيسية ، فيكوسيانين ، التي تمنح هذا الكائن لونه الأزرق والأخضر المميز ، والذي له العديد من الأنشطة البيولوجية: مضادات الأكسدة (المستخدمة في مستحضرات التجميل) ، مضاد للجذور ، مضاد للالتهابات ، مضاد للأورام ، يحسن جهاز المناعة (يستخدم كمكمل غذائي) حماية الكبد وإزالة السموم.

الهدف من هذا العمل هو تطوير منتج تجميلي عضوي عن طريق إصدار الصبغة الرئيسية من سبيرولينا لتأثيراته المضادة للأكسدة القوية والتي تلعب دوراً في آلية حب الشباب وظهور البثور.

ومع ذلك ، قبل البدء في هذا الجزء من العمل ، بدأ من الضروري لنا أن نبدأ بالتوصيف الفيزيائي الكيميائي للسبيرولينا ، ثم قمنا بتقييم عدة طرق لاستخراج الفيكوسيانين من هذه الطحالب الزرقاء ، من أجل تحديد الطريقة المثلى من حيث العائد والتركيز والنقاء.

اختبرنا أربع طرق لاستخراج السلالة، إما استخراج بالماء المادي واستخراج عن طريق التجميد / الذوبان ، أو الاستخلاص بالمذيبات الكيميائية أو الطرق المبتكرة مثل الاستخراج بالموجات فوق الصوتية.

يتراوح نقاء مستخلص الفيكوسيانين الخام الذي تم الحصول عليه بالطرق المختلفة بين 0.35 و 0.8. طرق الاستخراج التي تم من خلالها الحصول على درجة نقاء عالية (0.8) هي استخلاص الماء والمذيبات بتركيز 0.3 مجم / مل و 0.406 مجم / مل على التوالي.

قد يختلف مردود الفيكوسيانين اعتماداً على طريقة الاستخراج ، من 7.5 مجم / جم من المادة الجافة إلى 34.4 مجم / جم حيث أتاحت نتائج الاستخراج عن طريق التجميد / الذوبان استعادة كمية كبيرة فيكوسيانين.

الكلمات المفتاحية: سبيرولينا ، فيكوسيانين ، طريقة الاستخلاص ، النقاء ، المحصول ، التركيز