REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES

Mémoire
Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**
En Biologie
Spécialité : Microbiologie appliquée
Par

M^elle^ DOUMA Nora

M^elle^ LAMRI Ibtissem

Thème

Isolement et purification de spiruline (*Arthrospira platensis*) et caractérisation générale de la biomasse

Soutenue le :20 /06/2018. Devant le jury composé de :

Encadreur	AINAS Mahfoud	M.C.B	Université de Médéa
Président	ATSAMNIA Djamel	M.C.B	Université de Médéa
Examinateur 1	CHAMI Boazza	M.A.B	Université de Médéa
Examinateur 2	BENNADJI Amine	M.A.A	Université de Médéa

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce projet de fin d'étude.

Nous remercions infiniment notre promoteur Monsieur M. AINAS pour ses conseils judicieux et sa bienveillance.

Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude pour nous avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier aussi monsieur CHAMI Boazza

Nos remerciements vont également aux membres du jury : Mr ATSAMNIA Djamel qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire

Mr CHAMI Boazza et Mr BENNADJI Amine qu'ont accepté de juger notre travail

Enfin nous voulons dire merci à tous les enseignants du département de biologie l'université de Yahia Fares

Dédicace

Avec mes sentiments de gratitudes les plus profonds, Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents, sans eux je n'est pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études

A mes Très chers sœurs qui m'ont encouragé

A mon grand-père et ma grand-mère

A mes ancles et mes tantes

A ma chère binôme Nora

A mes chère amies Fatma, Yasmina et Zhor, Kanza, Zahra

A tous ceux que j'aime et que je respecte et qui m'aiment et me respectent

Ibtissem

Dédicace

Je dédié ce modeste travail

A mes chères parents ;à ma mère qui m'a soutenue toujours avec son amour et sa tendresse, à mon père qui a sacrifié juste pour qu'il me donne tous ce que je veux, ma réussite est grâce à lui . Que le dieu vous garde pour moi, je vous souhaite une longue vie avec la bonne santé, et que de bonheur

A mes frères qui m'ont encouragé durant mes études.

A ma sœur Loubna, à mes chères ; Hadjer, Soumia, Mohamed Aridj et sondos.

A ma chère binôme Ibtissem, Que je lui souhaite le succès dans sa vie.

A mes chères amies : METIDJI Fouzia, Rima, Fatma, Zhor, Yasmina, Hadjer, Kanza et Zahra.

Et enfin, À tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Nora

Résumé :

Ce travail présente une contribution à la valorisation de biomasse d'*Arthrospira platensis* qui est riche en pigments, en polyphénols, en minéraux, et en d'autres éléments. Elle est utilisée pour lutter contre diverses pathologies. Dans le but d'isoler et purifier *A.Platensis* dans une culture axénique et déterminer leurs caractéristiques physico-chimiques et biologiques. Elle a été soumise à un traitement par le bicarbonate, et a révélée pure 94%. Le suivi de leur cinétique de croissance et la détermination de leur teneur en humidité, cendre, en chlorophylle, et en phycocyanine. La biomasse présente une composition de 5,62±0.33%, 9.7±0.13%,10.52±0. 32mg.g^{-1},0.053±0.013 mg.g^{-1} en teneur d'humidité, cendre, en chlorophylle, et en phycocyanine, successivement. L'extraction des polyphénols par (ethanol/eau),et la détermination de leur teneur par le réactif Folin Ciocalteu qui donne 68.66±0.7 µg AG.g^{-1},92.16±0,08 µg AG. g^{-1}pour la spiruline en poudre, spiruline fraiche respectivement. En testant d'activité antibactérienne montre que *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922sont plus sensible que *Pseudomonas aeruginosa*.L'évaluation de pouvoir antioxydant par le réactif diphénylpicrylhydrazyl (DPPH),les résultats révèlent qu'une IC50 138.22±0.2 mg.ml^{-1} et 66.26±0.12 mg.ml^{-1}pour la spiruline en poudre, spiruline fraiche respectivement. Ces valeurs montrent que les polyphénols de spiruline fraiche ayant un meilleur effet. Sur la base de l'ensemble des résultats qu'on a obtenu la spiruline c'est vrai difficile à isoler mais le bicarbonate c'est le meilleur traitement pour éliminer les contaminants à 94%, et elle reste bénéfique avec ses constituants et son pouvoir antibactérien et antioxydant.

Mots clés : *Arthrospira platensis*, Isolement, Activité antibactérienne et antioxydante, polyphénols

Abstract:

This work presents a contribution to the biomass valorization of *Arthrospira platensis* which is rich in pigments, polyphenols, minerals, and other elements. It is used to fight against various pathologies. With the aim of isolating and purifying *A. Platensis* in an axenic culture and determining their physicochemical and biological characteristics. She was subjected to treatment with bicarbonate, and revealed pure 94%. The monitoring of their growth kinetics and the determination of their moisture content, ash, chlorophyll, and phycocyanin. The biomass has a composition of 5.62 ± 0.33%, 9.7 ± 0.13%, 10.52 ± 0.32 mg. g^{-1}, 0.053±0.013 mg. g^{-1} in moisture content, ash, chlorophyll, and phycocyanin, successively. The extraction of the polyphenols by (ethanol / water), and the determination of their content by the Folin Ciocalteu reagent which gives 68.66 ± 0.7 µg AG. g^{-1}, 92.16 ± 0.08 µg AG. g^{-1} for spirulina powder, fresh spirulina respectively. By testing for antibacterial activity shows that *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922 are more sensitive than *Pseudomonas aeruginosa*.The evaluation of antioxidant power by the diphenylpicrylhydrazyl reagent (DPPH), the results reveal that an IC50 138.22 ± 0.2 mg.ml^{-1} and 66.26 ± 0.12 mg.ml^{-1} for spirulina powder, fresh spirulina respectively. These values show that fresh spirulina polyphenols have a better effect. On the basis of all the results obtained spirulina is difficult to isolate but bicarbonate is the best treatment to remove contaminants to 94%, and it remains beneficial with its constituents and its power antibacterial and antioxidant.

Key words: *Arthrospira platensis*, isolation, antibacterial and antioxidant activity, polyphenols

ملخص:

يعتبر هذا العمل مساهمة في تقييم الكتلة الحيوية لـ*Arthrospira platensis* الغنية بالأصباغ، متعدد الفينول، الأملاح المعدنية، وعناصر أخرى. يتم استخدامه لمكافحة مختلف الأمراض. من أجل عزل وتنقية*platensis. A* في وسط خال من الملوثا ت وتحديد خصائصها الفيز وكيميائية والبيولوجية. لقد عرضت السبيرولينا للمعالجة بالبيكاربونات بنسبة تنقية

تقدر %ب 94 وتتبع حركية نموها وتحديد محتواها من الرطوبة، الأملاح المعدنية، الكلوروفيل والفيكوسيانين. الكتلة الحيوية تتركب من 5,62±0.33%،9.7±0.13%، 0.52±0. $^{1-}$ 1032mg.g، 0.053±0.013 mg. g^{-1} محتواها من الرطوبة،الأملاح المعدنية،الكلوروفيل و الفيكوسيانين على الترتيب.

استخراج مادة متعدد الفينول ب (الايثانول/الماء) وتحديد محتواها بواسطة الكاشف فولا سيوكالت الذي أعطى68.66±0.7 µg AG g^{-1}، 92.16±0,08µg AG. g^{-1} بالنسبة لمسحوق السبيرولينا ،والسبيرولينا الطازجة على التوالي ،من خلال اختبار النشاط المضاد للبكتيريا تظهر أن *Staphylococcus aureus* ATCC 29213، *Escherichia coli* ATCC 25922أكثر حساسية من *Pseudomonas aeruginosa*، تقييم الإمكانية المضادة للأكسدة باستخدام كاشف الديفينيل بيكريل ايدرازيل(DPPH) ، النتائج تكشف أن IC50 138.22 ± 0.2 mg.ml^{-1} 66.26± 0.12 mg.ml^{-1} لمسحوق السبيرولينا ، السبيرولينا الطازجة على التوالي.هذه النتائج تظهر أن متعدد فينول السبيرولينا الطازجة يكون لها تأثير أفضل.وبناء على كل النتائج التي تم الحصول عليها التي وضحت مدى صعوبة عزل السبيرولينا لكن البيكاربونات أفضل علاج لإزالة الملوثات حيث أعطى نتائج جيدة بنسبة 94% و مع هذا تبقى السبيرولينا مفيدة مع مكوناتها وقوتها المضادة للبكتيريا ومضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Arthrospira platensis*،عزل، الخصائص الفيزيوكيميائية والبيولوجية، متعدد الفينول

Liste des abréviations

AA : acide ascorbique

Abs : absorbance

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AG : acide gallique

AGE : acides gras essentiel

AOCS : American Oïl Chemist's Society

A. platensis : *Arthrospira platensis*

ARN : Acide Ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

***B.cereus* :** *Bacillus cereus*

B.circulans : *Bacillus circulans*

B.megatherium : *Bacillus megatherium*

B. pasteurii : *Bacillus pasteurii*

DMSO : Diméthylsulfoxide

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DO: densité optique

***E. coli*:** *Escherichia coli* ATCC 25922

EDTA : acide éthylène diamino tétracétique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FDA: Food and Drug Administration

GRAS : Generally Recognized As Safe

GPx : glutathion peroxydase

HIV : Humain Immunodéficience Virus

HSV-1 : Herpès Simplex Virus-1

IC50 : Inhibition de 50% de concentration

I% : pourcentage d'inhibition

IL : Interleukine

IV : Intravasculaire

LDL: Low Density Lipoprotein

MHA: Mueller-Hinton Agar

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NK : Natural Killer (Cells)

P : probabilité

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PC : la concentration totale de phycocyanine

pH : potentiel hydrogène

Ps : Poids sec

$\mathbf{R^2}$: Facteur de corrélation

***S. aureus*:** *Staphylococcus aureus* ATCC29213

SNV : science de la nature et de la vie

SOD : Superoxyde Dismutase

tpm : tour par minute

UFC : Unité formant colonie

U.V : ultraviolet

Vit C: vitamine C

Whatman GF / C: Whatman Glass microfiber filters

Liste de nomenclature

Ca : calcium

$CaCL_2$: chlorure de calcium

CaCO3 : carbonate de calcium

Ca-SP : calcium-spirulan

CO2 : Dioxyde de carbone

$Co(NO_3)_2.6H_2O$: nitrate de cobalt

$CuSO_4$:sulfate de cuivre

$FeSO_4.7H_2O$: sulfate ferreux, cristallin

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

H^+ : hydrogène

H_2O : eau

H_2O_2: Peroxyde d'hydrogène

H_3BO_3 : acide borique

$K_2Cr(SO_4)_4 . 24 H_2O$: alun de chrome

$K2HPO_4$: phosphate dipotassique

$K2SO_4$: sulfate de potassium

KNO_3 : nitrate de potassium

Mg : magnésium

$MgSO_4. 7H_2O$: sulfate de magnésium, cristallin

$MnCl_2 . 4 H2O$: chlorure de manganèse

MoO_3 : oxyde de molybdène

Na_2WO_4 : tungstate de sodium

Na Cl : chlorure de sodium

$NaHCO_3$: hydrogénocarbonate de sodium

$NaNO_3$: nitrate de sodium

NH_4VO_3 : vanadate d'ammonium

$NiSO_4.7H_2O$: sulfate de nickel

O2 : Oxygène

O_2^{*-} : anion superoxyde

OH^*: Radical hydroxyle

ROH : alcool

ROOH : peroxydes organiques

$Ti_2(SO_4)_3$: sulfate de titanium

$ZnSO_3$: sulfate de zinc

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Zone de croissance naturelle de la Spiruline dans le monde **…….....….Page 5**

Figure 02 : Morphologie typique d'*Arthrospira platensis* sous microscope**…….Page6**

Figure03 : cycle de vie de la spiruline **……..Page8**

Figure04 :la culture de spiruline dans des condition experimentale…….……..**Page27**

Figure 05 : diagramme de différent étape de filtration de spiruline…….……**Page31**

Figure 06 : Technique de filtration de spiruline……...……**Page31**

Figure 07 : les étapes de purification de spiruline……**Page34**

Figure 08 : Diagramme représente les différents étapes d'extraction de phycocyanine**.....Page37**

Figure 09: Diagramme représente d'extraction des polyphénols de spiruline en poudre…**Page38**

Figure10 : L'extraction des polyphénols par éthanol/eau à partir de poudre de spiruline**..Page 38**

Figure 11 : Les étapes de revivification des souches à tester……**...**……**Page40**

Figure 12 : Préparation des dilutions……**...Page40**

Figure13 : solution de DPPH……**Page42**

Figure14 : Observation microscopique de spiruline à l'état frais à l'objectif 100x…….…**Page43**

Figure15 : Observation microscopique de contaminants de Spiruline à l'objectif100x après coloration de Gram……**...Page43**

Figure 16 : la mise en évidence des contaminants de spiruline après culture sur le milieu Zarrouk gélosé…….……**Page 44**

Figure 17 : Observation microscopique de spiruline traitée à l'objectif 100x,avant et après

Coloration de Gram……...……**Page45**

Figure 18 : isolement de spiruline traitée sur milieu Zarrouk solide……...…**Page45**

Figure19 : le poids sec de spiruline…….……**Page47**

Figure 20 : évolution de biomasse de spiruline en fonction de temps. ……..….**Page47**

Figure21 :spiruline après incéniretion……..**Page49**

Figure22 : Extraction de chlorophylle de spiruline……..….**Page50**

Figure 23 : Extraction de phycocyanine de spiruline…….…..**Page50**

Figure24 :dosage des polyphenols…….…**...Page52**

Figure25 : la teneur en polyphénol des extraits en mg AG/g de spiruline……..**...Page53**

Figure 26 : activité antibactérienne des polyphénols de spiruline vis-à-vis de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC29213 et *P. aeruginosa* pour l'extrait de l'état frais et de poudre...**Page54**

Figure27 : le pouvoir antibactérien de Spiruline vis-à-vis de *E.coli* ATCC 25922et *S.aureus* ATCC29213 et *P.aeruginosa*…….……**...Page55**

Figure 28 : la mise en évidence de potentiel antioxydant de polyphénols de de spiruline...**Page58**

Figure 29 : courbes représentent le potentiel antioxydant des extraits poly phénoliques d'*A.platensis* de différents concentration……..**....Page58**

Figure 30 : IC50 de spiruline**..……....Page59**

LISTE DES TABLES

Tableau I : Bactéries vivants avec la spiruline et pathogènes pour l'homme, et leur pH optimal de croissance……...…….**Page18**

Tableau II : normes imposée en France pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries…….....**Page19**

Tableau III : Composition chimique du milieu Zarrouk…….……....**Page29**

Tableau IV : Composition chimique de la solution A_5…….……**Page29**

Tableau V : Composition chimique de la solution B_6….……...…….……**Page 29**

Tableau VI: Teneur en pigment de spiruline ……..……..……**Page49**

Sommaire

Introduction générale……page 1

Première partie : synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur l'*Arthrospira platensis*

I.1.Présentation de spiruline……**page3**

I.1.1. Définition……**...page3**

I.1.2. Historique……**...page3**

I.1.3. Distribution géographique dans le monde**.....page4**

I.1.4. Caractéristiques structurales……**...page 5**

I.1.5. Taxonomie d'*Arthrospira platensis*.....**Page 6**

I.1.6.Croissance……**....page 6**

I.1.7.Déplacement……**page 7**

I.1.8. Cycle de vie de spiruline……**..page 8**

I.1.9. Compositions biochimique de spiruline**.....page 8**

I.1.9.1. Les protéines et les acides aminés……**page8**

I.1.9.2. Les lipides……**..page 8**

I.1.9.2.1. Lipides totaux……**.....page 8**

I.1.9.2.2.Acides Gras……**..page 9**

I.1.9.3. Les glucides……**....page 9**

I.1.9.4. Acide nucléique……**..page 9**

I.1.9.5. Les vitamines……**..page 9**

I.1.9.5.1. Les vitamines liposolubles……**page 9**

I.1.9.5.2. Les vitamines hydrosolubles……**page 10**

I.1.9.6. Minéraux et oligo-éléments…….....**page 10**

I.1.9.7. Pigments…….....**page 10**

I.1.9.7.1. La phycocyanine.....**page 10**

I.1.9.7.2. La chlorophylle……..**page 11**

I.1.9.7.3. Les caroténoïdes**……page 11**

I.2.L'aspect thérapeutique, toxicologique et biotechnologique de la spiruline…….....**page11**

I. 2.1. Aspects thérapeutiques……...**page 11**

I. 2.1.1. Effet hypocholestérolémiant…….**page 11**

I. 2.1.2. Effet préventif contre le cancer…….**page 12**

I. 2.1.3. Renforcement du système immunitaire…….**page 12**

I. 2.1.4. Activité antivirale……..**page 12**

I. 2.1.5. Effet antihypertenseur……...**page 13**

I. 2.1.6. Antioxydant……...**page 13**

I. 2.1.7. Effet chélateur de métaux lourds……...**page 13**

I. 2.1.8. Effet hypoglycémiant et contre l'obésité……**page 13**

I. 2.1.9. Aide contre la malnutrition……**page 14**

I. 2.2. Aspects toxicologiques…….**page 14**

I.2.3. Aspect biotechnologique……**page 14**

I. 2.3.1. Le milieu de culture……**page 14**

I. 2.3.2. La production de spiruline…… **page 15**

I. 2.3.2.1. Production artisanale……...**page 15**

I.2.3.2.1.1. Méthode de production artisanale……..**page 15**

I.2.3.2.2. Production semi-industrielle et industrielle……..**page 16**

Chapitre II : les contaminants de la spiruline et les étapes de purification

II.1. Introduction…….**page 17**

II.2. Bactéries……...**page 17**

II.3. Les méthodes de purification de spiruline……**page 19**

II.3.1. Purification par manipulation……**page 19**

II.3.1.1. repiquages successifs……..**page 20**

II.3.1.2. Lavage par milieu de culture……..**page 20**

II.3.2. Purification par action d'agents chimiques……**...page 20**
II.3.2.1. Produits bactériostatiques ou bactériolytiques……**...page 20**
II.3.2.2. Antibiotiques……**..page 21**
II.3.3. Purification par action d'agents physiques……**page 21**
II.3.3.1. Température……**page 21**
.II.3.3.2. Irradiation……**..page 21**
II.3.3.3. Pression……**..page 21**

Chapitre III : l'activité biologique de spiruline

III.1. Introduction……**page 22**

III.2**.** L'activité antibactérienne……**page 22**

III.2.1.Bactéries……**...page 22**

III.2.2. Caractéristiques des souches bactériennes pathogènes……**page 22**

III.2.2.1. Staphylococcus aureus…… **page 22**

III.2.2.2. Pseudomonas aeruginosa…… **page 22**

III.2.2.3. Escherichia coli…… **page 23**

III.3. L'activité antioxydante……page 23

III.3.1. Stress oxydatif……**page 23**

III.3.2. Radical libre…….. …..**page 23**

III.3.3. Antioxydants et systèmes de défense…….. …...**page 24**

III.3.3.1. Les antioxydants endogènes…….. ……..**page 24**

III.3.3.1.1. Superoxyde dismutase……..**page 24**

III.3.3.1.2. Catalase……**page 24**

III.3.3.1.3. Glutathion peroxydase……..**page 25**

III.3.3.2. Les antioxydants exogènes…… ….**page 25**

III.3.3.2.1. Acide ascorbique (vitamine C) ……**page 25**

III.3.3.2.2. Tocophérols (dont la vitamine E) ……**page 25**

III.3.3.2.3. Caroténoïdes ……**page 25**

III.3.3.2.4. Sélénium……**....page 26**

III.3.3.2.5. Polyphénols ……**...page 26**

Deuxième partie : Matériels et méthodes

I. Matériel……...page 27

I.1. Matériel biologique……**…...page 27**

I.2. Matériel non biologique…….. **page 27**

I.2.1. Appareillage…….. **page 27**

I.2.2. Produits utilisés **…… page 28**

II. Méthode…… page 28

II.1. Préparation de milieu de culture ……**page 28**

II.2. Vérification de la culture d*'Arthrospira platensis*……**.....page 30**

II.2.1 Examen microscopique……**.page 30**

II.2.1.1. Examen à l'état frais……**.page 30**

II.2.2. Préparation de l'inoculum (culture de spiruline)……**...page 30**

II.2.2.1. Filtration de spiruline (culture jeune)……**page 30**

II.2.2.2. La mise en évidence des contaminants bactériens par coloration gram…… **page 31**

II.2.2.3. Culture de spiruline sur milieu solide……**page 32**

II.3. Isolement de spiruline en culture pure……**.page 33**

II.3.1.Traitement par bicarbonate……**page 33**

II.3.2. Isolement sur boite de pétrie…….**page 34**

II.4. Caractérisation générale de spiruline……....**page 34**

II.4.1. Caractéristiques physico-chimiques……..**page 34**

II.4.1.1. La cinétique de croissance……**…..page 34**

II.4.1.1.1. Détermination de poids sec de spiruline et la courbe d'étalon……**…page 34**

II.4.1.1.2. Contrôle de l'évolution de biomasse……...**page 35**

II.4.1.1.3. Calcul des paramètres cinétiques……**page 35**

II.4.1.2. Détermination de la teneur en humidité……**.... page 35**

II.4.1.3. Détermination le taux de cendre……**page 36**

II.4.1.4. Détermination de la teneur en chlorophylles……..**page 36**

II.4.1.5. Détermination de la teneur en phycocyanine……**page 37**

II.4.1.6. Extraction des composés phénoliques……**page 37**

II.4.1.7. Le rendement d'extraction…… **page 38**

II.4.1.8. Dosage des polyphénols selon la méthode de Folin Ciocalteu……. **page 39**

II.4.2. Caractéristiques biologiques…… **page 39**

II.4.2.1. La mise en évidence de l'activité antibactérienne…… **page 39**

II.4.2.1.1. Test de l'activité antibactérienne……....**Page 39**

II.4.2.1.2. Préparation des dilutions des extraits…… **page 40**

II.4.2.1.3. La Lecture……. **page 40**

II.4.2.2. Détermination d'activité antioxydante par test au DPPH……**page 41**

III. Analyse statistique……....**page 42**

Troisième partie : Résultats et discussion

I. Résultat et discussion……... page 43

I.1. Vérification de la culture d*'Arthrospira platensis*..... **..page 43**

I.1.1. Examen microscopique…… **.page 43**

I.1.1.1 Examen à l'état frais……**page 43**

I.1.1.2. Coloration de Gram de spiruline……**page 43**

I.1.1.3. Culture de spiruline sur milieu solide……. **page 44**

I.2.Isolement de spiruline en culture pure……... **page 45**

I.3. Caractéristiques générale de spiruline…….. **page 46**

I.3.1. Caractéristiques physico-chimiques…….. **page 46**

I.3.1.1. cinétique de croissance……**.... page 46**

I.3.1.1.1. Détermination de Poids sec de spiruline et le courbe d'étalon…….. **.page 46**

I.3.1.1.2. Le suivit de l'évolution de biomasse de spiruline……**page 47**

I.3.1.2.Détermination de la teneur en humidité……..**page 48**

I.3.1.3. Détermination le taux de cendre…… **page 48**

I.3.1.4. Les teneurs en pigements de spiruline……**...page 49**

I.3.1.4.1. La teneur en chlorophylle……**page 49**

I.3.1.4.2. Détermination de la teneur en phycocyanine…….**.....page 50**

I.3.1.5. Extraction des polyphénols……**..page 51**

I.3.1.6. Le rendement d'extraction des polyphénols…….**.....page 52**

I.3.1.7. Dosage des polyphénols selon la méthode de Folin Ciocalteu……**....page 52**

I.3.2. Activités biologiques de spiruline……..**page 53**

I.3.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne…….**.....page 53**

I.3.2.2. Détermination d'activité antioxydante par test au DPPH…….. **page 57**

Conclusion…….... **page 61**

Introduction générale

Introduction

Parmi les milliers espèces d'algues de notre planète, on peut distinguer une algue bleue microscopique, apparue avec les premiers êtres vivants il y a environ 3,5 milliards d'années et considérées comme l'aliment naturel le plus complet, il s'agit de la Cyanobactérie *Arthrospira platensis*, plus connue sous le nom de Spiruline **(CRUCHOT., 2008).**

La spiruline a été utilisée traditionnellement de puis plusieurs de centaines d'années par certaines populations primitives d'Afrique et du Mexique **(FARRAR, 1966)** et connue depuis les années soixante pour ses propriétés alimentaires (sa richesse en polyphénols, protéines, bêta-carotène, en fer, en vitamine B12, et en acides gras) **(SALL et al.,1999 ; Al-HOMAIDAN et al., 2013).**

La spiruline a attiré l'attention des chercheurs depuis de nombreuses années, leur potentiel bénéfique a été expérimentalement prouvé in vitro et in vivo pour traiter certaines pathologies et dans la prévention de l'hypercholestérolémie, certaines maladies inflammatoires, les allergies, le cancer, la toxicité induite par le médicament, les infections virales, les maladies cardiovasculaires et le diabète …etc **(KHAN et al., 2005 ; KULSHRESHTHA et al., 2008 ; KARKOS et al., 2008).**

Le genre Arthrospira se développe naturellement dans les eaux alcalines de certains lacs en zones tropicales et subtropicales **(FOX., 1999).** Pour couvrir la demande croissante, la spiruline doit être produite en grande quantité dans des bassins de culture en milieu synthétique tel que le milieu Zarrouk. Elle se présente généralement sous forme de trichome bleu-vert, mobile, enroulé régulièrement en spires larges et très ouvertes **(PELMONT.,1995).**

Elles se développent le plus souvent sous forme de colonies gélatineuses et le mucus qu'elles secrètent abrite une flore bactérienne importante. Il en résulte une certaine difficulté à isoler des souches axéniques **(ORSTOM. ,1977).**

Une grande partie des recherches actuelles sur la spiruline porte sur l'isolement de cette dernière dans une culture axénique et l'élimination totale des contaminants qui représente des contraintes au cours de croissance d'*Arthrospira platensis* afin de la rendra pure et la consommer en toute sécurité sanitaire.

Il a semblé donc intéressant de faire des recherches pour prendre une solution vis-à-vis de ce problème.

Le but de cette étude est d'atteindre une culture de spiruline ne contient aucun contaminant, et de déterminer leurs caractéristiques physicochimiques et tester leur activité antibactérienne et anti-oxydante.

La mise en évidence de spiruline dans une culture axénique vise à jouer sur les points faibles de multiplication des contaminants dans le même milieu qu'*Arthrospira platensis*

Par l'augmentation des concentrations de bicarbonate dans un milieu liquide.

Notre étude sera répartie en trois parties :

Dans la première partie nous avons commencé par une synthèse bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre une généralité sur *Arthrospira platensis* consiste à présenter la spiruline et ses aspects thérapeutique, toxicologique et biotechnologique. Dans le deuxième chapitre traite le problème des contaminants de la spiruline et les étapes de leur purification. Dans le troisième chapitre présente l'activité antibactérienne et antioxydante.

La deuxième partie consacre les matériels expérimentaux et les différentes méthodes utilisées pour réaliser cette étude.

Dans la troisième partie nous avons présenté les résultats obtenus et leurs discussions, puis nous avons terminé par une conclusion générale.

Première partie
Synthèse bibliographique

I.1. Présentation de spiruline

I.1.1. Définition

La spiruline est une algue bleue microscopique, unicellulaire appartient à la famille des cyanobactéries ou cyanophycées qui sont des micro-organismes aquatiques présentent à la fois des caractéristiques provenant des bactéries et des algues, qui sont des espèces proliférées naturellement dans les eaux alcalines et riches en sels. Ce groupe comprend l'ensemble des bactéries autotrophes (capables d'utiliser l'énergie de la lumière pour la photosynthèse) (**OULD BELLAHCEN et al., 2013),** et sont pourvues de chlorophylle, dont le nom scientifique de ses micro-algues est « *Arthrospira platensis* » **(JOURDEN., 2006)**.

La spiruline est considérée comme une source alimentaire de haute qualité nutritive, en raison notamment de sa haute digestibilité et de sa teneur élevée en protéines (70%) et particulièrement en phycocyanine qu'elle contient et qui prend une couleur verte avec la photosynthèse **(FOX., 1994).**

I.1 .2. Historique

Les cyanobactéries ont déjà été détectées avant 3,5 milliards d'années, elle produisit le premier oxygène respirable par les organismes **(SGUERA., 2008)**. La spiruline longtemps considérée comme une algue bleue (cyanophycée) est en réalité une cyanobactérie décrite pour la première fois par Wittrock et Nordsted en 1844 sous le nom de *Spirulina* **(BENSEHAILA., 2016).**

L'histoire de la spiruline au vingtième siècle est liée à Christopher Hill. Cet Américain s'aperçut que la spiruline offrait une solution extraordinaire aux problèmes nutritionnels de notre temps et facile à « cultiver », puisqu'elle pousse toute seule dès qu'il y a un peu d'eau et de soleil, la spiruline représente l'un des aliments les plus fabuleux qui existent sur terre **(SGUERA., 2008 ; BENSEHAILA., 2016).**

En1940, l'ethnologue- cinéaste Brandily signale à son tour l'existence d'une population se nourrissant des algues depuis les temps plus anciens et résistant à plusieurs maladies tropicales et surtout à la malnutrition. Il s'agit des kanembous vivant au Nord du Tchad. Encore aujourd'hui, ils utilisent pour sa récolte et sa conservation des méthodes très rudimentaires (**STANIER., 1974)**.

Après plusieurs recherches et identifications, il s'est avéré que cette algue est une cyanophycée filamenteuse : son nom le plus usuel est « spiruline », son nom scientifique est « *Arthrospira plantesis* ». Ces algues qui s'accumulent à la surface des mares sont recueillies dans de simples paniers de vannerie puis séchée sur le sable au soleil. Elles servent ensuite à la fabrication des galettes de « Dihé », faciles à conserver et dont une partie est vendue en particulier aux Touaregs voisins dont l'alimentation est souvent déficiente. En remontant à des temps encore plus anciens, on a découvert la spiruline dans la ration alimentaire des Aztèques du Mexique. (**SGUERA., 2008)**

En 1960 une claire distinction entre procaryote et eucaryote a été définie, basée sur la différence d'organisation cellulaire : les procaryotes regroupent les organismes dépourvus de compartiment cellulaire tandis que les eucaryotes regroupent ceux qui possèdent des organelles c'est à dire des nucléoles et des mitochondries. En **1962, STANIER et Van Niel** constataient que cette algue bleu-verte était dépourvue de compartiments cellulaires, et donc faisait partie des procaryotes ; ils proposaient de désigner ce microorganisme «Cyanobactérie». Cette nouvelle désignation est finalement acceptée et figure pour la première fois au «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology en 1974» (**STANIER., 1974).**

I.1.3. Distribution géographique dans le monde

Les cyanobactéries filamenteuses sont répertoriées dans la plupart des habitats, elles sont présentes dans tous les pays du monde et en tous lieux, aussi bien dans les milieux aquatiques que dans les milieux désertiques **(BOUDOUR., 2008).**

La spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales. Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud.



Figure 1: Zone de croissance naturelle de la Spiruline dans le monde **(FOX., 1999)**

Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). Cet organisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe **(BENSEHAILA., 2016).**

I.1.4. Caractéristiques structurales

La spiruline a une longueur moyenne de 250 µm quand elle possède 7 spires. Elle est composée de filaments mobiles (de 10 à 12 µm de diamètre) non ramifiés et enroulés en spirales, qui ressemble à un minuscule ressort à boudin, d'où le nom de « Spiruline » **(BOUDOUR., 2008).**

La spiruline est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament ou trichome. Les facteurs environnementaux tels la température aurait cependant une influence sur l'orientation de l'hélice. Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis **(BENSEHAILA., 2016).** Cependant les spirulines présentent différentes formes ; des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites. Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat **(CHARPY et al.,2008)**

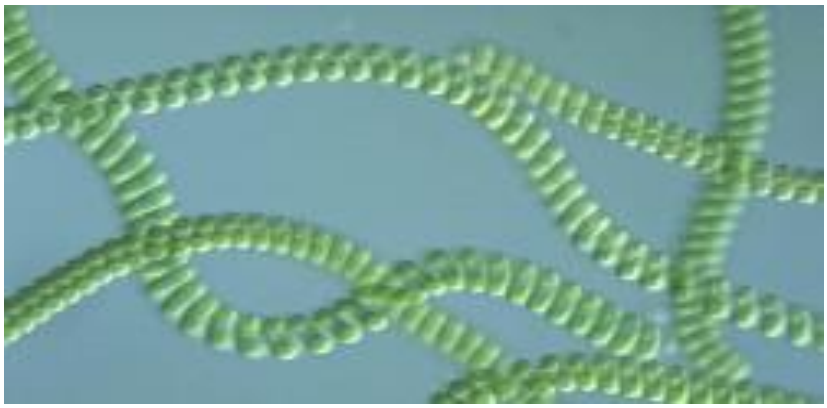


Figure 2 : Morphologie typique d'*Arthrospira platensis* sous microscope

(CHARPY et al. ,2008)

I.1.5. Taxonomie d'*Arthrospira platensis*

La spiruline est une cyanobactérie (anciennement désignée par le terme « algue bleue » puis cyanophycée). Elle est classé selon **(FOX., 1999)** dans :

Règne : Monera

Sous Règne : Procaryota

phylum : Cyanophyta

Classe : Cyanophyceae

Ordre : Nostocales

Famille : Oscillatoriaceae

Genre : Arthrospira

Espèce : *Arthrospira platensis*

I.1.6. Croissance

Grâce à ses pigments chlorophylliens, la spiruline est une espèce photoautolitotrophe aérobie, dont la photosynthèse constituant la clé de sa croissance, la spiruline a besoin d'eau, de carbone, et d'éléments nutritifs dont l'azote en particulier. Elle assimile une source de carbone minéral (le CO2 atmosphérique) et la convertit en énergie biochimiquement utilisable représentée par le glucose. La photosynthèse est divisée en deux phases : une série de réactions dites "lumineuses" et une série de réactions dites "obscures" **(CRUCHOT., 2008).**

Les réactions lumineuses : nécessitent la présence de lumière et s'effectuent dans les membranes thylakoïdiennes.

Les réactions obscures ont lieu dans le stroma (matrice) du thylakoïde qui ne nécessitent pas de lumière **(CRUCHOT., 2008).**

I.1.7. Déplacement

La spiruline utilise deux types de déplacement :

I.1.7.1. Flottabilité

Spécialement intéressante sont les vésicules de gaz gonflables qui peuvent faire monter les filaments dans la colonne d'eau pour atteindre la lumière pour la photosynthèse. Ces vésicules sont des tubes creux cylindriques avec des capuchons coniques à chaque extrémité, ordinairement d'environ 70nm de long et d'environ 10 nm de diamètre. Elles se trouvent habituellement près de parois terminales des cellules en groupes empilés avec ordre de juste quelques-unes à plus centaine, elles apparaissent au microscope optique comme des taches brillantes. La membrane de ces vésicules est seulement d'environ 2,8nm d'épaisseur.

La photosynthèse augmente la pression interne et cela dégonfle les vésicules de gaz, envoyant des filaments d'algue au fond (quand la lumière du jour s'éteint ou avant). La limitation en CO_2 augmente la flottabilité ; la production d'hydrates de carbone diminue la flottabilité **(FOX.,1999).**

I.1.7.2. Motilité

Les filaments d'Arthrospira sont motiles, se déplaçant sauvent par des mouvements en vrilles à plus de 5µ par seconde. Le mouvement ondulatoire de fimbrias (de 2à10nm de diamètre) peuvent propulses le filament en avant, Si ces fimbrias, au lieu de s'aplatir, étaient positionnées plus ou moins à angle droit par rapport à l'axe long du filament, elles pourraient, par un mouvement serré mouvoir le filament, et en renversant la direction de ce petit mouvement circulaire, faire avancer le filament dans la direction opposée **(FOX., 1999)**.Ces deux méthodes de locomotion permettent à la spiruline de se protéger elle-même contre une overdose mortelle de soleil. Les mouvements de circulation de bas en haut puis de haut en bas lui permettent d'absorber la juste quantité de lumière dont elle a besoin **(CRUCHOT., 2008).**

I.1.8. Cycle de vie de spiruline

Le filament de spiruline à la maturité forme des cellules spéciales appelées nécridies. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies **(Figure 2)**. Les hormogonies vont croître en longueur par division binaire (chacune des cellules va donner deux cellules par scissiparité) et prendre la forme typique hélicoïdale. En conditions expérimentales, le temps de génération maximal de la spiruline est de l'ordre de 7 heures **(BENSEHAILA., 2016).**

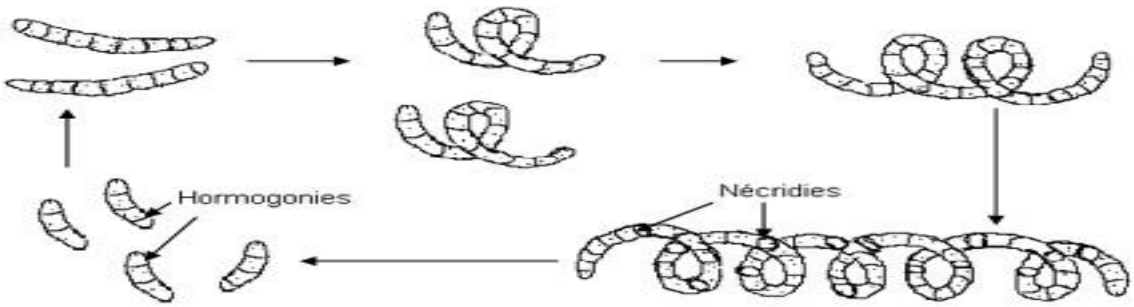


Figure 3 : cycle de vie de la spiruline **(CHARPY et al., 2008)**

I.1.9. Compositions biochimique de spiruline

I.1.9.1. Les protéines et les acides aminés

La teneur en protéines de la spiruline est élevée, elle représente 10 à 11% de la masse humide, soit 60 à 70% de sa matière sèche. Ce pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (35%) et des céréales (14%). La spiruline est très riche en matières azotées et en contient deux fois plus que le soja, trois fois plus que la viande ou le poisson **(CRUCHOT., 2008 ; FOX., 1999)**.

Les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels y figurent, ils représentent 47% du poids total des protéines **(BENSEHAILA., 2016).**

I.1.9.2. Les lipides

I.1.9.2.1. Lipides totaux

En totalité les lipides représentent moins de 10% du poids sec, Ces lipides totaux peuvent être séparés en une fraction saponifiable (83%) et une fraction insaponifiable (17%) contenant essentiellement des paraffines, des pigments, des alcools terpéniques et des stérols **(CLEMENT.,** 1975**).**

I.1.9.2.2. Acides Gras

Les acides gras essentiels sont des acides gras polyinsaturés classés en deux groupes (oméga-3 et oméga-6), selon la position de l'instauration la plus proche du groupe méthyle terminal. Ceux du groupe oméga-3 jouent un rôle préventif sur les risques cardiovasculaires, tandis que les acides gras oméga-6 ont un rôle hypocholestérolémiant **(CRUCHOT., 2008**).

I.1.9.3. Les glucides

Les glucides représentent entre 15 et 25% de la matière sèche. Les glucides simples sont en très faible quantité (glucose, fructose et le saccharose), l'essentiel des glucides assimilables est constitué de polymères tels que les Glucosanes aminés (1.9% du poids sec), les Rhamnosannes aminés (9.7%) et Glycogène (0.5%) **(QUILLET., 1975)** Du point de vue nutritionnel, la seule substance glucidique intéressante par sa quantité chez *Arthrospira* est le méso- inositol phosphate qui constitue une excellente source de phosphore organique ainsi que d'inositol(350- 850 mg/kg de matière sèche). Les polysaccharides présentent de multiples intérêts thérapeutiques, notamment dans la stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN, dans son effet radio-protecteur et dans la neutralisation des radicaux libres **(BOUDOUR., 2008).**

I.1.9.4. Acide nucléique

Les acides nucléiques représentent de 4 à 6% de la matière sèche. La proportion d'ADN serait d'un quart à un tiers par rapport à l'ARN. La teneur en acides nucléiques de *Arthrospira* est très inférieure à celle de la généralité des unicellulaires **(CIFFERI., 1983).**

I.1.9.5. Les vitamines

La spiruline contient une large gamme de vitamines liposolubles et hydrosolubles :

I.1.9.5.1. Les vitamines liposolubles

Bêta-carotène (provitamine A) : Le bêta-carotène représente 80% des caroténoïdes de la spiruline. Celui-ci est particulièrement bio- disponible et son rôle dans la lutte contre les radicaux

libres, la cécité par avitaminose A (symptôme de la tache de Bitot), certains types de cancers **(BENSEHAILA., 2016).**

Tocophérols (vitamine E) : de 50 à 190 mg par kg, soit autant que le germe de blé. Les propriétés anti-oxydantes de la vitamine E renforcent l'effet anti-âge du bêta-carotène **(BENSEHAILA., 2016).**

I.1.9.5.2. Les vitamines hydrosolubles :

Vitamines du groupe B: la spiruline est une excellente source de vitamines à multiples actions : rôle dans le métabolisme des glucides, lipides et protides, dans le métabolisme des hormones, dans la transmission de l'influx nerveux et le mécanisme de la respiration. Elles sont indispensables à la croissance, à la production d'énergie et au bon fonctionnement du système immunitaire.

La vitamine B9 ou acide folique : est anti-anémiante et anti-cancérigène, et stimule la croissance du système nerveux et de la moelle osseuse.

La vitamine B1 ou thiamine : est anti-stress.

La Vitamine B12 : La spiruline est la seule source végétale connue de cette vitamine. Ce qui rend la spiruline particulièrement intéressante dans le cas de l'alimentation des personnes âgées dénutries, des anorexiques ou des végétariens stricts **(BENSEHAILA., 2016).**

I.1.9.6. Minéraux et oligo-éléments

Les plus intéressants sont le fer, le magnésium, le calcium, le phosphore et le potassium. La présence de fer bio-disponible est à souligner, le fer présent dans les autres végétaux n'étant pas assimilable par l'homme. On doit noter également la présence de sélénium et de fluor, aux effets positifs certains (lutte contre les radicaux libres, prévention de la carie dentaire) **(GIRARDIN-ANDREANI.,2011).**

I.1.9.7. Pigments

I.1.9.7.1. La phycocyanine : vient du grec phyco signifiant algue et cyanine venant de la couleur cyan, et signifie bleu-vert, elle n'a pas d'odeur particulière et elle est non toxique et légèrement sucrée (15). C'est un pigment assez rare dans la nature qui absorbe la lumière dans une longueur de 610 à650 nanomètres. Elle est représentée a environ à hauteur de 10 à 11% en moyenne dans

la spiruline. Appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses recherches sont en cours pour connaitre toutes ses propriétés. Sa structure particulière lui confère des propriétés antioxydantes, antiradicalaires et détoxifiantes. La phycocyanine stimulerait également la production des globules rouges et des globules blancs **(BENSEHAILA., 2016).**

I.1.9.7.2. La chlorophylle : est un pigment essentiel de la photosynthèse puisqu'elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique. Constituée d'un atome de magnésium en son centre, la chlorophylle est parfois comparée à l'hémoglobine qui possède quant à elle un atome de fer.

La spiruline en contient environ 1%, ce qui stimulerait les fonctions de presque tous les organes **(BENSEHAILA., 2016).**

I.1.9.7.3. Les caroténoïdes : sont des pigments non azotés dont la coloration varie du jaune au rouge, La plupart des caroténoïdes sont des provitamines A indispensables aux hommes et aux animaux.

La spiruline en contient entre 20 et 25 fois plus que les carottes. La béta carotène représente 80% des caroténoïdes présents. Les caroténoïdes ont une action anti radicalaire. Ils participent également à la croissance et au développement de l'individu, ainsi qu'au maintien de la vision nocturne **(BENSEHAILA., 2016).**

I.2. L'aspect thérapeutique, toxicologique et biotechnologique de la spiruline

I.2.1. Aspects thérapeutiques

I.2.1.1. Effet hypocholestérolémiant

C'est la richesse de la composition de la spiruline qui lui procure un effet hypolipémiant :

-la phycocyanine augmente la réabsorption des acides biliaires au niveau de l'iléon (**DUPIRE., 2011)**

-les caroténoïdes, l'acide γ-linolénique, les fibres et stérols font diminuer l'absorption jéjunale et iléale du cholestérol (**DUPIRE., 2011**).

Sur les essais réalisés sur l'homme, on a remarqué qu'un régime régulier à la Spiruline de 4,2 g/jour pendant 4 semaines engendrait une diminution du LDL-cholestérol et une baisse significative de dépôts graisseux dans les artères **(SGUERA., 2008)**.

Les acides gras essentiels (AGE) diminue l'agglomération des plaquettes sanguines et de fait diminuent le risque d'artériosclérose (durcissement des artères) et de thrombose coronarienne **(HORROBIN., 1990)**.

I.2.1.2. Effet préventif contre le cancer

Certaines formes communes de cancers sont le résultat d'un ADN cellulaire endommagé, provoquant une croissance cellulaire anarchique (**SGUERA.,2008)**.

La spiruline peut apporter un effet anticancéreux (préventif ou curatif) par sa composition :

- En polysaccharides qui améliorent l'activité enzymatique des endonucléases, enzymes réparatrices des dommages de l'ADN pouvant aboutir à des cancers.

- En calcium-spirulan (Ca-SP), un polysaccharide dont l'administration intravasculaire(IV) de 100 mg a montré une diminution des métastases pulmonaires sur des cellules colonisées par des tumeurs pulmonaires **(ISMAIL et al., 2009).**

En phycocyanine C qui a été étudiée dans la chimio prévention du cancer du côlon chez le rat **(SAINI, SANYAL., 2014).**

I.2.1.3. Renforcement du système immunitaire

La spiruline stimule le système immunitaire (thymus) et augmente la production de nouvelles cellules sanguines, améliore l'activité phagocytaire des macrophages et accélère la production du système humoral (anticorps et cytokines) **(HOUSTON., 2002).**

Et sur des cellules humaines in vitro, il a été démontré une augmentation de la sécrétion des interleukines IL-1 et IL-4, de l'interféron-γ par la phycocyanine ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules NK, pouvant ainsi aider à lutter contre des pathogènes **(PARK et al., 2008).**

I.2.1.4. Activité antivirale

La spiruline empêche la pénétration du virus dans la membrane cellulaire qui ne peut donc plus se répliquer. Le virus reste dans la circulation extracellulaire et est éliminé par les défenses

immunitaires. De plus, une étude comparative entre le Ca-spirulan et le sulfate de dextrane, un anti-HIV connu, a montré in vitro une activité 4 à 5 fois plus élevée pour le Ca-spirulan car il cible l'absorption, la pénétration et certaines étapes de la réplication. Le Ca-Sp montre une activité anti-HIV et anti-HSV-1 **(HAYASHI et al., 1996).**

Les sulfolipides dans les Oscillatoria marines empêchent la réplication du virus HIV-1 in vitro. La spiruline est riche en sulfolipides (environ 25%du contenu lipidique) **(GUSTAFSON et al.,1989).**

I.2.1.5. Effet antihypertenseur

Des études in vitro montrent que la phycocyanine agit de plusieurs façons pour diminuer la tension artérielle **(ICHIMURA et al., 2013).**

Les AGE inhibent l'hypertension causée par le sel ; donc, une augmentation en AGE, plutôt que de dépendre uniquement de la restriction sodée, est indiquée dans le traitement de l'hypertension (**HORROBIN., 1990)**

I.2.1.6. Antioxydant

La prise de compléments alimentaires riches en antioxydants tels que la spiruline qui contient de nombreux systèmes antioxydants (enzymes : SOD, phycocyanine, acide γ-linolénique, β-carotène et vitamine E) peut être bénéfique 1 kg de spiruline contient autant d'antioxydants qu'une tonne de fruits **(PARK et al., 2008).**

La phycocyanine est un puissant inhibiteur de la NADPH oxydase or une cuillère à soupe de spiruline (15 g) apporte 100 mg de phycocyanine **(McCARTHY et al., 2010)**

I.2.1.7. Effet chélateur de métaux lourds

La spiruline, C'est grâce à la phycocyanine, au β-carotène et aux flavonoïdes que la spiruline chélate les métaux lourds et en diminuant l'inflammation du foie, elle favorise l'élimination de nombreuses toxines, métaux lourds, xénobiotiques, alcool et tabac **(MISBAHUDDIN et al., 2006).**

I.2.1.8. Effet hypoglycémiant et contre l'obésité

La fraction soluble dans l'eau de la Spiruline a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum (**TAKAI., 1991).** Une supplémentation en Spiruline de 2,8 g 3 fois par jour pendant 4 semaines entraînait une réduction du poids corporel chez les obèses **(BECKER., 1986).**

I.2.1.9. Aide contre la malnutrition

Kwashiorkor et marasme traités avec le régime habituel plus une cuillère à soupe de poudre de spiruline, après 15 jours pas de gain de poids, mais la peau est ferme, les œdèmes ont disparu, et l'appétit et revenu ; pas de vomissement comme c'est souvent le cas en rénutrition ; aucune problème d'acceptabilité **(BROUILLA., 1993).**

I.2.2. Aspects toxicologiques

A l'issue des nombreuses études menées par des chercheurs spécialisés dans le domaine des cyanobactéries, il ressort que la spiruline (genre Arthrospira) n'est pas toxique, contrairement à la plupart des autres cyanobactéries, par ce qu'elle ne possédant pas les gènes assurant la synthèse des toxines **(CRUCHOT., 2008).**

La spiruline destinée à l'alimentation humaine a été autorisée à la vente depuis de nombreuses années dans les pays industrialisés. Aux Etats-Unis, la spiruline est classée "GRAS" (Generally Recognizer As Safe) par la Food and Drug Administration (FDA) **(CRUCHOT., 2008).**

La forte capacité de la spiruline à fixer certains polycations (cadmium, plomb, chrome, cuivre) nécessite d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à la consommation humaine. Les métaux lourds présents dans les milieux de culture de spiruline pourraient aussi constituer un risque de toxicité si leur teneur venait à dépasser un certain taux **(CRUCHOT., 2008).**

I.2.3. Aspect biotechnologique

I.2.3.1. Le milieu de culture

Dans le cas de spiruline, la croissance optimale est obtenue pour une température de 34°à40°C, avec une population dense, un ensoleillement généreux, un pH de 8,5 à 10,5(moyenne 9,5) ; les éléments nutritifs essentiels doivent être en quantité suffisante. Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduit à une photolyse, et une forte intensité lumineuse avec une forte agitation donne la croissance optimale **(FOX., 1999).**

Le milieu de culture contient des engrais pour assurer la croissance des spirulines : l'azote, le phosphore, le potassium sont les éléments classiques, mais le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau, le sel et les engrais. Une analyse préparatoire de l'eau et du sel est utile pour calculer la dose de Mg, Ca et Fer à ajouter car un excès de ces éléments est nocif (**BOUDOUR., 2008).**

Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite à respecter impérativement, c'est pourquoi lors de la préparation du milieu de culture, utiliser un nitrate que l'on peut mettre à forte dose, constituant une réserve d'azote à long terme **(BOUDOUR., 2008),** La source la plus facile à employer est le nitrate, de sodium ou de potassium ($NaNO_3$ OU KNO_3) (**FOX., 1999).**

I.2.3.2. La production de spiruline

I.2.3.2.1. Production artisanale

Les fermes artisanales de Spiruline sont des systèmes d'exploitation nécessitant un faible apport en énergie. La surface des bassins est très variable, n'excédant pas la centaine de m^2 pour une surface totale inférieure à 3000 m^2 **(CHARPY et al., 2008).**

I.2.3.2.1.1. Méthode de production artisanale

Mise en route d'une culture

Pour lancer une production artisanale de Spiruline il faut de l'eau contenant des nutriments, du soleil et une température entre 25 et 40°C. Pour la mettre en place et en assurer le suivi, il faut avoir fait le bon choix du site et des matériaux de construction, disposer de quelques instruments de laboratoire (balance, loupe ou microscope), de quelques outils simples à réaliser, d'intrants (engrais) et d'une souche de Spiruline robuste. Les bassins peuvent être construits en dur, en argile, en bâche plastique.

Actuellement la taille minimum recommandée pour un bassin est de 60m² et sont remplis d'eau à un niveau atteignant 15 à 20 cm. Le milieu de culture est basé sur celui de Zarrouk (1966), modifié la plupart du temps en fonction des disponibilités des intrants. L'agitation des bassins se fait de plus en plus avec une roue à aube ou une pompe excepté **(CHARPY et al., 2008).**

Récolte et extrusion

Dans les bonnes conditions il est possible de récolter chaque jour 1/6 à 1/3 de la culture ; La culture est filtrée à travers deux dispositifs, en général superposés, Le premier est constitué d'une toile fine (maillage environ 300 µm de vide) qui retient les grumeaux, insectes, larves et feuilles. Le second est un tissu à mailles plus fines (environ 30 µm) qui retient la Spiruline **(CHARPY et al., 2008).**

La biomasse humide est pressée, la Spiruline fraîche ainsi obtenue peut-être consommée directement, ou séchée pour la conservation **(CHARPY et al., 2008).**

Séchage et conditionnement

La biomasse est extrudée en spaghettis afin de pouvoir la sécher plus facilement. Elle est mise à sécher dans des séchoirs solaires, à gaz ou électriques. Le séchage dans un four jusqu'à 60°C semble ne pas modifier de façon notable les propriétés de la Spiruline. La Spiruline sèche est alors broyée sous forme de poudre et conservée dans un récipient étanche à l'abri de l'humidité et de la lumière. La Spiruline peut être conditionnée dans des sachets, boîtes ou flacons sous de poudre, de gélules et de comprimés **(CHARPY et al., 2008).**

I.2.3.2.2. Production semi-industrielle et industrielle

Les fermes semi-industrielles sont des systèmes de production qui peuvent être modulaires et démarrer à partir de petites exploitations de type artisanal. Ces fermes sont constituées de bassins de 200 à 1000 m² avec une surface totale exploitée entre 3000 m^2 et 1 hectare. Leur capacité de production annuelle est de10 à 50 tonnes **(AYALA et al.,2006).**

Une exploitation industrielle, d'une surface totale de plusieurs hectares, peut produire entre 50 et 500 tonnes de Spiruline sèche par an. Les bassins ont une surface de 1000 à 5000 m^2 **(CHARPY et al., 2008).**

II.1. Introduction

Une culture de micro-organismes en plein d'air est facilement envahie par d'autre micro-organismes apportés soit par l'eau, soit par l'air un organisme fixé sur des poussières amenées par le vent, insectes, mains et pieds du personnel, excréments d'insectes ou d'oiseaux, etc… Les mêmes contaminations affectent bien sûr aussi la culture de spiruline **(FOX., 1999).**

Parmi les contaminants les plus fréquents dans une culture de spiruline, on peut citer :

II.2. Bactéries

De nombreuses variétés de bactéries son couramment trouvées dans les cultures de spiruline, Ce sont surtout des bacilles ou en forme de bâton, aérobie, formant des spores, gram-négatifs.

On trouve aussi de *Spirullum* est une petite bactérie en tire-bouchon et très mobile, une seule espèce de ce genre est pathogène, elle vit dans l'intestin de rats infectés (*Spirillum minus*). Il n'y a pas à craindre que cette espèce se trouve dans une culture de spiruline, le *spirillum minus* ne peut vivre dans une eau à forte salinité et pH élevé **(FOX., 1999)**.

Dans une culture de spiruline, à forte salinité et pH élevé, On remarque parfois la présence de bactéries sulfureuses pourpres –en particulier au bord des lacs naturels à spiruline, là où le vent et les vagues ont poussé la spiruline sur la rive ou elle a péri faute d'eau et d'élément nutritifs **(FOX., 1999)**, La plupart des pathogènes ne survivent pas longtemps hors de leurs hôtes, Certains peut survivre quelques mois dans les eaux naturelles, dont la plupart croissent dans la plage de pH allant de 4-7.6. La spécificité des cultures de spiruline est se situer entre 9.5 et 10.5 de pH. **(FOX., 1999).**

Malgré un pH élevé dans les bassins de culture (>10) qui est hostile à de nombreuses bactéries, des contaminations bactériennes ont déjà été retrouvées : salmonelle ; entérocoques (provenant probablement de matières fécales d'animaux). En effet, le milieu de culture est optimal pour *Pseudomonas sp* mais aussi salmonelle, shigelle, entérovirus et entéropathogène (*E. coli, Leptospira*) même si ces bactéries seraient détruites lors du séchage. Il est important de contrôler la qualité des eaux de culture mais aussi de procéder à des règles d'hygiène strictes – port de gants, charlottes, lavage de mains et du matériel. **(MANET.,2016)**

Les spores

L'activation des spores de bactéries est inhibée par un pH élevée (8,5 et plus), de sorte que les spores ne se développent pas sous forme végétative dans une culture de spiruline.

La plupart des spores germent mieux près de la neutralité, bien que certaines espèces puissent germer à un pH de 10-11 (*B. pasteurii, B cereus, B.circulans* et *B.megatherium*)**(FOX., 1999).**

Tableau I : Bactéries vivants avec la spiruline et pathogènes pour l'homme, et leur pH optimal de croissance **(FOX.,1999)**

Bactéries	**Habitat**	pH
Pseudomonas aeruginosa	Trouvée dans l'eau polluée et les égouts	8.0
Vibrio cholera	Trouvé dans l'intestin des malades du choléra et les porteurs ; dans les eaux d'égouts	7.6-8.0
Escherichia coli	Habitat normal de l'intestin de l'homme se trouve dans les égouts	6.0-8.0
Salmonella typhosa	Trouvée dans l'eau contaminée (égout) et les nourritures contaminées	6.0-7.5
Staphylococcus aureus	Trouvé sur la peau et les muqueuses et dans les blessures (Le produit algal peut être contaminé par contact par le producteur)	6.8-7.5
Clostridium perfringens	Trouvé dans les fèces, le lait, le sol, les égouts	6.0-7.6
Pasteurella tularensis	Trouvée dans le sang de l'homme et de l'animal infecté et dans l'eau à boire contaminée	7
Streptococcus	Trouvé dans l'eau de réseau distribution L'eau mal traité	9.3

Tableau II : normes imposée en France pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries (**CRUCHOT., 2008)**

Bactéries	Norme admise Sur produit frais ou sec

Germes aérobies (30°C)	≤ 100.000/g
Coliformes fécaux (44,5°C)	≤ 10/g
Anaérobies sulfito-réducteur (46°C)	≤ 100/g
Clostridium perfringens	≤ 1/g
Salmonella	Absence (dans 25g)
Staphylococcus aureus	≤ 100/g

II.3. Les méthodes de purification de spiruline

Pendant les 25 dernières années, après la démonstration claire de la nature procaryotique de ces organisations, un certain nombre de bactériologistes sont devenus intéressés et se sont appliqués des techniques microbiologiques traditionnelles à la purification de cyanobactérie, Mais de nombreux auteurs se sont penchés sur le problème de la purification des groupes principaux de cyanobactérie décrits dans la littérature botanique **(PIERRE et PIERRE., 1977).** La purification des cultures uni-algales est difficile en raison des Bactéries contaminants qui adhèrent à la gaine mucilagineuse des Cyanophycées dans laquelle elles trouvent des substrats carbonés, de l'azote et des vitamines. Pour cette raison on a intérêt à travailler sur de jeunes cultures dans lesquelles il n'y a pas encore eu libération suffisante de composés organiques pour permettre un développement important de la flore bactérienne **(DUERR et al.,1997).**

Les cultures axéniques sont importantes pour les études génétiques, biochimiques, physiologiques et taxonomiques. Cependant, l'utilisation d'*Arthrospira* sp dans des études biochimiques et génétiques a été limitée en raison de la difficulté d'obtenir des cultures axéniques **(VONSHAK., 1997).** L'obtention des cultures axéniques de cyanobactérie *Arthrospira platensis* consiste une série de procédures physiques et chimiques, et l'application d'un pool optimisée d'antibiotiques **(LUCIA et al., 2010)**

Plusieurs méthodes de purification sont proposées, elles sont classées en trois grandes catégories :

II.3.1. Purification par manipulation

II.3.1.1. Repiquages successifs

Avec étalement sur le même milieu gélosé on a pu purifier des formes filamenteuses. Cette méthode de purification consiste à des ensemencements de microalgue pour de dilutions plus forte (10^{-5}-10^{-10}) pour laquelle les microalgues se développent en donnant des colonies les plus espacées possible**. (PIERRE et PIERRE., 1977).** La cyanobactérie filamenteuse motile peut être épuré en transférant les trichomes à de nouveaux boites en leur permettant de glisser à partir des contaminants avant de les transférer à une boite successive. Les petites bactéries hétérotrophes sont fréquemment les contaminants presque invisibles des cultures cyanobactéries, et le succès d'épuration de cyanobactérie exige la diligence **(VAARA et al., 1979).**

Des boites de gélose devraient être examinés tous les jours avec un microscope optique (**MUHLING., 2000)**

II.3.1.2. Lavage par milieu de culture

Il est souvent possible d'enlever certaines des bactéries de contamination par le lavage avec le milieu stérile. Ceci peut faire pour des échantillons contenant les cyanobactérie en lavant à plusieurs reprises les cellules dans un petit appareillage stérile de filtre installé avec un filtre de membrane avec une taille de pore légèrement plus petite que la cellule cyanobactérie **(ANDERSEN., 2005).** À l'aide d'un microscope optique, des échantillons contenant les cyanobactéries filamenteuses peuvent souvent être lavés en sélectionnant différents trichomes qui sont passés par de grandes baisses successives de milieu liquide stérile **(PIERRE et PIERRE., 1977).**

II.3.2. Purification par action d'agents chimiques

II.3.2.1. Produits bactériostatiques ou bactériolytiques

De nombreux traitements ont été essayés avec plus ou moins de succès :
- Milieu de culture sulfuré **(ALLEN., 1952)**

-Acide salicylique du B naphtol **(CASTENHOLZ., 1970)**

- Tellure de Potassium **(DUKER., 1964)**

- Action d'un détergent et d'une solution à 1 %de phénol **(Mc DANIEL., 1962)**

- Hypochlorite de Sodium **(TASSIGNY., 1969)**

II.2.2.2. Antibiotiques

L'action des antibiotiques sur les algues est très variable, elles supportent des concentrations en antibiotiques plus élevées que celles acceptées par les Bactéries et cette propriété a été utilisée pour obtenir des souches axéniques **(HUANG, LIU., 2009 ; LIN et al., 2000)**. ¨Malheureusement l'exception à la règle est constituée par les Cyanophycées et de nombreux essais de purification par cette méthode ont échoué **(TCHAN et al., 1961)**. **PROVASOLI et al., 1951)** .Des résultats plus intéressants ont pu être obtenus en utilisant les antibiotiques associés à une autre méthode de purification :

- gélose profonde **(HAN et al.,2015)**

II.3.3. Purification par action d'agents physiques

II.3.3.1. Température

WIERINGA., (1968) a mis au point une méthode valable uniquement pour les Cyanophycées produisant des akinètes et fondée sur le fait que ces derniers restent viables après exposition de 10 minutes à 70-80°C à l'état humide ou 90°C à l'état sec alors que les bactéries non sporulées ne résistent pas. Des fractions de culture sont placées à l'étuve à température convenable, si des akinètes sont présents et les bactéries sporulées absentes, des cultures pures sont obtenues **(LEE., 2001).**

II.3.3.2. Radiation

Irradiation gamma **(KRAUS., 1966)** utilise les radiations gamma pour la purification des souches de Cyanophycées. Les meilleurs résultats sont obtenus par une irradiation de260 Krads**(RATHSACK.,1968).**

Irradiation aux U.V : cette technique est fondée sur le fait que les Cyanophycées sont généralement moins sensibles à une irradiation U.V. que les Bactéries, la culture à purifier est agitée dans un récipient de quartz placé sous une lampe à U.V. (h = 2 508 A) **(KIM et al., 1999).**

II.3.3.3. Pression

BOWMAN., (1964), utilise le fait que les Algues ont une résistance à la pression supérieure à celle des Bactéries et des Champignons.

III.1. Introduction

Plusieurs milliers de métabolites secondaires (au moins 30000 structures caractérisées) ont été recensé et ils sont classées selon leur appartenance chimique. **(JUDD et al., 2002)** Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique **(BRUNETON ., 1993).**

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en vertus thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires, antimicrobiens (**BRUNETON., 1993).**

III.2.L'activité antibactérienne

L'action antibactérienne va dépendre du microorganisme lui-même, de l'agent antimicrobien et de l'environnement où se situe l'action. On parle d'un effet bactériostatique lorsque la substance antibactérienne empêche la multiplication des bactéries et d'un effet bactéricide lorsqu'elle détruit totalement la bactérie **(MEYER et DEIANA., 1988).**

III.2.1.Caractéristiques des souches bactériennes pathogènes

III.2.1.1.*Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), immobiles et cultivent sur des milieux contenant 7% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%, aérobies ou anaérobies facultatifs. Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme. *Staphylococcus aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, il est responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo…etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérocolites post-antibiotiques), septicémiques **(LECLERC et al. 1995).**

III.2.1.2.*Pseudomonas aeruginosa*

Ce genre appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les Pseudomonas cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, *Pseudomonas*

aeruginosa, l'espèce type, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C. Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées…) **(LECLERC et al., 1995)**.

III.2.1.3.*Escherichia coli*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante, cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents. Elle est trouvée dans l'intestin de l'homme (10^8/g de selles), et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme genre témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments. A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. *Escherichia coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxinogène (turista), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur). D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes **(LECLERC et al., 1995)**.

III.3. L'activité antioxydante

III.3.1. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toute fois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant. **(CHRISTOPHE et CHRISTOPHE., 2011 ; PAPAZIAN et ROCH., 2008)**

III.3.2. Radical libre : est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre» en contenant un ou plusieurs

électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale), cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé **(GOUDABLE et FAVIER., 1997)**.

Radical superoxyde (O_2–), Peroxyde d'hydrogène H_2O_2, Radical hydroxyle OH^* …etc.

III.3.3. Antioxydants et systèmes de défense

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat, cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires **(CANO et al., 2006)**.

III.3.3.1. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge **(MEYER et DEIANA., 1988)**.

III.3.3.1.1. Superoxyde dismutase

Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H2O2) et en oxygène **(LANDIS et TOWER., 2005).**

$$2\ O2^{*-} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} H2O2 + O2$$

Catalase

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes, elle permet de convertir deux molécules de H2O2 en H2O et O2 **(VALKO et al., 2006)**.

$$H2O2 + H2O2 \longrightarrow 2\ H2O + O2$$

III.3.3.1.2. Glutathion peroxydase

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H2O2) **(VALKO et al ., 2006)**.

$$2GSH\ (réduit) + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG\ (oxydé) + 2H_2O$$

$$2GSH\ (réduit) + ROOH \xrightarrow{GPx} GSSG\ (oxydé) + ROH + H_2O$$

III.3.3.2.Les antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes sont présents dans l'alimentation telle que les vitamines A, C, E et les polyphénols, ainsi que le sélénium, le zinc et le manganèse **(BOUGANDOURA., 2010) :**

III.3.3.2.1. Acide ascorbique (vitamine C) : est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène **(FAIN., 2004).** Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène **(CARR et FREI., 1999** ; **CESARINI., 2004).** Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les α-tocophérol. **(GREFF., 2011 ; HALLIWELL et GUTTERIDG., 1986).**

III.3.3.2.2. Tocophérols (dont la vitamine E) : sont des composés liposolubles, ils regroupent quatre substance dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E **(WANG et QUINN., 2006).** Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique **(PRYOR., 2000 ; VALKO et al., 2006)**.

III.3.3.2.3. Caroténoïdes : sont des pigments fabriqués par les végétaux, les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange, rouge et jaune. La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante **(CAUSSE., 2005)**.

III.3.3.2.4. Sélénium : Il neutralise les métaux toxiques en particulier le plomb et le mercure, il aurait aussi une action préventive sur certains cancers **(FAVIER., 2003)**.

III.3.3.2.5. Polyphénols

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est antiradicalaire. **(SOKMEN et al., 2012).** Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres ; l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées **(PORTES., 2008)**.

Deuxième partie
Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans ce travail est l'algue bleue verte : *Arthrospira platensis* appartenant à la classe des cyanobactéries.

La souche a été aimablement fournie en culture dans des flacons de 500 ml, par le laboratoire de faculté des sciences de biologie de l'Université de YAHIA Farès (Médéa) ; Sous des conditions de culture bien précis.

La souche est d'origine algérienne de wilaya de Tamanrasset, a été cultivée dans un milieu de culture enrichi par les éléments minéraux nécessaires à la croissance dans des flacons de 500 ml, maintenues dans des conditions d'éclairement, de température et de débit d'air identiques. Un éclairage permanent est assuré à l'aide d'une lumière blanche par lampe fluorescent. La température est maintenue à une valeur optimale de 32°C (±1°C) à l'aide de thermostats réglables. L'agitation des cultures est assurée par barbotage d'air à l'aide de pompes à air avec un débit de 3L/min.



Figure04: la culture de spiruline dans des condition experimentale.

I.2. Matériel non biologique

I.2.1. Appareillage

L'appareillage il est au niveau de laboratoire de microbiologie, faculté de science, département SNV

- Autoclave (OT O12)
- Bain-marie (memmert)
- Bec bunsen
- Centrifugeuse (-EBA 21 HettichZENTRIFUGEN)
- Etuve (memmert)
- Microscope optique(OPTIKA microscopes)
- Réfrigérateur (LIEBHERR)
- Congélateur(IGNIS)
- Spectrophotomètre (SPECTROPHOTOMETER UV-2005
- Rotavapeur (Stuart)
- Agitateur (AGIMATIC-N)
- Vortex (Agitador XH-B)
- Balance(KERN)
- micropipette 100-1000µl (EASY AOT)
- pH mètre (PH-2005 PH METER)

I.2.2. produits utilisés

a) Produits chimique

Crystal violet, lugol, éthanol, Fushine, méthanol, DMSO, Réactif Folin Ciocalteu, DPPH.

b) Milieux de culture utilisés

-Milieu Zarrouk : utilisé pour la croissance de spiruline.
-Gélose nutritive : utilisé pour la revivification des souches indicatrice pour tester l'activité antimicrobienne de spiruline.

- Milieu Mueller Hinton : utilisé pour tester l'activité antibactérienne de polyphénol de spiruline.

II. Méthode

II.1. Préparation de milieu de culture

Les cultures sont réalisées sur un milieu synthétique décrit par Zarrouk en 1966. Ce milieu contient tous les éléments nutritifs susceptibles d'être consommés par *Arthrospira platensis* à des concentrations bien supérieurs aux besoins de l'algue **(OULD BELLAHCEN al., 2013).**

Le milieu de culture testé est ajusté à pH = 9 par addition de NaOH (4N). Il est conservé à l'abri de la lumière, après stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Sa composition est donnée dans le tableau. Ci-dessous :

Tableau III : Composition chimique du milieu Zarrouk **(FOX., 1999).**

Composition	**Concentration (g.L^{-1})**
$NaHCO_3$	16.80
K_2HPO_4	0.50
$NaNO_3$	2.50
K_2SO_4	1.00
NaCl	1.00
$MgSO_4.(7H_2O)$	0.20
$CaCl_2$	0.04
$FeSO_4.(7\ H_2O)$	0.01
EDTA	0.08

A 1 L de la composition ci-dessus, on a ajouté 1 ml de chacune des solutions d'oligo-élémentsA_5 et B_6

Tableau IV : Composition chimique de la solution A_5 **(FOX., 1999).**

Oligo-éléments	**Concentration (g.L^{-1})**
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2.4\ H_2O$	1.81
$ZnSO_3$	0.22
$CuSO_4$	0.08
MoO_3	0.01

Tableau V : Composition chimique de la solution B_6 (**FOX., 1999).**

Oligo-éléments	**Concentration (g.L^{-1})**
$K_2Cr\ (SO_4)_4.24H_2O$	960×10-4
$NiSO_4.7H_2O$	478×10-4
$Ti_2(SO_4)_3$	400×10-4

NH_4VO_3	229×10-4
Na_2WO_4	179×10-4
Co $(NO_3)_2.6H_2O$	44×10-4

II.2. Vérification de la culture d'*Arthrospira platensis*

II.2.1. Examen microscopique

II.2.1.1. Examen à l'état frais

a) But

L'observation microscopique de spiruline permet de vérifier l'état de culture et l'étape de croissance, ainsi pour mettre en évidence la mobilité et faire une approche sur la morphologie. Cet examen se réalise en déposant sur une lame porte-objet une goutte de culture de la souche *Arthrospira platensis* à examiner, cette goutte est recouverte d'une lame couvre-objet.

La préparation est examinée à l'objectif à immersion (100x), après dépôt d'une goutte d'huile à immersion.

b) Observations

- à l'objectif 100x.
- Diaphragme quasiment fermé pour augmenter le contraste.
- Forte intensité lumineuse.

II.2.2. Préparation de l'inoculum (culture de spiruline)

La préparation de l'inoculum est l'étape primordiale pour réaliser les différents essais expérimentaux et de garder une culture de réserve.

II.2.2.1. Filtration de spiruline (culture jeune)

La filtration est un moyen de séparer les contaminants de la spiruline et les minimiser ou les éliminer **(JOURDAN., 1999).** Elle a été fait à travers un filtre de porosité de 30µm qui est inférieur à celle de spiruline et supérieur à ceux des contaminants bactériennes **(FOX., 1999)**

Technique de filtration :

On plie le papier filtre de moitié.

⬇

On replie le papier, une seconde fois, de moitié.

⬇

On dépose le cône dans un entonnoir. trois épaisseurs de papier d'un côté et une de l'autre).

⬇

On place l'entonnoir dans un erlenmeyer.

⬇

On verse délicatement l'échantillon de spiruline dans l'entonnoir.

⬇

on ait séparé le filtrat de biomasse de spiruline.

⬇

Les filaments de spiruline dans le papier filtre ont été récupérés dans des flacons de 500 ml contenant le milieu Zarrouk.

Figure05 : diagramme de différentes étapes de filtration de spiruline.

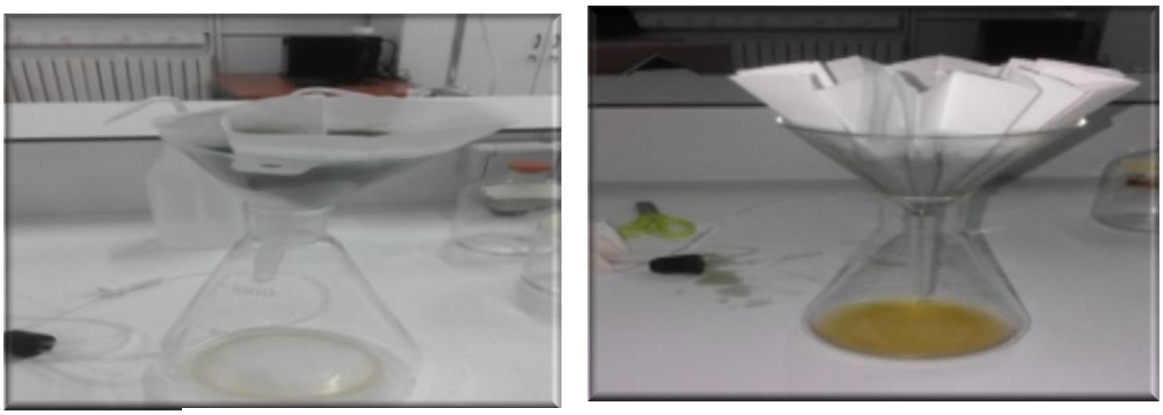


Figure06 : Technique de filtration de spiruline.

II.2.2.2. La mise en évidence des contaminants bactériens par coloration Gram

A partir de la culture de spiruline, et de filtrat. La coloration de Gram a été faite comme suite, selon **(CAMILLE., 2014).**

a) Technique

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile, puis prélever à l'aide de l'anse de platine une parcelle de la culture. Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.

-La suspension est séchée sur la lame et traitée comme suit :

Etape 1. Coloration au Crystal violet. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.

- Rincer à l'eau distillée

Etape 2. La fixation avec lugol stabilise la coloration au Crystal violet. Toutes les bactéries restent violettes.

- Rincer à l'eau distillée

Etape 3. Extraction avec de l'alcool. Décoloration de certaines bactéries (Gram négatives) et pas d'autres (Gram positives).

- Rincer à l'eau distillée

Etape 4. Contre-coloration avec la fushine. Les bactéries Gram positives sont déjà colorées avec le Crystal violet et restent violettes. Les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

- Rincer à l'eau distillée

b) Observation microscopique

L'examen microscopique des lames est effectué avec l'objectif (100x), après dépôt d'une goutte d'huile à immersion. Pour rechercher des contaminants de la spiruline.

II.2.2.3. Culture de spiruline sur milieu solide

La mise en évidence de culture de spiruline est réalisée par l'ensemencement à la surface par étalement de l'inoculum sur milieu Zarrouk gélosé.

Technique

1-A l'aide d'une pipette pasteur, prendre stérilement quelque goutte de culture homogénéisée, et la déposer sur la surface de milieu Zarrouk gélosée (avec 1% d'agar agar)

2-Etaler la goutte déposée par une pipette pasteur en râteau.

3-Incuber à 30°C pendant 5jours.

4-Lecture de résultats et dénombrement de colonies des contaminants.

II.3. Isolement de spiruline en culture pure

On a également effectué des essais d'isolement de spiruline sur d'un milieu Zarrouk liquide et solide.

II.3.1. Traitement par bicarbonate

Le principe d'isolement est de purifier la spiruline par l'augmentation de la concentration de bicarbonate de sodium, de 2% à 8% puis 15%, dans le milieu de culture liquide de la souche *A. platensis*.

1-Les filaments retenus par la filtration sont recueillis dans le milieu liquide d'isolement N°1 dont la Composition est citée en **(Annexe I)**.

On a prélevé stérilement 100 ml de ce milieu dans un bécher de 200 ml dans lequel on a plongé le filtre. Puis on a enlevé les filaments du filtre et on a procédé à son lavage 3 fois avec le même milieu.

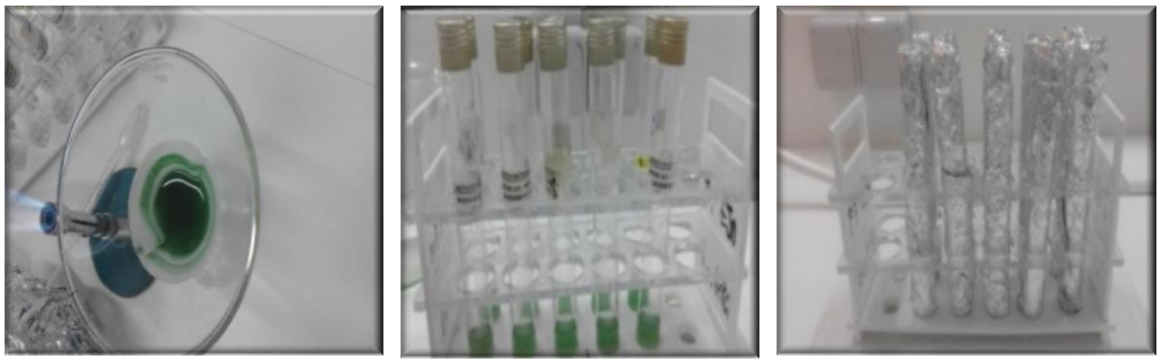
La solution a été répartie dans des tubes à essai à raison de 2 ml par tube.

2-Après 24 à 48 h, on a ajouté 2 ml dans chaque tube à essai de la solution N°2 à une concentration de 8% de bicarbonate de sodium **(Annexe I)**.

3-Après 24 heures, on a rajouté 4 ml de la solution N°3, la teneur de bicarbonate est à raison de 15% **(Annexe I).**

4-Les cultures de spiruline obtenues ont été conservées dans un papier aluminium (obscurité). Cette méthode de conservation réduit la croissance de la spiruline et élimine certains contaminants tels que les bactéries photosynthétiques **(BENSEHAILA., 2016).**

L'efficacité de ce traitement est testée par un examen microscopique avec grossissement (Gr : 100X).



a) Filtration et lavage b) N1(j1) + N2(j2) + N3(j3) c) Conservation à l'obscurité

Figure 07 : les étapes de purification de spiruline.

II.3.2. Isolement sur boite de pétrie

On a également effectué des essais d'isolement de la spiruline à partir d'un milieu solide dont la composition est en **(Annexe I)**

Après stérilisation, on a coulé le milieu dans des boites Pétri, après Refroidissement, on a ensemencé une goutte de la spiruline par étalement, puis on a procédé à l'incubation dans une étuve à 37°C en aérobiose pendant 48heures, jusqu'à une semaine **(BENSEHAILA., 2016).**

II.4. Caractéristiques générale de spiruline

II.4.1. Caractéristiques physico-chimiques

II.4.1.1. Cinétique de croissance

II.4.1.1.1. Détermination de poids sec de spiruline, la courbe d'étalon

1-Les échantillons contenant 25 ml de suspension d'algues sont filtré à travers un Filtre Whatman GF / C 47 mm qui ont été séché dans un étuve pendant 2 h à 105 ° C et pesé avant la filtration.

2-Des dilutions ont été préparées dans la gamme 25-100 %, puis à partir de chaque dilution on mesure la densité optique correspondante.

3- Après filtration de différentes dilutions, Les filtres sont placés sur papier aluminium dans l'étuve pendant 24h à105°c.

4-Après avoir refroidi les filtres dans un dessiccateur (20 min), ils sont à nouveau pesés **(VONSHAK., 2002).**

Les valeurs de poids sec sont calculées par l'équation suivante :

$\mathbf{Ps} = \frac{(\mathbf{Pc}-\mathbf{Pv})}{\mathbf{V}}$…… (1) Où Ps : poids sec. Pc : poids chargé. PV : poids vide.

V : volume [L]

II.4.1.1.2. Contrôle de l'évolution de biomasse

La biomasse d*'Arthrospira platensis* est évaluée en mesurant la densité optique de la culture chaque jour à λ = 618 nm par un spectrophotomètre.

II.4.1.1.3. Calcul des paramètres cinétiques

La vitesse de croissance ou le taux de croissance spécifique maximal (μ max) était le taux de croissance spécifique pendant la phase exponentielle de croissance. Cette phase a été déterminée en dessinant la courbe logarithmique de la croissance de la biomasse en fonction du temps.μmax calculé à partir l'équation suivante **(FALQUET et HURNI., 2006) :**

$$\mu\mathbf{max} = \frac{[\ln(\mathbf{X2})-\ln(\mathbf{X1})]}{\mathbf{t}} \text{ ……. } (2)$$

X 1 : la concentration en biomasse en début de phase exponentielle.

X 2 : la concentration en biomasse en fin de phase exponentielle.

t : la durée de la phase exponentielle.

II.4.1.2. Détermination de la teneur en humidité

La détermination de la teneur en humidité est faite par étuvage à 103 ± 2° jusqu'à stabilité du poids selon la méthode officielle AOCS (American Oïl Chemist's Society) en 1990.

Mode opératoire

0.1 g de poudre de spiruline a été introduit dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. L'ensemble est placé à l'étuve à 103± 2 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en humidité est déterminée par la formule suivante :

$$\mathbf{H}\% = \frac{\mathbf{PE}-(\mathbf{PF}-\mathbf{PO})}{\mathbf{PE}}\mathbf{x100}\text{……..(3) }\mathbf{(DANSOU., 2002)}$$

H : taux d'humidité, exprimé en pourcentage (%).

PE : Prise d'essai.

PO : Poids du creuset vide.

PF : Poids du creuset contenant l'échantillon sec.

II.4.1.3. Détermination le taux de cendre

La teneur en cendres (minéraux) a été estimée par incinération au four à 550°C de façon à obtenir la totalité des cations sous forme de carbonate et autres sels minéraux.

0.4 g de poudre de spiruline est introduits dans un creuset en porcelaine préalablement taré. L'ensemble est placé dans un four à mufle à 550 °c pendant 3 heures. Après refroidissement au dessiccateur pendant 30 minutes, on pèse à nouveau (PF) **(DANSOU., 2002).**

La teneur en cendres est donnée par la formule suivante :

$$\boldsymbol{C} = \frac{\mathbf{PF{-}PO}}{\mathbf{PE}}\mathbf{x100} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (4)$$

C : Taux de cendres, exprimé en pourcentage (%) en masse.

PE : Prise d'essai.

PO : Poids du creuset à vide.

PF : Poids total en fin d'incinération.

II.4.1.4. Détermination de la teneur en chlorophylles

L'échantillon de 5 ml de suspension d'algues est centrifugé pendant 5 min à 3500 tpm. Le culot est conservé (le surnageant est rejeté), est remis en suspension dans 5 ml de méthanol (absolu) et broyé dans un homogénéisateur.

Les échantillons sont incubés dans un bain-marie, à 70 ° C pendant 2 min. Ensuite, l'échantillon est centrifugé à nouveau pendant 5min à 3500 tpm, et le surnageant transparent est utilisé pour la mesure.la densité optique est mesurée à 665 nm **(VONSHAK et al., 2002).**

$$\boldsymbol{C = DO665 * 13.9} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\mathbf{(5)}$$

$$\boldsymbol{T}\left(\frac{\boldsymbol{mg}}{\boldsymbol{g}}\ \boldsymbol{ps}\right) = \boldsymbol{C}.\frac{\mathbf{1000}}{\mathbf{Xf}} \ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (6)$$

T : teneur en chlorophylle

C : concentration de chlorophylle mg/ml

X_f : concentration de spiruline.

II.4.1.5. Détermination de la teneur en phycocyanine

La détermination de la teneur de phycocyanine dans une culture d'*Arthrospira platensis* a été faite selon les étapes suivantes :

Centrifuger 200ml de culture à 6000 rpm pendant 10 minutes.

⬇

Ajouter 10 ml d'une solution de tampon phosphate à pH=7.

⬇

Congeler à -20 °C et décongeler à 4 °C de manière répétitive pendant 4 heures.

⬇

Centrifuger les différents extraits obtenus à 6000 rpm pendant 10minutes. Rejeter le culot et récupérer le surnageant

⬇

Mesurer la densité optique à 615 puis à 652nm **(BOUDOUR., 2008).**

Figure 08 : Diagramme représente les différentes étapes d'extraction de phycocyanine.

Le calcul de la concentration totale de phycocyanine (PC) est selon l'équation suivante:

$$\mathbf{PC} = \frac{\mathbf{DO615 - 0.0474.DO652}}{\mathbf{5.34}} \quad \text{.....(7)}$$ **(LAMELA et MARQUEZ., 2000).**

II.4.1.6. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols s'est faite à la fin de la phase exponentielle de la culture **(TRABELSI et al., 2010)**, par le solvant éthanol/eau (50/50). Afin de limiter les risques d'oxydation des composés phénoliques, les processus d'extraction et d'évaporation sont réalisés à l'abri de la lumière. De plus, les polyphénols étant sensibles à des températures excessives, les extraits sont maintenus à des températures inferieurs à 40°C durant la phase d'extraction et d'évaporation.

Après extraction, les extrait sont centrifugés et filtrés, environ 150 ml seront Récupères puis passés ensuite à l'évaporateur rotatif (Rota vapeur) afin d'éliminer (évaporer) l'éthanol et ainsi de concentrer l'extrait **(LANN et al., 2012).**

Protocole d'extraction des polyphénols par éthanol/eau est résumé dans la **figure 09**.

2 g d'algue en poudre + 150 ml d'éthanol/eau.

⬇

Broyage au mixeur.

⬇

Extraction pendant 3 h à 40°C à l'obscurité (papier aluminium) sous agitation.

⬇

Centrifugation pendant 15 min à 4°C à 4000 rpm pendant15 min.

⬇

Filtration sur coton de verre.

⬇

Récupération du filtrat.

⬇

Evaporation rotative.

⬇

Récupération de l'extrait brut

Figure09 : Diagramme représente d'extraction des polyphénols de spiruline en poudre **(LANN et al., 2012).**



a)Prise d'essai. b)Extraction sous agitation. c) la filtration. d) Evaporation rotative.

Figure10 : L'extraction des polyphénols par éthanol/eau à partir de poudre de spiruline .

Même protocole pour extraction des polyphénols à partir de spiruline frais,mais les filaments de spiruline (prise d'essai) sont retenus après filtration.

II.4.1.7. Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des polyphénols est déterminé comme suit, d'après **(SHALABY et SHANAB., 2013).**

$$\mathbf{Y\%} = \left(\frac{\mathbf{Cle}}{\mathbf{Wr}}\right).\mathbf{100} \text{.....(8)}$$ Où:

Y% : rendement d'extraction

W_e: le poids de la prise d'essai utilisé pour l'extraction(g)

cl_e: la masse de l'extrait en gramme (g)

II.4.1.8. Dosage des polyphénols selon la méthode de Folin Ciocalteu

La détermination de la teneur en composés phénolique totaux a été réalisés par la méthode de Folin-Ciocalteu **(SINGELTON et ROSSI., 1965)**. Ce réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols donnant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle au taux de composé phénolique présent dans le milieu.

Une quantité de 0,3 mL de l'extrait a été introduites dans des tubes à essai et 1,5 mL du réactif le Folin-Ciocalteu (dilué dans de l'eau distillé 1/10) ont été ajouté,puis 1,2 mL de carbonate de sodium 75g/L) est additionné. Les tubes à essai ont été placés dans le vortex à une température de 50°C pendant 5min puis refroidis. L'absorbance a été mesurée à 760 nm **(BENSEHAILA., 2016).**

La méthode Folin Ciocalteu utilise l'acide gallique comme une gamme d'étalonnage établi à partir de différentes concentrations de celle-ci, La teneur totale en composés phénoliques des échantillons algales a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g de spiruline (µg AG/g de spiruline).

II.4.2. Caractéristiques biologiques

II.4.2.1. La mise en évidence de l'activité antibactérienne

Pour la détermination de l'activité antibactérienne des extraits de spiruline, trois souches bactériennes ont été choisies (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa*). Ces bactéries sont pathogènes et sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'Homme.

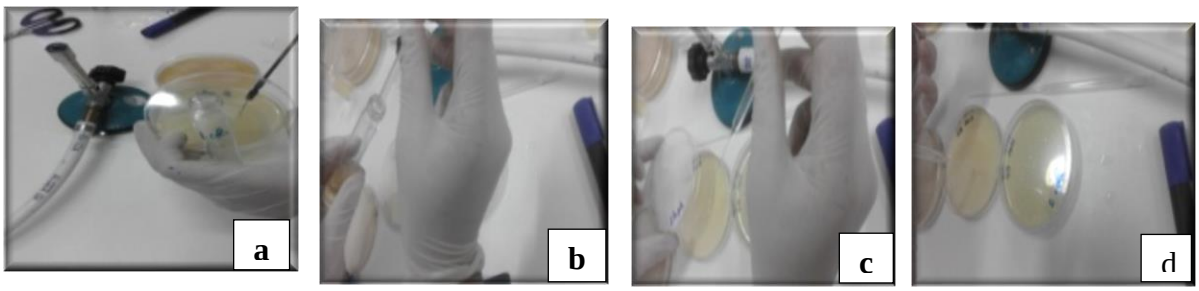
II.4.2.1.1. Test de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé **(TREKI et al., 2009).**

Les souches bactériennes conservées dans la gélose nutritive à 4 °C, ont été revivifié dans une solution nutritive (bouillon nutritif) et incuber à 37 ± 1°C pendant 18 à 24 h. Les souches bactériennes ont été cultivées sur gélose Mueller-Hinton(MHA). Des colonies bien isolées ont

été transférer dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile afin d'avoir une suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,10 à 625 nm **(ATHAMENA et al., 2010).**

L'antibiotiques gentamicine est utilisé comme un témoins positif de ce test.



a) de GN au bouillon **b, c, d)** de bouillon au gélose MH

Figure 11 : Les étapes de revivification des souches à tester.

L'ensemencement de la suspension bactérienne a été réalisé par étalement sur boites Pétri contenant la gélose Muller Hinton **(RAHAL., 2005).**

II.4.2.1.2. Préparation des dilutions des extraits

Une concentration de 400 mg/ml a été préparée pour chaque extrait, puis des dilutions successives au demi ont été effectués **(figure 12) et (tableau I Annexe III)**.

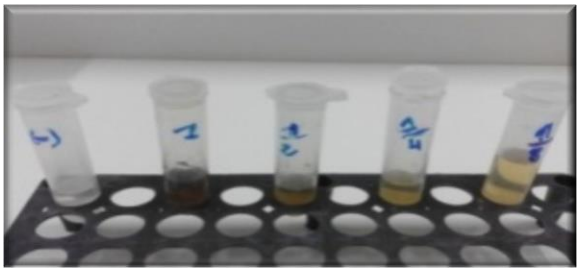


Figure 12 : Préparation des dilutions.

Les disques stériles imprégnés de concentrations croissantes d'extraits repris avec le diméthylsulfoxide (DMSO) à raison de 10µl par disque, Un disque imbibé par le DMSO est employé en tant que contrôle négative, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose, les boites ont été incubées 24h à 37°C en aérobiose **(ATHAMENA et al., 2010).**

II.4.2.1.3. La Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition vis-à-vis des extraits, selon **(CELIKEL& KAVAS., 2008)** et **(PONCE et al., 2003)** :

- Non sensible (-) ou résistance : diamètre <8mm

- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14

- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm

- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20

II.4.2.2. Détermination d'activité antioxydante par test au DPPH

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) permet de mettre en évidence le pouvoir antioxydant d'un extrait, la solution d'alcool de DPPH est de couleur violet foncé caractérisé par son spectre UV avec un maximum d'absorbance à 517nm **(ASMAA et al., 2015).**

En présence d'un antioxydant, La forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance **(PEREZ et al., 2007).**

Technique

Des dilutions préparées de chaque extrait polyphénolique de spiruline ; 500mg, 250mg, 125mg, 62.5mg, 31.25mg dans 1ml d'éthanol sont incubées avec 3.9 ml de solution de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes, à la température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc contenant la solution de DPPH et du solvant. La valeur de l'absorbance du blanc est prise comme étant le temps du début de la réaction **(ASMAA al., 2015).**

Les résultats exprimés en IC50 qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC50 est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande **(POPOVICI et al., 2009).**

$$\mathbf{I\%} = \left[\frac{\mathbf{Abs\ controle - Abs\ échantillon}}{\mathbf{Abs\ controle}}\right]\mathbf{x100} \quad \text{.....(9)}$$

I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif

La capacité antioxydante des extraits a été quantifiée par comparaison avec la norme (L'acide ascorbique a été utilisé comme standard pour construire la courbe d'étalonnage) et les résultats ont été donnés en milligramme d'acide ascorbique par gramme d'échantillon (mg AA. g-1) **(LUMBILA., 2005).**

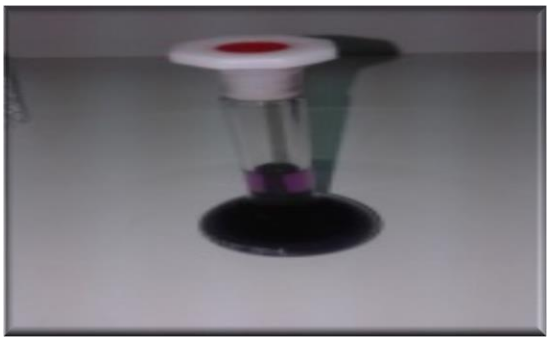


Figure13 : solution de DPPH.

III. Analyse statistique

Il faut noter que toutes les données représentent la moyenne de trois essais. Pour comparer les différents résultats obtenus, une analyse descriptive a été réalisée, à l'aide du logiciel Microsoft office Excel 2016. Les résultats étant exprimés sous la forme de moyenne ± écart type et la comparaison des moyennes grâce à l'analyse de test student.

Le test de comparaison de Student a été utilisé pour analyser la significativité des résultats à un seuil de probabilité fixé à 5%.

Troisième partie

Résultats et discussion

I. Résultat et discussion

I.1. Vérification de la culture d'*Arthrospira platensis*

L'odeur et la couleur de la culture peut nous renseigner sur le niveau de contamination de biomasse, lorsque la culture est moins ou non contaminé présente une bonne fluorescence avec odeur algale agréable.

I.1.1. Examen microscopique

De point de vue de morphologie l'examen microscopique est un moyen direct qui révèle l'état réel de la culture, l'observation à l'état frais et à l'état de frottis permet de mise en évidence d'une contamination.

I.1.1.1 Examen à l'état frais

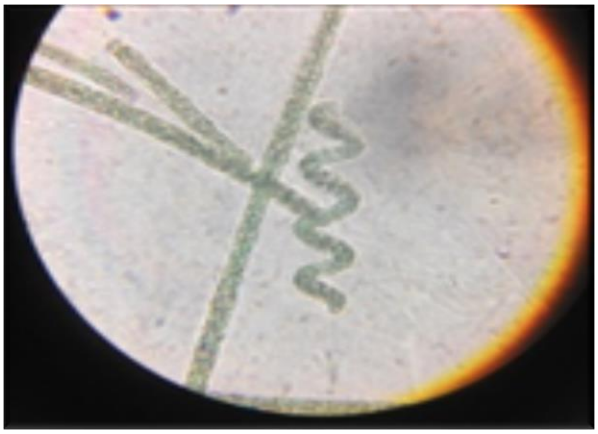


Figure14 : Observation microscopique de spiruline à l'état frais à l'objectif 100x**.**

L'observation microscopique de spiruline à l'état frais montre que la souche *Arthrospira platensis* est mobile, présentée sous une forme droite et filamenteuse à morphologie hélicoïdale du trichome avec une couleur vert vif **(figure 14).** Ce qui confirme que l'échantillon de spiruline été en bonne état de culture selon **(MUHLING., 2000).**

I.1.1.2. Coloration de Gram de spiruline

La mise en évidence des contaminants bactériens par coloration Gram.

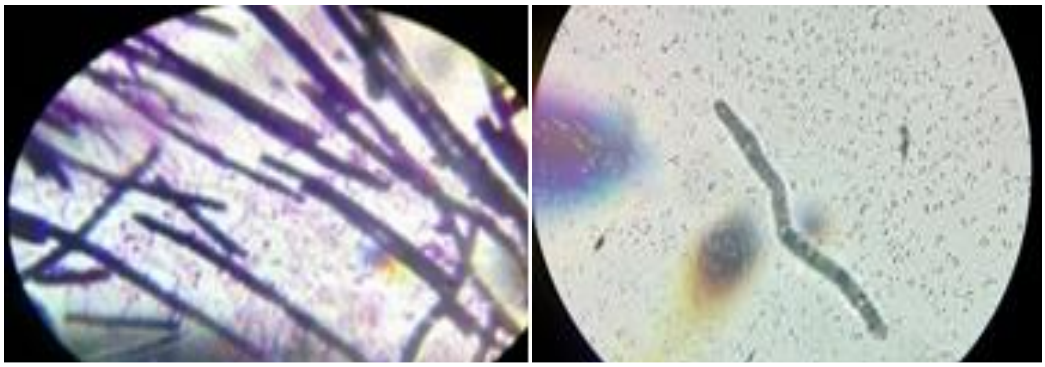


Figure15 : Observation microscopique de contaminants de Spiruline à l'objectif 100x après coloration de Gram.

La **figure 15** a montré que *Arthrospira platensis* est de Gram-, mais l'échantiollon de spiruline est extrememment chargé par les contaminants bactériens de $Gram^{+}$ et $Gram^{-}$.

Ces résultats ont été signalé par **FOX., (1999) et JOURDAN., (2012)** qui confirment la presence des contaminant vivant dans la culture de spiruline,surtout les bactéries.

I.1.1.3. Culture de spiruline sur milieu solide

D'après la **figure16**, on note que la culture de spiruline sur milieu Zarrouk gélosé a enregistré une apparition d'un grand nombre de colonies de différentes tailles

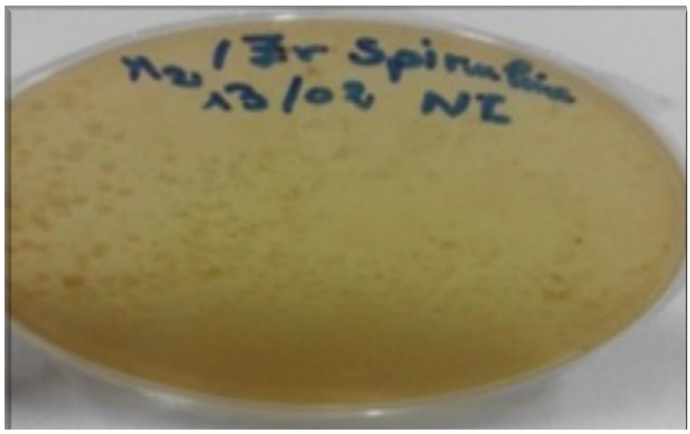


Figure 16 : la mise en évidence des contaminants de spiruline après culture sur le milieu Zarrouk gélosé .

Après le dénombrement des colonies bactériennes sur le milieu zarrouk on a estimé une valeur atteint 295± 3 UFC/ml .Une coloration de Gram a été effectuée à partir des colonies des contaminants isolées sur gélose Zarrouk, **(Annexe II).**

Selon **(PIERRE et PIERRE.,1977),** les Cyanophycées sont des organismes filamenteux qui se développent le plus souvent sous forme de colonies gélatineuses ou de voiles, Plusieurs

espèces sont souvent associées et le mucus qu'elles secrètent abrite une flore bactérienne importante, Il en résulte une certaine difficulté à isoler les souches axéniques.

I.2.Isolement de spiruline en culture pure

Un test de confirmation de la pureté de spiruline a été realisé par une observation microscopique avant et après coloration de Gram,et une culture sur milieu solide. donné dans les **figure 17et 18** respectivement.

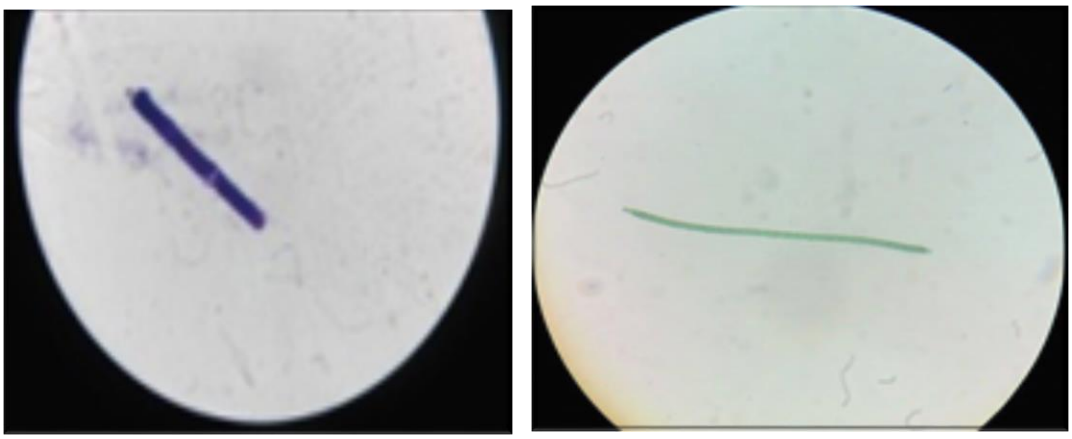


Figure 17 : Observation microscopique de spiruline traitée à l'objectif 100x,avant et après Coloration de Gram.

On a remarqué, après coloration de Gram, que les filaments de spiruline sont apparus pure selon la **figure 17**, et Le résultat de culture de spiruline traitée par bicarbonate sur milieu solide, est donné par la **figure 18.**

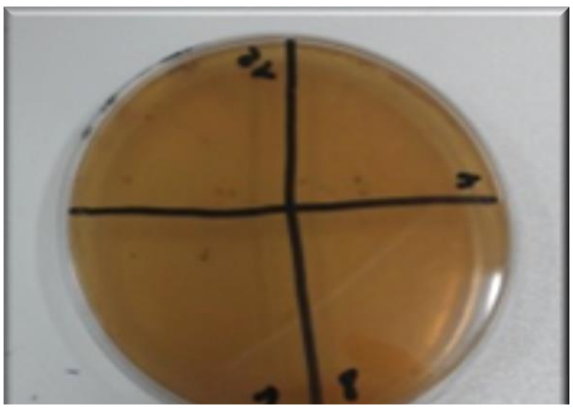


Figure 18 : isolement de spiruline traitée sur milieu solide.

La culture sur milieu solide **(figure18)** montre que cette élimination des contaminants n'était pas efficace 100%, et le nombre de colonies bactériennes est diminué de 295±3 à 2±1 UFC/ml, et elle est équivalente à 94%, sans avoir la poussé de spiruline sur milieu gélosé après 3 jour.

D'après **MUHLING., (2000)** La réalisation de procédure d'isolement et de purification sur milieu de Zarrouk solide (gélose à 1% (masse/volume) pour le procédé d'isolement présentent un profil distinct de croissance bactérienne des contaminants sur les boites de gélose utilisées.

Les algues bleues vertes se sont révélées exceptionnellement difficiles à obtenir en culture axénique (pure), à cause de leurs gaines mucilagineuses caractéristiques qui hébergent des bactéries contaminantes **(BOWYER et SKERMAN., 1968)**.

Selon **PIERRE et PIERRE., (1977)** les Cyanophycées filamenteuses sécrètent un mucus qui abrite une flore bactérienne importante. Il en résulte une certaine difficulté à isoler des souches axéniques. De nombreux auteurs se sont penchés sur ce problème, ce qui a été signalé déjà par **(TASSIGNY., 1969).**

D'après **USHARANI et al., (2012)** qui ont rapporté que l'addition de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO3) au milieu de culture favorisait une meilleure croissance de la spiruline.

Selon **WHITTON., (2012**) l'alcalinité et le pH élevé pour la culture d'*Arthrospira* assurent des conditions sélectives dans le milieu de croissance, et représentent une barrière efficace contre la contamination ph > 11.5

I.3. Caractéristiques générale de spiruline

I.3.1. Caractéristiques physico-chimiques

I.3.1.1. Cinétique de croissance

La cinétique de croissance de spiruline a été estimée par le suivi de l'évolution de poids sec et la biomasse en fonction le temp en jour.

I.3.1.1.1. Détermination de Poids sec de spiruline et le courbe étalon

La **figure19** représente l'évolution de poids sec de spiruline en fonction de la densité optique avec un facteur de corrélation de R^2= 0.96.

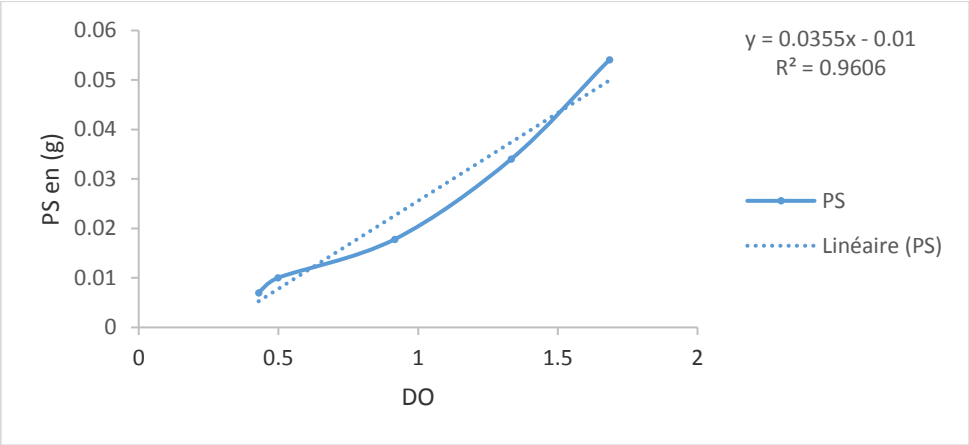


Figure19 : le poids sec de spiruline.

D'après la **figure 19**, on a remarqué que le poids sec de spiruline augmente proportionnellement avec la DO de la culture. Cette courbe étalon permettre de calculer la concentration de spiruline, donc de suivre l'évolution de la cinétique de croissance.

I.3.1.1.2. Le suivit de l'évolution de biomasse de spiruline

La valeur de la concentration en biomasse a été déterminée par la conversion de la valeur de l'absorbance en concentration par la relation suivante :$DO = 0.0355x - 0.01$ où X est la concentration de spiruline.

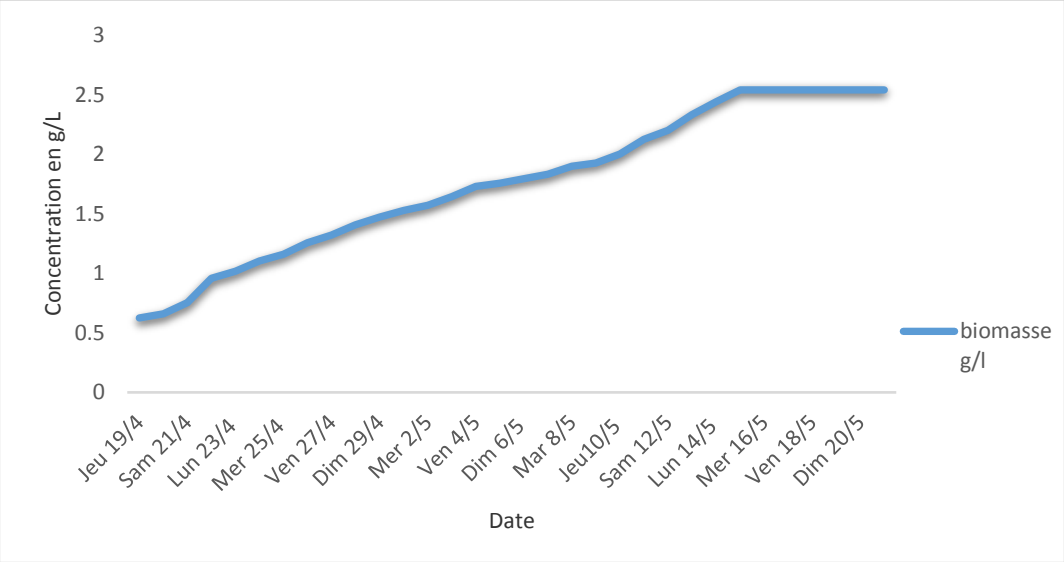


Figure 20 : évolution de biomasse de spiruline en fonction de temps.

D'après l'estimation de poids sec et le suivi de croissance de spiruline, l'évolution de biomasse d'*Arthrospira platensis* en fonction de temps montre l'existence deux phases distinctes :

Une phase de développement intense s'étendant de j1 à j26 (μ=0.06 J^{-1}) avec une augmentation importante de la biomasse de spiruline varie de 0.62 à 2.54 g/L. cette phase est généralement caractérisé par des divisions successives, pendant lesquelles le taux de croissance spécifique augmente et tend vers son maximum, C'est la phase exponentielle de la croissance qui dure de 26 jours.

Une phase de stabilisation s'étendant de j27 à j 32(μ=0) autour d'une valeur de 3 g/l au cours de laquelle la population de spiruline atteint sa valeur maximale. Elle représente un équilibre entre le gain des cellules viables et celles qui se lyse à cause des conditions difficiles du milieu de culture (**TRABELSI et al., 2010).**

La cinétique de croissance de culture de spiruline est similaire à L'évolution de la quantité de biomasse obéit à la loi classique de la croissance des microorganismes en culture discontinue ″batch″ définie par les différentes phases, l'absence de la phase de latence est due à la composition du milieu de culture, la spiruline est repiquée sur même milieu.

Les conditions du milieu étant les mêmes que celles utilisées pour l'inoculum, et qui ont permis de réduire le temps d'adaptation. Selon **(BORGNE., 1986**) La durée de la phase d'adaptation dépend de l'âge de l'inoculum et son adéquation enzymatique aux nouveaux substrats du milieu.

I.3.1.2. Détermination de la teneur en humidité

Le taux d'humidité est la teneur en eau de la poudre de spiruline, mesurée en pourcentage d'eau par rapport à son poids sec.

On a observé un taux d'humidité de 5,62±0.33%. Cette valeur est conforme à la celle rapportée par **(JOURDAN., 2006)** et très proche à la valeur de 4-7% trouvée par **PIERLOVISI., (2008)** et à celle 5.42 trouvée par **(BENSEHAILA., 2016).**

I.3.1.3. Détermination le taux de cendre

La cendre obtenue après traitement thermique à 550°C, illustré dans la **figure 21**.

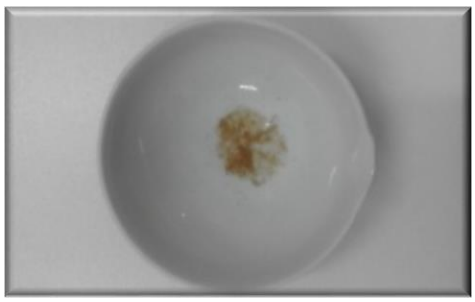


Figure21 :spiruline après incéniretion.

La poudre de spiruline renferme un taux relativement élévé en cendre estimé à 9.7%±0.13 cette valeur est proche à celle décrit par **(BOCAR et al., 2011), (BENAHMED., 2012)** et **(JOURDAN., 2006),** ce pourcentage est lié fort probablement au pouvoir d'absorption des minéraux du milieu de culture par la souche *A. platensis*, comme cela est souligné par plusieurs auteurs **(BRANGER et al.,2003, RANGSAYATORN et al.,2004, CHAN et PAN., 2005).**

I.3.1.4. Les teneurs en pigements de spiruline

La connaissance des teneur en chlorophylle de biomasse reflet l'état physiologique de cellule algale et consédére comme un moyen productif contre le risque de photolyse(forte intensité lumineuse).

Le tabeau VI donne les teneurs en pigments de spiruline .

Tableau VI : Teneur des pigments

.

Pigment	**Teneur** mg/g
Phycocyanine	0 ,053
Chlorophylle	10,52

I.3.1.4.1. La teneur en chlorophylle



Figure22 : Extraction de chlorophylle de spiruline.

La spiruline possède un taux plus élevé en pigments chlorophylliens, d'après les résultats, on a remarqué que l'algue *Arthrospira platensis* renferme un taux de chlorophylle de 10.52±0.32mg/g. Cette valeur est proche à la valeur de **(JOURDAN., 2012)** dont la teneur de chlorophylle est 11 g/kg.

La concentration de la chlorophylle est en fonction de la concentration en biomasse dans un milieu de culture **(LAMELA et MARQUEZ., 2000).**

I.3.1.4.2. Détermination de la teneur en phycocyanine



Figure 23 : Extraction de phycocyanine de spiruline.

La spiruline présente une couleur bleue verte sombre parce qu'elle est riche en un polypeptide bleu vif appelé phycocyanine. Le dosage de ce pigment donne un taux de 0.053±0.013 mg/g. Ce taux très proche à la valeur de 0.08mg/g trouvée par **(RATHI BHUVANESWARI et al., 2013.**La concentration de phycocyanine dans les cellules dépend des conditions de croissance **(LAMELA et MARQUEZ., 2000).**

Au cours des dernières années, certains articles rapportant l'extraction de la phycocyanine à partir de la biomasse humide ont été publiés **(SONI et al., 2008, BERMEJO et al., 2006, SARADA et al., 1999, ABALDE et al., 1998),** dans tous les cas, la congélation et la décongélation étaient considérées comme les meilleures méthodes d'extraction de phycocyanine car elles présentaient une teneur plus élevée que les autres méthodes.

La libération de phycocyanine est directement liée à la rupture des cellules, mais les micro algues telles que la spiruline a des parois cellulaires multicouches résistantes, ce qui rend la procédure d'extraction difficile **(STEWART et FARMER., 1984).**

ACKER et MCGANN., (2003) suggèrent que, lorsque la cellule est gelée, il y a inévitablement formation de glace intracellulaire, ce qui entraîne des dommages à la cellule, favorisant une meilleure extraction des substances intracellulaires.

Cette phycocyanine est malheureusement sensible à la lumière et au condition de croissance et faute d'un conditionnement adéquat, ce pigment est très vite détruit **(DANSOU., 2002).**

Le taux de phycocyanine est modulé par les conditions dans le milieu à faible éclairage Il y a une augmentation de chlorophylle et diminution de phycocyanine, à forte éclairage conduit à une augmentation de pigment protectrice tel que la phycocyanine et une diminution de chlorophylle.

I.3.1.5. Extraction des polyphénols

L'extraction de polyphénols est effectuée sur deux formes de biomasse, une biomasse fraiche et biomasse conservée en poudre sèche.

D'après **(TRABELSI et al., 2010)** qui ont montrent que les activités maximales des polyphénols (métabolites secondaires) sont toujours inexistantes ou faibles pendant la phase exponentielle de croissance d*'Arthrospira platensis* et ne s'affirment qu'à la fin de cette phase et pendant la phase stationnaire. En effet, il est bien connu que la phase stationnaire correspond à un état de stress occasionné par l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture. Les conditions de stress inhibent la croissance et le catabolisme du carbone est surtout réorienté vers la synthèse de métabolites secondaires **(VON DOHREN et KLEINKAUF., 2001).**

Les résultats de **(MOHSEN et AMMAR., 2009)** ont prouvé que l'éthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques.

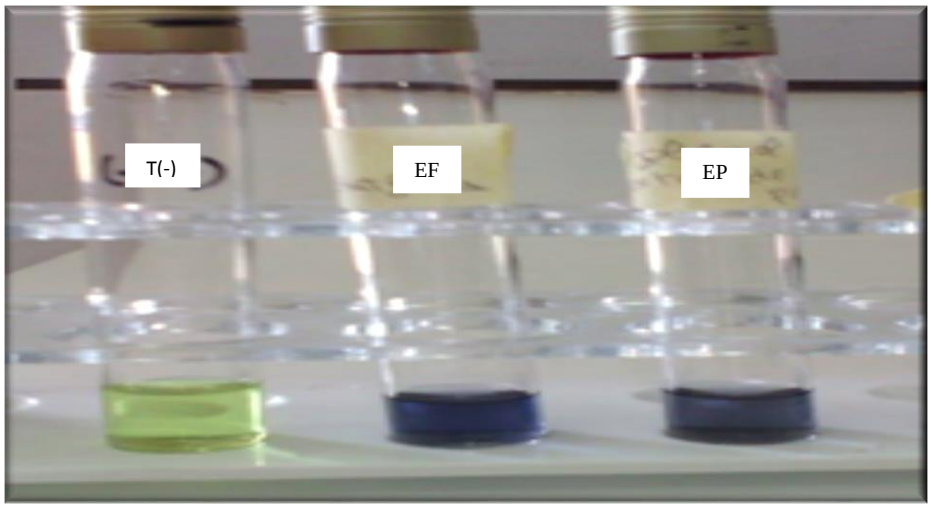
I.3.1.6. Le rendement d'extraction des polyphénols :

Le calcul de rendement d'extraction des polyphénols de spiruline montre que le rendement de poudre de spiruline est de (35%) qui est inferieur au rendement de l'extraction à l'état frais qui représente un rendement de (40%).

En comparaison avec l'étude de **ABD EL-BAKY et al., (2009)**, les valeurs des rendements d'extraction polyphénolique de present travail (*d'Arthrospira platensis)* est supérieur à celle de *spirulina maxima* .

I.3.1.7. Dosage des polyphénols selon la méthode de Folin Ciocalteu

Le réactif Folin-Ciocalteu est largement utilisée pour la détermintion des composés phénoliques basées sur la réaction d'oxydo-réduction, cette réaction développe une coloration bleue qui est proportionnelle au taux des composées phénoliques qui est dosée par spectrophotométrie **(WOLFE et al., 2003).** En présent travail, le résultat qualitatif est bien clair dans **la figure 24.**



T(-) : témoin négatif (Folin Ciocalteu). EP : extrait de poudre. EF : extrait de l'état frais

Figure24 :dosage des polyphenols

La teneur des extraits polyphénoliques a été quantifiée à partir de courbe acide gallique (**Annexe V)**

D'après les résultats obtenus, on a obtenu des taux de polyphénols totaux pour les deux extraits dont la valeur élevée est enregistré avec l'extrait de spiruline fraiche est de 92.16±0,08 µg AG/g, contre 68.66±0.7 µg AG/g pour celle de l'extrait de poudre (**la figure 25).**

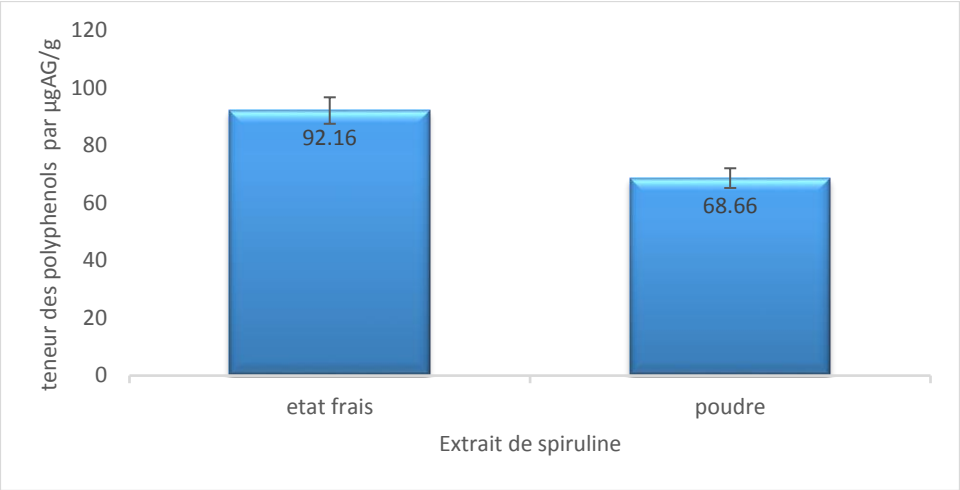


Figure25 : la teneur en polyphénol des extraits en µg AG/g de spiruline.

Ces résultats sont supérieurs à celle trouvés par **(COLLA et al., (2007)** et qui varient entre 2,45 à 4,9 µg/g et inferieur à celle trouvée par **(LUMILA et al.,2015)** de 17à 43 mg -GAE $.g^{-1}$.

La différence entre les deux extrais est révélé significatif p≤0.05%.

La différence entre les contenus phénoliques totaux des algues peut être expliqué par plusieurs facteurs influents, telles que l'origine géographique ou la zone de culture, saisonnière, physiologique et variations environnementales **(MARINHO-SORIANO et al., 2006)**

Le type et les conditions d'extraction ont également un effet très décisif influence sur la teneur totale en composés phénoliques, Par exemple, les effets de l'éthanol, du méthanol et des extraits d'eau sur les composés phénoliques **(MARINHO-SORIANO et al., 2006)** et par les caractéristiques des échantillons algales (poudre ou fraiche) **LUMILA et al., (2015**).

I.3.2. Activités biologiques de spiruline

Deux activités biologiques ont été recherchées, activité antibactérienne et antioxydante. L'effet antimicrobien et antioxydant des polyphénols de spiruline ont été traités comme suite :

I.3.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits polyphénoliques de spiruline a été évaluée sur trois germes pathogènes (*Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 et *Pseudomonas aeruginosa*) après 18h à 24h heurs d'incubation à une température adéquate de 37°C.

La sensibilité des bactéries aux polyphénols a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose. Le pouvoir antibactérien de ces extraits polyphénoliques est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) a l'aide d'une règle.

Les résultats de ce test sont présentés en détails dans **les figures 26 et 27.**

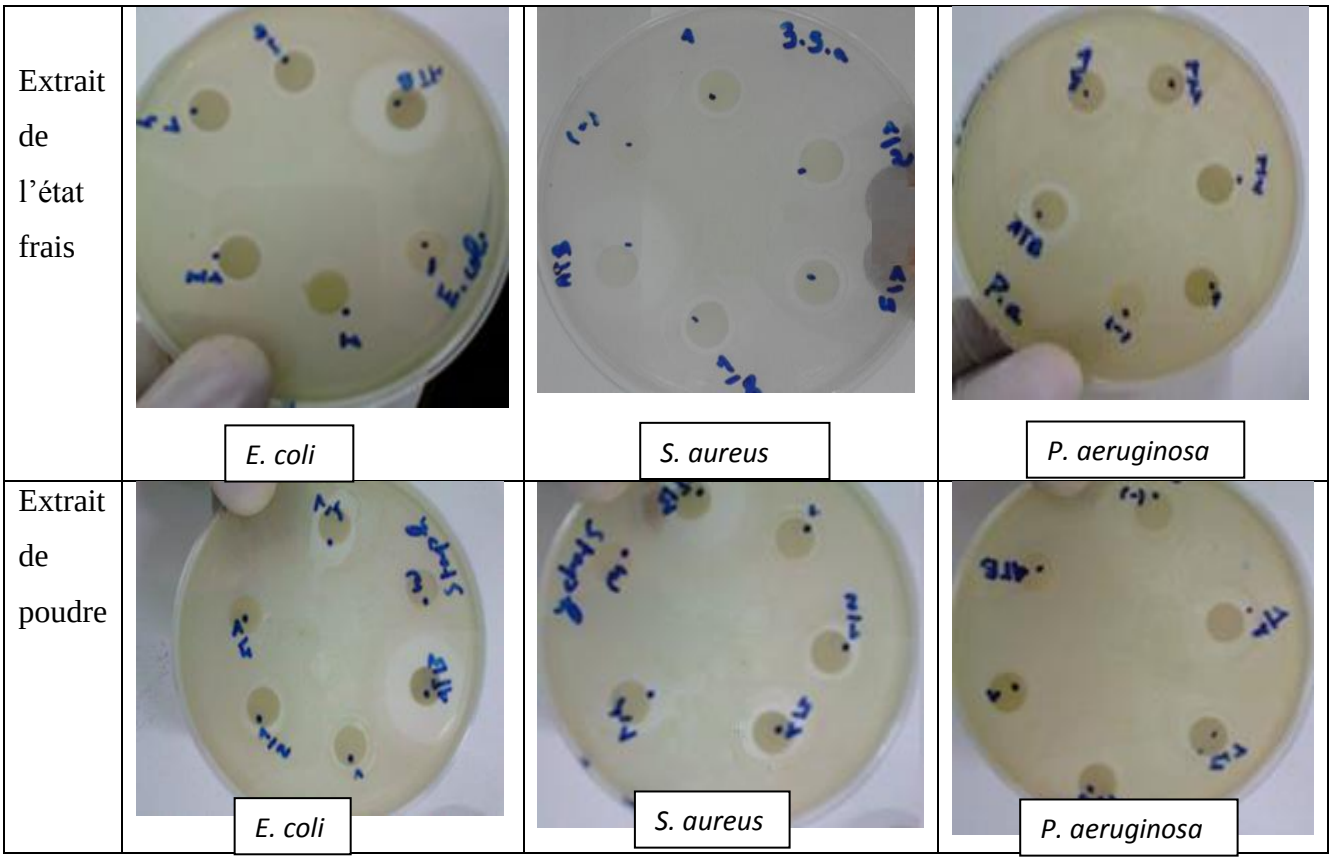
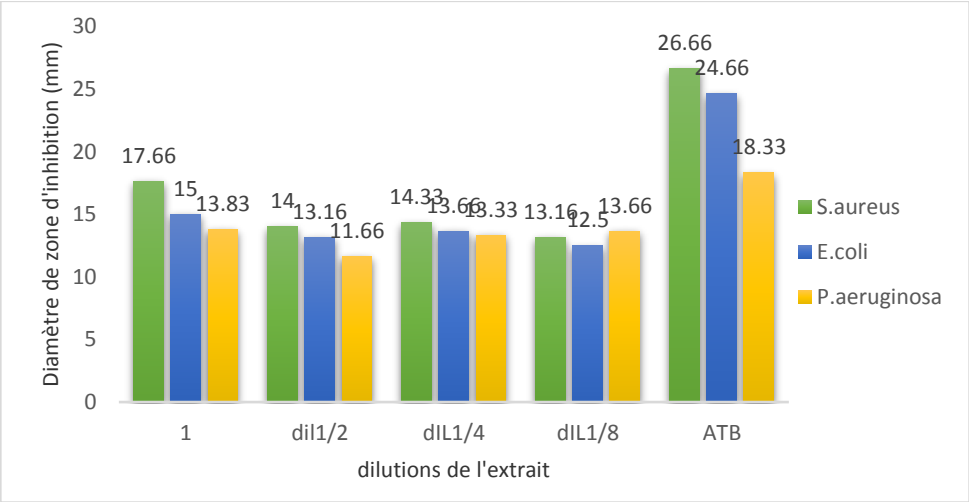
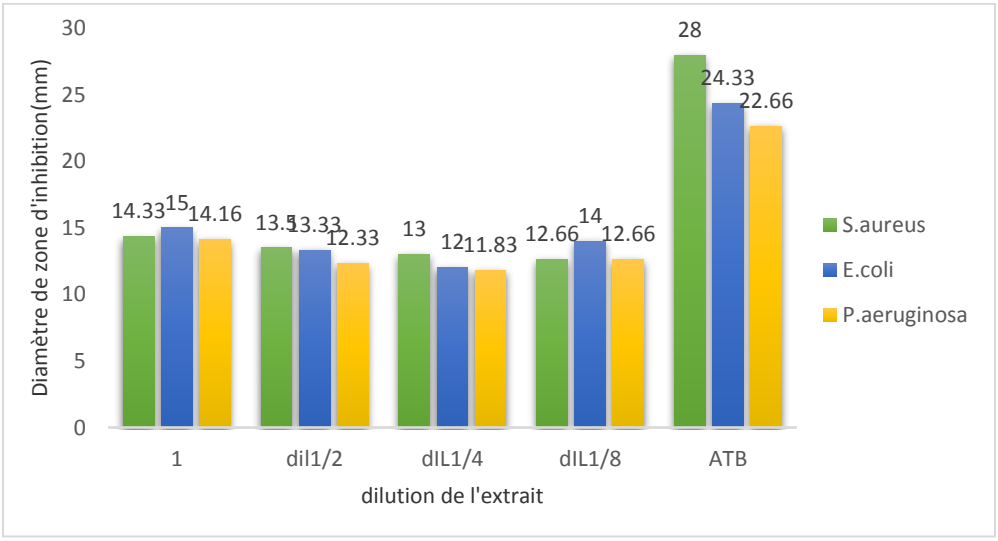


Figure 26 : Activité antibactérienne des polyphénols de spiruline vis-à-vis de *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 et *P. aeruginosa* pour l'extrait de l'état frais et de poudre.



a) l'extrait de Spiruline fraiche



b) l'extrait de Spiruline en poudre

Figure27 : le pouvoir antibactérien de spiruline vis-à-vis de *E. coli* ATCC25922et *S. aureus* ATCC29213 et *P. aeruginosa*.

Les dilutions 1, 1/2, 1/4 et 1/8 correspond à des concentrations d'extrait dans le DMSO, 400, 200, 100,50 mg/ml respectivement.

Les deux extraits polyphénoliques d'*A.platensis* se sont révélés actifs contre *S. aureus* et *E. coli* et *P. aeruginosa* qui montrent une sensibilité modérée.

Pour la spiruline fraiche on a Enregistré des zones d'inhibition de diamètre de 17.66 ± 0.94mm, 15±0 mm et 13.83±0.05mm vis-à-vis *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* respectivement. Avec la dilution [1].

L'extrait de spiruline en poudre a enregistré des diamètres 15±0.81mm, 14.33±0.47mm et 14.16 ± 0.62 mm vis-à-vis *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement avec la dilution [1]

Les dilutions [1/2], [1/4], [1/8] ne sont pas négligeables, elles ont enregistré des zones d'inhibitions à des diamètres acceptables pour ces souches. On a remarqué que chaque dilution d'extraits a enregistré un diamètre de zone d'inhibition diffère à l'autre pour toutes les souches.

Concernant la sensibilité, on a observé que le degré de la sensibilité diffère d'une souche à une autre, S. *aureus* est plus sensible que *E. coli* et *P. aeruginosa*, et *E. coli* sensible que *P. aeruginosa* pour les deux extraits polyphénoliques.

Les analyses statistiques de test antibactérien de polyphénol de spiruline sont données par le **Tableau V (Annexe VI),** la différence entre ces zones d'inhibition est révélée significative à ($p \leq 0.05$), *S. aureus* a des diamètres apparaitre significatives avec tous les dilutions sauf la dilution [1/2] pour la biomasse fraiche et des diamètres enregistrés contre *E. coli* sont révélés significatif avec tous les dilutions à l'exception de [1/2] Pour biomasse sèche.

Après la comparaison entre les zones des d'inhibitions des souches de même extrait **Tableau VI (Annexe VI)**, on a trouvé que cette différence est majoritairement non significative pour l'extrait de poudre, mais elle est révélée significative à ($p \leq 0.05$) seulement avec la dilution [1] et [1/2].

Les analyses de comparaison de l'effet antibactérien des deux extraits **Tableau VII** (**Annexe VI)** sont révélées significatives entre les trois souches avec la dilution [1/4], et non significative pour la totalité des autres dilutions pour un ($p \leq 0.05$).

Le potentiel antibactérien de polyphénol de spiruline à son état frais est révélé puissant à celle de polyphénols de spiruline en poudre, cette différence est expliquée par la richesse de spiruline fraiche en polyphénols. Selon **(MAADANE et al., 2017)** les activités antimicrobiennes des extraits de micro algues étudiés ont été attribuées à leurs teneurs en polyphénols.

D'après **(D'ABDO et al., 2012)** et **(KAUSHIK et CHAUHAN.,2008)** la cyanobactérie *A. platensis* présentait l'activité antibactérienne la plus efficace contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait polyphénolique d'*A.platensis* actif contre *S. aureus* ATCC29213, *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* sont en accord avec les résultats

(**RANIA, TAHA., 2008, SUDHA et al 2011, PRADHAN et al., 2012)** mais *P. aeruginosa* était la moins sensible D'après **(El-SHEEKH et al. 2013)** et n'accorde pas au résultat de **(MALA. R et al., 2009)** qui a trouvé que *S. aureus* (NCIM2079), *E. coli* (NCIM2065), et *P. aeruginosa* (NCIM2076) sont résistantes. Mais **(TRABELSI et al., 2010)** ont trouvé que l'activité antibactérienne est observée sur les bactéries Gram positives alors qu'elle est totalement absente chez les bactéries *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli.*

Les bactéries Gram positives sont plus sensibles que les bactéries Gram négatives. Ceci peut être attribué au fait que la paroi cellulaire chez les bactéries Gram positif est constituée d'une seule couche, tandis que la paroi cellulaire bactérienne Gram négative a une structure multicouche limitée par une membrane cellulaire externe **(ERGENE et al., 2006).**

Selon **ABEDIN et TAHA., (2008),** les différences dans l'activité des extraits contre les bactéries peuvent être dues à des différences dans les propriétés physiologiques ou biochimiques des souches algales ou à différents biotopes ou conditions de culture comme la lumière, la température et le milieu.

D'après **RATHI BHUVANESWARI et al., (2013),** La procédure d'extraction peut également entraîner des différences d'activité antimicrobienne en raison des différences dans la nature du solvant, du temps d'extraction et la solubilité et stabilité du composé antibactérien dans un solvant particulier.

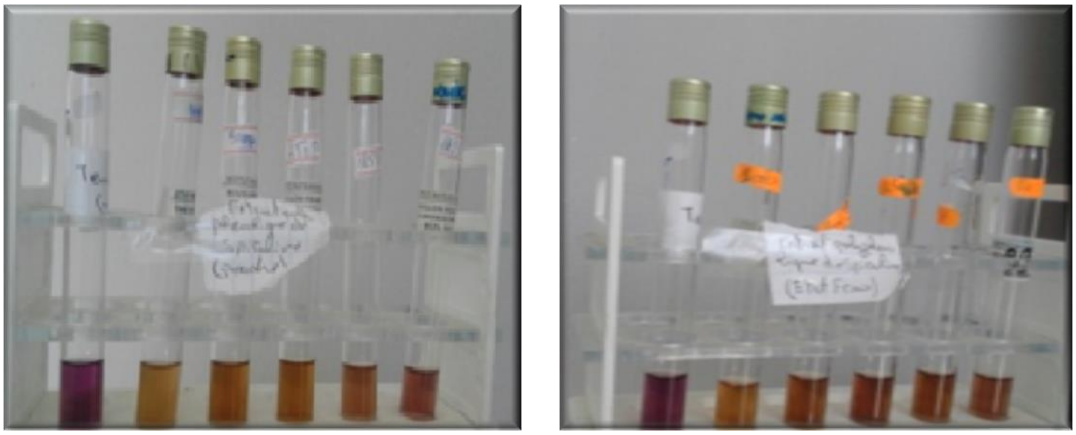
D'après **El-SHEEKH et al., (2013),** beaucoup de solvants testés étaient efficaces contre tous les micro-organismes. Cependant, l'extrait d'éthanol a indiqué une activité antimicrobienne contre plusieurs micro-organismes. Cela pourrait être lié à la présence de métabolites bioactifs solubles dans l'éthanol.

Par la comparaison à la gentamicine, l'activité antibactérienne de polyphénols d*'Arthrospira platensis* est révélée modérée.

I.3.2.2. Détermination d'activité antioxydante par test au DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits d'*A. platensis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.
Le DPPH est un radical libre organique, toujours utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité anti radicalaire des antioxydants **(Molyneux.,2004).**

Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 28.**



a) Poudre de spiruline **b)** spiruline fraiche

Figure 28 : la mise en évidence de potentiel antioxydant de polyphénols de spiruline.

La figure 29 montre l'évolution de la capacité de piégeage des radicaux libres par les deux extraits d*'Arthrospira platensis*, Où on a enregistré une augmentation rapide des courbes et une concentration de polyphénols proportionnelle.

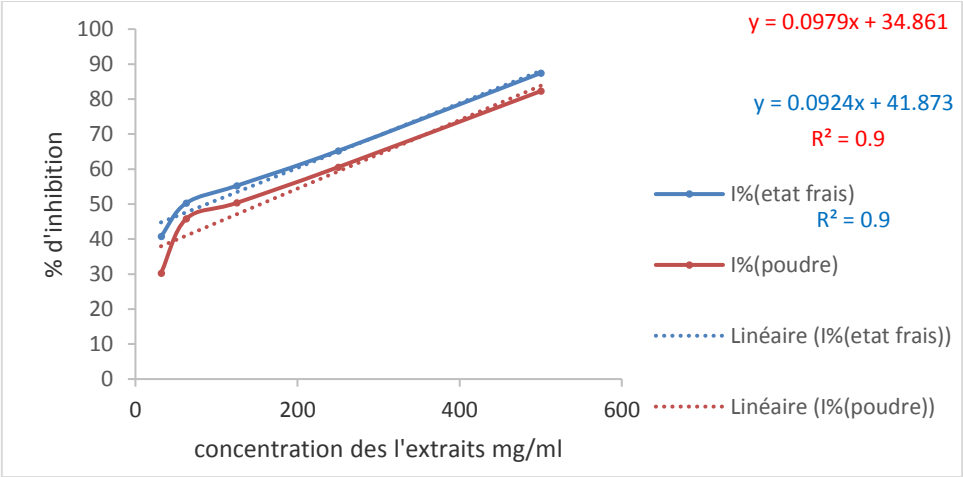


Figure 29 : courbes représentent le potentiel antioxydant des extraits polyphénoliques d'*A.platensis* de différents concentration.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits polyphénoliques de la souche A. platensis.

Les extraits éthanoliques de spiruline ayant une activité antioxydante puissante qui est montrée par le changement de couleur de la solution DPPH de la couleur violette à une couleur jaune selon la **figure 28.**

D'après la **figure 29**, On remarque que la courbe d'inhibition du radical libre par les polyphénols de spiruline en poudre est inférieur à celle de la spiruline fraiche pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 500 mg/ml, l'extrait polyphénolique de spiruline en poudre a révélé un pourcentage d'inhibition de 82,28±0.43 % tandis que l'extrait de biomasse humide a inhibée 87,94±0,44 % de DPPH. Cette activité antioxydante de spiruline fraiche serait due à sa richesse en antioxydants notamment en composés phénoliques **(BENMLIH et GANAM., 2012)** qui peuvent exercer un effet antioxydant important.

Déterminationd'IC50

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande **(BARKAT et LAIB., 2011)**. La (IC50) a été calculée à partir du graphe tracé pourcentage d'inhibition contre la concentration de l'extrait **(ABD-ELBAKY.,2009).**

Les valeurs d'IC50 pour polyphénols de spiruline en poudre et à son état frais sont indiquées dans la **figure 30.**

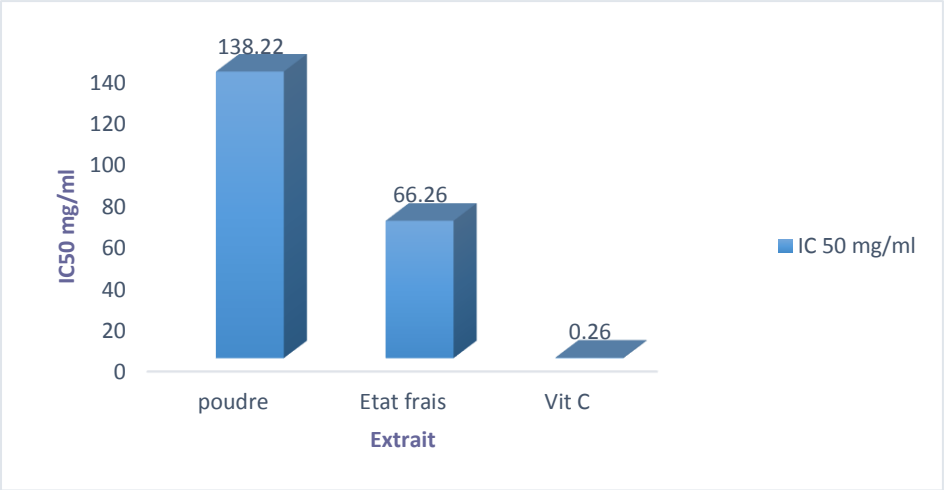


Figure 30 : IC50 de spiruline**.**

Les polyphénols de spiruline en poudre a enregistré un IC50 de138.22±0.2 mg/ml, qui est supérieur à celle de polyphénols de spiruline à son état frais qui a enregistré un IC50 de 66.26±0.12 mg/ml.

La spiruline fraiche est l'antioxydant le plus puissant par rapport à la spiruline en poudre. Cette différence en pouvoir antioxydant est due à la différence en contenue polyphénolique, où

on a enregistré une teneur en polyphénol de spiruline fraiche supérieure à celle de spiruline en poudre.

Les composés phénoliques sont classés parmi les composants de l'extrait qui répondant à l'activité antioxydante **(MALLIKARJUN et al., 2014).**

En comparaison avec la IC50 de vitamine C **(Annexe VII),** les IC50 de spiruline sont extrêmement supérieurs à celle de vit c, ce qui signifie que le pouvoir antioxydant de spiruline est très faible par rapport à celle vit C.

D'après les analyses statistiques par le test student **Tableau IX (Annexe VI)**, les résultats de l'activité antioxydante sont révélés tous significatifs à une probabilité de ($p \leq 0.05$)

Après l'évaluation et la comparaison des résultats de l'activité antibactérienne et antioxydante des polyphénols de spiruline fraiche et en poudre, on a enregistré que ces deux activités sont révélées meilleurs pour la spiruline fraiche, et faibles pour la spiruline en poudre.

Cette différence entre les deux extraits concernant leurs activité antimicrobienne et antioxydante peut être due à la diminution de la teneur en polyphénols de spiruline en poudre à cause de la conservation et ses conditions qui influent négativement sur le contenue polyphénolique telle que les contaminants, la lumière, la température et l'air.

(GUIRAUG. ,1998)

Conclusion générale

Conclusion

La présente étude a porté sur l'isolement, purification, caractéristiques *Arthrospira platensis.* Elle est pour but d'obtenir une culture axénique sur milieu solide et vise à la détermination des caractéristiques physico-chimique telle que l'humidité, le taux de cendre, la teneur en chlorophylle et en phycocyanine.

La spiruline a développé dans des conditions optimales, qui a permis de suivre leurs cinétiques de croissance par la mesure de densité optique et le poids sec et vise à l'extraction des polyphénols (éthanol /eau) de la spiruline à son état de poudre et fraiche pour étudier les caractéristiques biologiques qui est basés sur leurs pouvoir antibactérien et leurs potentiel antioxydant.

Les résultats obtenus montrent qu'une difficulté d'isolement des colonies algale caractéristique au spiruline à cause des contaminants bactériens qui gênent leur croissance mais on a constaté que le traitement par le bicarbonate étant une efficacité considérable de purification.

On a enregistré que la spiruline présente une teneur d'humidité 5,62±0.33%. Le taux de cendre 9.7%±0.13, en chlorophylle10.52±32mg.g^{-1}, et en phycocyanine 0.05mg .ml^{-1}.Ces résultats montre que *A.platensis* qui en font un aliment fonctionnel intéressant.

Les résultats d'extraction a montré une richesse de la spiruline en polyphénols. Leur dosage par le réactif Folin Ciocalteu a révélé un teneur considérable pour la spiruline fraiche de 92.16±0,08µg AG.g^{-1} par rapport au spiruline en poudre de 68.66±0.7 µg AG .g^{-1} .

On a constaté pour l'activité antibactérienne de ces extraits a été réalisée avec trois souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats ont permis de confirmer le pouvoir antibactérien des composés phénoliques de ce micro-algue par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques, elle manifeste une activité plus élevé contre *S. aureus* supérieur que *E. coli* et *P. aeruginosa* le moins sensible. L'effet d'extrait polyphénolique sur ces souches pour la spiruline fraiche reste le meilleur que la spiruline en poudre.

L'activité antioxydante que les deux extraits polyphénolique ont la capacité de piéger du radical libre DPPH, mais de degré différent. On a observé que la spiruline fraiche de IC50 de 66.26±0.12 $mg.ml^{-1}$ mieux que la spiruline en poudre de IC50 de 138.22±0.2$mg.ml^{-1}$.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, on a déduit que l'*Arthrospira platensis*

Leur culture est difficile dans le milieu solide à cause de problème des contaminants mais nous avons arrivé à éliminer la majorité des bactéries par traitement par le bicarbonate

Les extraits polyphénoliques donnent une bonne activité antioxydante et antibactérienne

Perspectives :

-On peut prédire que la spiruline par ces constituants antibactériens peut servir comme base de lutte biologique.

-tester ces activités biologiques contre le stress oxydative déclenche in vivo.

-tester l'activité antibactérienne contre les infections cutanées et digestives

-isolement de spiruline par application des antibiotiques à spectre large telle que gentamycine,

Chloramphénicol et kanamycine

Référence bibliographique

A

ABALDE. J., BETANCOURT. L., TORRES. E., CID. A., BARWELL.C. (1998). Purification et caractérisation de la phycocyanine de la cyanobactérie marine Synechococcus sp. IO9201. Plant Science, 136, (1), 109.

ABD EL-BAKY.H., El BAZ.F., El-BAROTY.G.(2009). Production of phenolic compounds from Spirulina maxima microalgae and its protective effects. African Journal of Biotechnology. 8 (24), pp. 7059-7067

ABDO.S.M., HETTA.M.H., SAMHAN. F.A., EL DIN. R.A.S., ALI.G.H. (2012). Phytochemical and antibacterial study of five fresh water algal species. Asian J Plant Sci, 11(3), 109-116

ABEDIN.R., H.M. TAHA. (2008). Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by placket-burman design for antimicrobial activity of Spirulina platensis. Global J. Biotechnol. Biochem., 3(1):22-31

ACKER. JP., MCGANN.LE. (2003). LE, Effet protecteur de la glace intracellulaire pendant la congélation. Cryobiology .4(6).2, 197.

Al-DHABI.NA. (2013) Heavy metal analysis in commercial Spirulina products for human consumption. Saudi J Biol Sci. 20: 383-8

Al-HOMAIDAN.A.A., Al-HOURI H.J., Al-HAZZANI. A.A., ELGAALY.G., MOUBAYED N. (2013). Biosorption of copper ions from aqueous solutions by Spirulinaplatensis biomass. Arabian Journal of Chemistry.).7:57–62

ALLEN.M.B.(1952). The cultivation of Myxophyceae.Arch. Mikrobiol., 17: 34-35

ANDERSEN. RA. (2005). Algal culturing techniques. Andersen RA (eds), Elsevier, pp 117–132

ASMAA. N., BOUBAKEUR.S., BOULANOUAR.B., MOHAMED.M.**(2015)**. Etude comparative des indices d'activité antioxydante des essais du Cérium et du DPPH : Application sur trois plantes médicinale locale. International Journal of Innovation and Applied Studies. ISSN 2028-9324 Vol. 13 No. 3 Nov. 2015, pp. 681-690

ATHAMENA.S., CHALGHEM.I., KASSAH-LAOUAR.A., LAROUI.S., KHEBRI.S. (2010).Activité antioxydanteet anti-microbienne d'extraits de Cuminum cyminum .L. Lebanese

Science Journal. 69-81.

AYALA.A., MANETII.G., BURGOS.R., AYALA.F., (2006) Industrial and semi industrial production of Spirulina, third world potential (modular systems) In Charpy et al. (ed.) International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development: 77-81

B

BARKAT.M., LAIB.I.(2011). Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielledes fleurs sèches de Lavandula officinalis. Revue de génie industriel, 6, 46-54.

BECKER. (1986). Clinical and biochemical evaluations of spirulina with regard to its application in the treatment of obesity. Inst. Chem. Pfanz in Nutrition Reports Int'l, Vol. 33, No. 4, pg 565.

BENAHMED.D.A. (2012). Analyse des aptitude technologiques de poudre de datte (phoenix dactylifara.l)améliorer par la spiruline. Etude de propriétésrhéologiques nutritionnelles et anti-bactériennes. Thèse de Doctorat.Université M'HAMED DOUGARA-BOUMERDES. Page 63

BENSEHAILA.S. (2016). Etude de l'effet antimicrobien et antidiabétique des probiotique en association avec de la spiruline. Doctorat. Université de Hassiba ben bouali chlef. P 72-125

BERMEJO. R., FELIPE. MA., TALAVERA. EM., ALVAREZ-PEZ.JM. (2006). Chromatographie d'adsorption en lit expansé pour la récupération de phycocyanines à partir de la microalgue Spirulina platensis. Chromatographia, 63 :1-2. 59

BERMEJO.R., TALAVERA.E.-M., ALVAREZ-PEZ. J.M., ORTE.J.C. (1997). ''Chromatographic purification of phycobiliproteins from Spirulina platensis. High-performance liquid chromatographic separation of their alfa and beta subunits''. J. Chromatogr. A., 778: 441 50.

BOCAR.K.M., BAIDLY. L., BASSENE.E. (2011). Etude quantitative de quelques pigments de la Spiruline cultivée en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle.Int. J. Biol. Chem. Sci. 5(5): 2035-2038.

BORGNE.Y. (1986). La culture des micro- algues. In : Aquaculture I (Technique et Documentation ed), Paris, 181 - 192

BOUDOUR.A. (2008). Recherche et essais de purification de *Spirulina sp*. dans différents habitats et culture *d'Arthrospira sp*. PCC 8005.Diplôme de Magister. Université Badji Mokhtar-Annaba**.** P 23,71.

BOUGANDOURA.N., (2010). Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales Sature jacalaminthas spnepta (nabta) et AjugaivaL. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. mémoire magister; université Tlemcen

BOWNE.S.W. (1964). Purification of algal cultures with cafeine. Nature, London, 204,801

BOWYER.J. W., V. B. D. SKERMAN. (1968). Production of Axenic Cultures of Soil-borne and Endophytic Blue Green Algae J. gen. Microbiol Great Britain 54, 299-306

BRANGER. B., CADUDAL. JL., DELOBEL.M., OUOBA.H., YAMEOGO. P., OUEDRAGO.D., GUERIN. D., VALEA. A., ZOMBRE. C., ANCEL.P. (2003). La spiruline comme complément alimentaire dans la malnutrition du nourrisson au Burkina-FasoArch Pediatr. 10(5) :424-31.

BROUILLAT E. (1993). Communication personnelle. Dispensaire de Maraba, Nyakizu Commune, Butare, Rwanda

BRUNETON.J., (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 2ème Ed.Lavoisier. Paris, 274-285.

C

CAMILLE.D.(2014). Pratique en microbiologie de laboratoire recherche de bactéries et de levures moisissure. Edition céline poiteaux. La voisier. Paris P 65

CANO. N., BARNOUD. D., SCHNEIDER.S. M., VASSON. M.P., HASSELMANN. M., LEVERVE, X. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer, p 255.

CARR.A., FREI. B. (1999). Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J. 13(9), 1007-1024.

CASTENHOLZ. R.W., (1970) Laboratory culture of thermophilic cyanophytes. Schweiz Z Hydrol 32 :538–551

CAUSSE. C., (2005). Les secrets de santé des antioxydants : C'est naturel, c'est ma santé. Alpen éditions s.a.m., p 30.

CELIKEL.N., KAVAS.G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech J. Food Sci.26: 174–181.

CESAARINI. J.P. (2004). Le sélénium: actualités. John Libbey Eurotext Edition, p 14.

CHAN.H., PAN. S. (2005). Bioremediation potential of spirulina: toxicity and biosorption studies of lead. Journal Zhejiang Univ. SCI. Vol 3, P 171-174

CHARPY.L., LANGLADE. M. J., ALLIOD.R. (2008). ''La Spiruline peut-elle être un atout pour lasanté et le développement en Afrique ?''. Institut de Recherche pour le Développement.Marseille. Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. 49 p.

CHRISTOPHE. P., CHRISTOPHE. S. (2011). Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, p 84.,

CIFERRI.**O**.**(1983).** Spirulina, the Edible Microorganism. Microbial. Rev. Vol. 47:551-578.

CLEMENT.**G**. (**1975**). Production et constituants caractéristiques des algues lina platensis etSpirulina maxima. Ann. Nutr. Aliment. (29): 477-487

COLLA. L.M., REINEHR.C. O., REICHERY.C., ALBERTO.J., COSTA.V. (2007). ''Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes''. Bioresource Technology, 98(7) : 1489– 1493.

CRUCHOT.H, (2008). La Spiruline, Bilan et Perspective. Thèse docteur en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon. Université de France-Comite.

D

DANSOU.D.K.(2002). Développement de la culture de la spiruline (spirulina platensis) et valorisation de celle –ci au Burkina Faso. Diplôme d'études supérieurs (D.E.S.S.). Université de Ouagadougou.Page 43-44.

DUERR. EO., EDRALIN. MR., PRICE.N.M. (1997). Facilities requirements andprocedures for the laboratory and outdoor raceway culture ofSpirulina spp. J Mar Biotechnol 5:1

DUKER.S.C., WILLOUGBY L.G.(1964). Potassium tellurite as a bacteriostatic agent inisolating algae. Nature, London, 202 (4928): 210.211.

DUPIRE. J. (2011). La spiruline un super aliment. 151p

.**E**

El-SHEEKH.M., S.M. DABOOR.S.M., SWELIM.M.A., S. MOHAMED. (2014). Production and characterization of antimicrobial active substance from Spirulina platensis.journal of microbiology. 6 (2) .112-119.

ERGENE.A., GULER. P., TAN.S., MIRICI. S., HAMMAOGLU. E., DURAN. A. (2006). Antibacterial and antifungal activity of Heracleum sphondylium subsp. artvinense. African Journal of Biotechnology; 5: 1087-1089.

F

FAIN. O. (2004). Mise au point : Carences en vitamine C. La revue de médecine interne ,25, 872–880**.**

FALQUET.J., HURNI.J.P. (2006).spiruline, aspects nutritionnels, Antenna, technology, Genève .p41

FARRAR. W.V. (1966). Techuitlatl, A Glimpse of Aztec Food Technology. Nature, 211, 341-342.

FAVIER.A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 11, 108-115

FOX .R.D. (1999).''Spiruline Technique, pratique et promesse''. Aix en provence: Edisud; 1999.

G

GIRARDIN.A., C. (2011). ''Algues et cyanobactéries''. Paris XIII. P 4.

GOUDABLE. J., FAVIER. A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme 11,115-120**.**

GREFF.M. (2011). Post'U FMC-HGE : Paris, du 24 au 27 mars 2011. Springer Edition, P 39**.**

GUIRAUD.J.(1998). Microbiologie Appliquée. Edition DUNOD Paris, p652

GUSTAFSON.K.R., CARDELLINA. J.H., FULLER. R.W., WEISLOW. O.S., KISERR.F., SNADER. K.M., PATTERSON. G.M.L., BOYD.M.R. (1989). AIDS-Antiviral Sulfolipids from Cyanobacteria (Blue-Green Algae). *J. of* the Nat'l. Cancer Institute, Bethesda, Maryland**.**

H

HALLIWELL. B., GUTTERIDGE. J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246, 501-514.

HAN.J., WANG. S., ZHANG.L., YANG.G., ZHAO. L, PAN.K. (2015). A method of batch-purifying microalgae with multipleantibiotics at extremely high concentrations.Chinese Journal of Oceanology and Limnology. (15) .288-2

HORROBIN.D.F., **EDITOR.** (**1990**), Omega-6 Essential Fatty Acids, Pathophysiology and Roles in Clinical Medicine.Wiley-Liss, New York.

HAYASHI.K., HAYASHI.T., KOJIMA.I. (1996). A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from Spirulina platensis: in vitro and ex vivo evaluation of antiherpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. AIDS Res Hum Retroviruses. 12: 1463-71.

HOUSTON.M. (2002) The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. Disponible sur : http://biomatsa.com/uploads/spirulinareprintJANA.pdf (dernière consultation le 19 oct 2015)

HUANG.J. H., LIU.H. L. (2009). Sensitivity to antibiotics and axenic culture of Oocystis borgei. J. Guangdong. Ocean University, 29(3): 37-41.

I

ICHIMURA M., KATO.S., COLL. (2013) Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. Nutr Res. 33 : 397-405

ISMAIL.MF., ALI. D.A., FERNANDO.A., coll. (2009) Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by Spirulina. Int J Biol Sci. 5 :377-87

J

JOH .B.(2006). Le cyanobactéria-Isolation,la purification et identification,procaryotes 3-38

JOURDAN.J.P.(2006). Cultivez votre spiruline: manuel de culture artisanal .Publication Antenna Technologies

JOURDAN J. P. (2012). ‘’Cultivez votre spiruline », manuel de culture artisanale’’. http://www.antenna.ch/medias/Manuel_Cultivez_votre_spiruline_REVISION_2013.pdf. Consulté le 20/10/2012.

JUDD.W.S.,CAMPBELL.C.S.,KELLOGG.E.A.,STEVENS.P.F.(2002) Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ére Edition De Boeck Université. Paris, 383.

K

KARKOS.PD., LEONG. S.C., KARKOS.C.D., SIVAJI. N. ASSIMAKOPOULOS. D.A., (2008). Spirulina in clinical practice: Evidence-based human applications. Evid Based Complement AlternatMed 1-4

KAUSHIK, P., CHAUHAN, A. (2008). In vitro antibacterial activityof laboratory grown culture of Spirulina platensis. Indian J Microbiol, 48. 348-352.

KHAN.Z, BHADOURIA.P., BISEN.PS., (2005). Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. Curr Pharm Biotechnol.6:373-379.

KIM. J.S., PARK.Y.H., YOON. B.D., OH.H.M. (1999). Establishment of axenic cultures of *Anabaena flos-aquae* and *Aphanotheca nidulans* (cyanobacteria) by lysozyme treatment. J Phycol 35:865–869.

KRANL. K., SCHLESIER. K., BITSCH. R.,HERMANN. H., ROHE.M., BOHEM.V. *(2005*). Comparing antioxidative food additives and secondary plant products—Use of different assays. *Food Chem, 93*,**KRAUS.M. P.(1966)**. Preparation of pure bluegreen algae. Nature. London, 211 (5043) : 310.

KULSHRESHTHA.A., ZACHARIA.A.J., JAROULIYA.U., BHADAURIYA .P., PRASAD. GB., BISEN.PS. (2008). Spirulina in health care management. *Curr Pharm Biotechnol*: 400-405

L

LAMELA. T., MARQUEZ. F.J. (2000). Phycocyanin production in seawater culture of Arthrospira maxima. Ciensas marinas. 26.4 :607-619.

LANDIS. G.N., TOWER. J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech. Ageing Dev. 126: 365–379

LANN. K.L., FERRET.C., VAANMEE.L., SPAGNOL.C., LHUILLERY.M., PAYRIC., STIGER-POUVREAU.V.(2012)."Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability". Phycological Research, 60.1 : 37–50.

LECLERC.H., GAILLARD. J-L., SIMONET. M. (1995). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs. Paris.

LEE. Y.K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods:their limitation and potential. *J. Appl. Phycol*., 13.4: 307-315.

LIN. W., CHEN. D., LIU. X.Y. (2000). Marine microalgal axenation and comparison of growth characteristics between natural and axenic marine microalgae. *Oceanol. Limnol. Sinica*, 31(6): 647-652.

LOPEZ. A., RICO. M., RIVERO. A.,SUAREZ.D.E., TANGIL.M. *(*2011), The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon* scoparium algae extracts. Food Chem.125. 1104–1109.

LUCIA.S., DIEGO. R., EDIE.M., HECTOR. G., JOSNELL.M., LEOPOLDO. N. (2010). Une stratégie visant à obtenir des cultures axéniques de cyanobactéries de Arthrospiraspp. World J Microbiol Biotechno .l 27 :1045–1053.

LUMILLA. M., LADISLAVA.M., JARMILA.V. A., JANA. O., JIRI.M., JIRI .S., TUNDE J.(2015). Phenolic Content and Antioxidant Capacity inAlgal Food Products. Molecules.20.1118-1133.

M

MAADANE.A., MERGHOUB.N., El MERNISSIL.N., TARIK.A., AMZAZI.S.,WAHBY.I., BAKRI.Y.(2017) Antimicrobial activity of marine microalgae isolated from morocccan coastlines. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences. .6.6.1250-1256

MALA.R., SAROJINI. M., SARAVANABABU. S., UMADEVI.G., (2009). Screening for antimicrobial Activity of crude extracts of spirulina platensis. Journal of Cell and Tissue Research. 9.3:1951-1955

MALLIKARJUN.GKG., UDAYA. S.K., SARADA. R., RAVISHANKA. GA.(2014). Supercritical CO_2 extraction of functional compounds from Spirulina and their biological activity.J. Food Sci. Technol. 52, 3627-3633.

MANET.A. (2016). La spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils `a l'officine. Thèse docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie de Grenoble. Université Grenoble Alpes .P 78

MARINHO-SORIANO. E., FONSECA. P.C., CARNEIRO. M.A.A., MOREIRA. W.S.C. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol*, *97*.2402–2406.

M'BAYE.B. K., LÔ. B., BASSENE.E. (2011). Etude quantitative de quelques pigments de la Spiruline cultivée en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle. Int. J. Biol. Chem. Sci.5.5: 2035-2038.

McCARTY .MF., BARROSO-ARANDA. J., CONTRERAS. F. (2010). Potential complementarity of high-flavanol cocoa powder and spirulina for health protection. Med Hypotheses.74.3:370 .

MELINDZ .J., GRIFFTHS .C., GARCIN .R., P. VAN HILLE., HARRISON. S T.L. (2011). Interférence de pigment dans l'estimation de la concentration de la biomasse d'algues microscopiques par densité optique.Journal of Microbiological Methods.85.119-123

MEYER.A., DEIANA J. (1988). Cours de microbiologie générale. Doinéditeurs, paris. P 201

MISBAHUDDIN.M., AZMM.I., COLL., (2006). Efficacy of spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study. Clin Toxicol Phila P. 44: 135-41

MOHSEN.S.M., AMMAR. A.S.M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corntassel extracts. Food Chem., 112: 595-598.

MOLYNEUX.P. (2004). ‘‘The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity’’. Songklanakarin J. Sci. Technol., 26: 211–219.

MUHLING.M.(2000). Characterization of Arthrospira (Spirulina) strains., Durham theses, Durham University.

O

OULD BELLAHCEN.T., BOUCHABCHOUB A.1., MASSOUI.M., EL YACHIOUI .M .2013. Culture et production de spirulina platensis dans les dans les eaux usees domestiques.14 :107-122.

P

PAPAZIAN. L., Roch. A., (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Edition Springer, p 153.

PARK HJ, LEE YJ et COLL. (2008) A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans. Ann Nutr Metab.52: 322-8

PELMONT J. (1995). Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble. Volume 2.

PEREZ M. B, CALDERON N.L, CROCI C.A. (2007). ‘’Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (Rosmarinus officinalis L.)’’. Food Chemistry, 104, 2 : 585-592.

PIERLOVISI.C. (2008). ‘‘Composition chimique de la spiruline. colloque international sur la spiruline- Toliara Sud – Ouest de Madagascar.

PIERRE A. R, PIERRE A. (1977). Les méthodes d’isolement et de purification des Cyanophycées. Cah. ORSTOM, sér. Biol.REYNAUD O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Microbiologie, Centre de Dakar, B.P. 1386, Dakar, Sénégal. vol. XII, no 2, : 121.128

PONCE .A.G., FRITZ R., DEL ALLE C., ROURA SI. (2003). ‘‘Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard’’. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic, 36 : 679-684

POPOVICI. C., SAYKOVA. I., TYLKOWSKI .B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel 4, 25-39.

PORTES.E. (2008). Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat : Université de BORDEAUX I**.**

PRADHAN. J., DAS. B.K., SAHU. S., MARHUAL. N.M., SWAIN. A.K., MISHRA.B.K. (2012). Traditional antibacterial activity of freshwater microalga Spirulina platensis to aquatic pathogens. Aqua. Res. 43 (9): 1287-1295.

PROVASOLI., PINTER., PACKER.(1951). Use of antibiotics on obtaining pure culture of algae
and protozoa. Proc. Am. Soc. Protocol., 2: 6

PRYOR. W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, Free Rad. Biol. Med, 28: 141–164.

Q

QUILLET. M. (1975). Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les spirulines. Ann. Nutr. Aliment. 29 :553-561.

R

RAHAL.K. (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème Ed, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.

ROMAY.C., GONZALEZ.R., LEDON.N., REMIREZ. D., RIMBAU. V. (2003). ''C Phycocyanin: ABiliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects''. CurrentProtein and Peptide Science, 4: 207-16.

RANGSAYATORN.N., POKETHITIYOOK.P., UPATHAM. E.S., LANZA GR. (2004). ''Cadmiumbiosorption by cells of Spirulina platensis TISTR 8217 immobilized in alginate and silicagel''. Environ Int., 30(1) :57-63

RANIA. M.A.A, TAHA. H.M. (2008). Antibacterial and Antifungal Activity of Cyanobacteria and Green Microalgae. Evaluation of Medium Components by Placket-Burman Design forAntimicrobial Activity of Spirulina platensis. Global J. Biotechnol. Biochem. 3 (1): 22-31.

RATHI BHUVANESWARIL.G., SHUKLAL.S.P., M. MAKESH1., THIRUMALAIS - ELVAN.S., ARUN SUDHAGAR.S., KOTHARI ARVINDSINGHD.C. (2013). Journal of Aquaculture - Bamidgeh, .65(932). pages.8.

RATHSACK.R., LOHS K. H. (1968). Veranderüngenim Blaualgenmedium nach Riintgenbestrahlung. Studiu biophysica, 6 (1): 49-56

S

SAINI MK, SANYAL SN. (2014). Targeting angiogenic pathway for chemoprevention of experimental colon cancer using C-phycocyanin as cyclooxygenase-2 inhibitor. Biochem Cell Biol Biochim. 92 :206-18.

SALL.M.G., DANKOKO G., BADIANE M., EHUA E. et KUAKUWI N. (1999). Résultats d'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la spiruline à DAKAR (à propos de 59 cas). Médecine d'Afrique noire, 46(3), 143-146

SARADA. R., PILLALI. MG., RAVISHANKAR.GA.(1999). phycocyanine de spiruline sp.: Influence du traitement de la biomasse sur le rendement de la phycocyanine, analyse de l'efficacité des méthodes d'extraction et des études de stabilité sur la phycocyanine. Process Biochemestry, 34(8), 795

SGUERA. S.(2008).Spirulina platensis et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques.

SHALABY.E.A., SHANAB.M.M., SINGH.V.(2013). Comparaison of DPPH and ATBS assay for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *spirulina platensis*.indian journal .Geo-marine sciences.42(5).556-564.

SHARMA, O. P., BHAT, T. K.(2009).DPPH antioxidant assay revisited, Journal of Food Chemistry, 113, pp.1202–1205.

SINGLETON .V.L., ROSSI. J.A. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagent". American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.

SOKMEN.L. B. B., AYDIN. S., KINALIOGLU.K. (2012). Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species Diploschistes scruposus (Schreb.) Norman. IUFS Journal of Biology 71(1), 43-51.

SONI.B., TRIVEDI.U., MADAMWAR. D. (2008). Une nouvelle méthode de chromatographie d'interaction hydrophobe en une seule étape pour la purification de la phycocyanine de Phormidium fragile et sa caractérisation pour la propriété antioxydante.

STANIER R. Y ., VAN NIEL C. B. (1962) . The concept of a bacterium. Arch. Mikrobiol. 42: 1735.

STANIER. R. Y. (1974). Division I, The Cyanobacteria. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. Bouchanan R. E and Gibbon N. E. p 22.

STEWART. D. E., FARMER.F. H. (1984). Extraction, Identification and Quantitation of Phycobiliproteins Pigments from Phototrophic Plankton. Limnology and Oceanography, 29, No. 2, 392

SUDHA. SS., KARTHIC. R., RENGARAMUNJAN. J., ATHULYA. (2011). Antimicrobial activity of Spirulina platensis and Aphanothece sp. on selected clinical bacterial isolates and its antioxidant activity. South As. J. Biol. Sci. 1: 87-98.

T

TAKAI . (1991). Effect of water soluble and water insoluble fractions of spirulina over serum lipids and glucose resistance of rats in J. Japan Soc. Nutr. Food Science, 44:273-277

TASSIGNY .M., LAPORTE.G., POURRIT. R. (1969). Recherches sur les techniques de purification descultures algales : élaboration des méthodes applicables aux Desmidiales et Cyanophycées filamenteuses. Diatomées. Ann. Inst. Past., Paris, 117 : 64-75.

TCHAN.Y. T, GOULD.J.(1961). Blue-green algae.Natttre, London, 192 : 1274

TRABELSI.L., BEN OUADA.H., BASSA.H. **(2010).** Activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie flamenteuse *Arthrospira platensis*. Phytothérapie .8 : 282–28

TREKI, A.S., MERGHEM, R. et DEHIMAT, L. (2009). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée : Thymus hirtus. Sciences & Technologie, 29: 25-29.

U

USHARANI .G., SARANRAJ .P et KHANCHANA. D. (2012). Spirulina Cultivation. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 2012 , 3(6): 1327-1341

V

VAARA.T, VAARA. M, NIERNRLD. S.(1979). Two improved methodsfor obtaining axcnic culturesof cyanobacteria. Appl. environ.Microbiol. 38: 1011-101

VALKO. M., RHODES. C.J., MONCOL. J., IZAKOVIC. M., MAZUR. M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol Interact, 160: 1–40

VENKATARAMAN.G. S. (1969). - In "The cultivation of Algae", I.C.A.R., New Delhi.

VON DOHREN.H., KLEINKAUFH. (2001). Peptide antibiotics products of secondary metabolism.Wiley-vch, Germany, pp 305–9

VONSHAK.A. (1997). Out do or mass production or Spirulina: the basicconcept.In: Spirulina platensis (*Arthrospira*):Physiology, Cell-Biologyand Biotechnology.pp.Taylorand Francis,London,UK. 79 99.

VONSHAK.A .(2002).« Spirulina platensis (Arthrospira) :Phisiology, cell-Biology and Biotechnology».Israel

W

WANG.X., QUINN. P. J. (2006). The structure and phase behaviour of α-tocopherolrich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. Biochimie 88, 1883-1888.

WHITTON. A. B. (2012). Ecology of Cyanobacteria II. Durham University Durham United Kingdom New York London

WIERINGA.K. T.(1968). A new method for obtainingbacteria free cultures of blue-green algae. Antonievan Leeuwenhoek, 34: 54-56.

WIHITTON.R. A., et POTTS.M. (2000). introduction to the cyanobacteria, 1-11 in the ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space,Ed Boston,kluwer Acadimic publishers

WOLFE. K., Wu. X., Liu. RK. (2003). Antioxidant activity of apple peels. J. Agric. Food Chem. 51, 609-614.

Annexes

Annexe I

Composition du milieu N1

Eau distillée	100 mL
Bicarbonate de sodium :	2 g

pH ajusté à 10

Composition du milieu N2

Eau distillée	100 mL
Bicarbonate de sodium :	8 g

pH ajusté à 10

Composition du milieu N3

Eau distillée	100 mL
Bicarbonate de sodium :	15 g

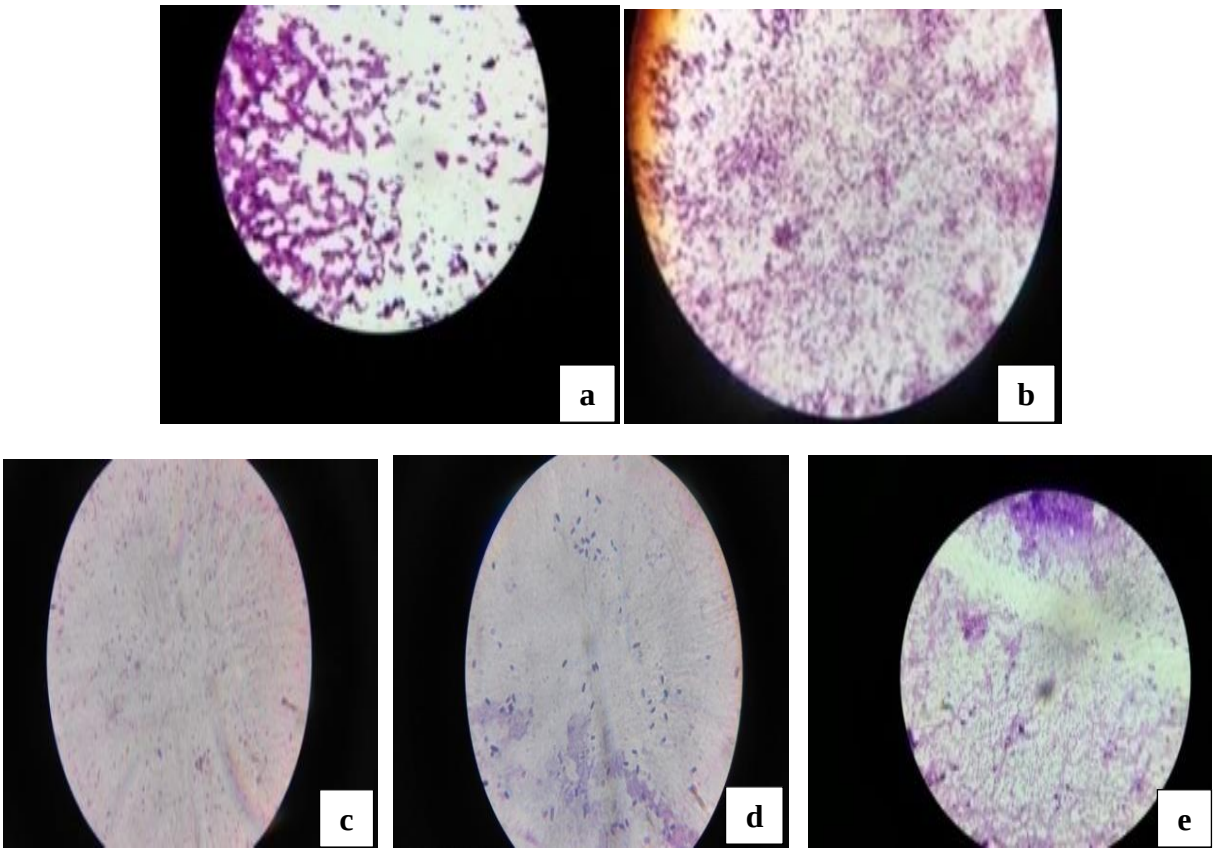
pH ajusté à 10

Composition du milieu solide pour isoler la spiruline

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

Le pH est ajusté à 10.

Annexe II



a)Cocci Gram- b)Bacille Gram^{-} avec une coloration bipolaire. c)Monocoque Gram^{+}.

d)Diplocoque Gram+ e)Cocci Gram+ en chainette

Figure01 : Observation microscopique des contaminants de spiruline après coloration de Gram à partir des colonies isolées sur milieu Zarrouk gélosée

Annexe III

Tableau I : les dilutions des polyphénols dans le DMSO

Dilution	1	1/2	1/4	1/8
Concentration mg/ml	400	200	100	50



Figure 02 : Culture de spiruline traitée par Bicarbonate, après conservation

Annexe IV

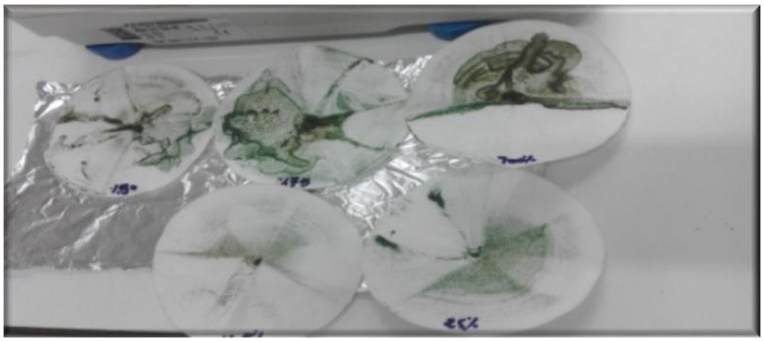


Figure 03: détermination de poids sec de spiruline.

Tableau II : détermination de poids sec.

Dilution %	**DO**	**Poids Sec (g)**
100%	1.685	0.0941
75%	1.333	0.0234
50%	0.916	0.0178
25%	0.514	0.021
12.50%	0.429	0.007

Tableau III : Le suivit de l'évolution de biomasse de spiruline

Date	DO	biomasse g/l	date	DO	biomasse g/l
Jeu 19/4	0.8	0.625	Dim 6/5	2.143	1.794
Ven 20/4	0.845	0.66	Lun 7/5	2.187	1.832
Sam 21/4	0.95	0.755	Mar 8/5	2.7	1.9
Dim 22/4	1.183	0.958	Mer 9/5	2.295	1.925
Lun 23/4	1.252	1.018	Jeu10/5	2.379	2
Mar 24/4	1.35	1.104	Vend 11/5	2.522	2.125
Mer 25/4	1.416	1.161	Sam 12/5	2.65	2.2
Jeu. 26/4	1.526	1.257	Dim 13/5	2.76	2.331
Ven 27/4	1.6	1.321	Lun 14/5	2.891	2.44
sam28/4	1.699	1.407	Mar 15/5	3	2.54
Dim 29/4	1.773	1.472	Mer 16/5	3	2.54
Lun 30/4	1.836	1.527	Jeu17/5	3	2.54
Mer 2/5	1.887	1.571	Ven 18/5	3	2.54
Jeu 3/5	1.97	1.643	Sam 19/5	3	2.54
ven 4/5	2.08	1.73	Dim 20/5	3	2.54
Sam 5/5	2.1	1.757	Lun 21/5	3	2.54

Annexe V

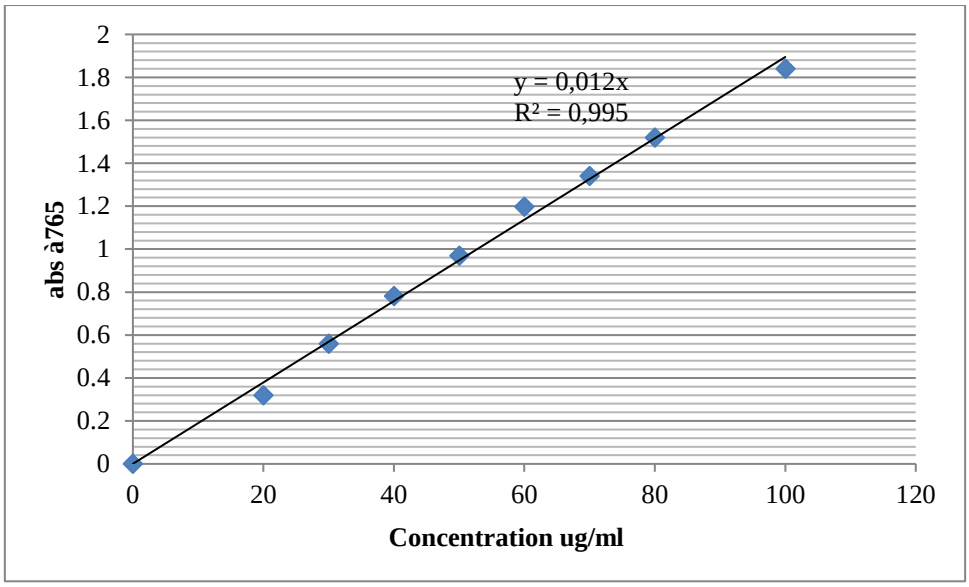


Figure 03 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Annexe VI

Tableau IV : Activité antimicrobienne de polyphénol de spiruline.

Souche	Diamètre des zones d'inhibition									
	Dilutions de l'extrait de spiruline en fraiche					Dilutions de l'extrait de spiruline en poudre				
	1	1/2	1/4	1/8	ATB	1	1/2	¼	1/8	ATB
E.coli ATCC 25922	15± 0	13.16 ± 0.05	13.66± 0.22	12.5± 0.16	26.66 ±1.69	14.33 ± 0.47	13.5± 0.40	13± 0.	12.66 ± 0.47	24.33± 0.47
P. aeruginosa	13.83 ±0.05	11.66 ± 0.22	13.33± 0.22	13.66 ± 0.22	24.66 ±0.47	14.16 ± 0.62	12.33 ±0.47	11.83 ± 0.23	12.66 ± 0.47	22.66 ± 0.47
S.aureus ATCC 29213	17.66 ± 0.94	14± 0	14.33 ± 0.47	13.16 ± 0.23	18.33 ±2.86	15 ± 0.81	13.33 ± 0.47	12 ± 0.81	14± 0.81	28± 2.16

Tableau V : comparaison entre les effets des doses par test student

	EXTRAIT D'ETAT FRAIS						**EXTRAIT D'ETAT POUDRE**					
	1&1/2	**1/2&1/4**	**1/4&1/8**	**1&1/4**	**1&1/8**	**1/2&1/8**	**1&1/2**	**1/2&1/4**	**1/4&1/8**	**1&1/4**	**1&1/8**	**1/2&1/8**
E.coli	S/NS	NS/S	NS/S	S/NS	S/NS	NS/S	S/NS	NS/S	S/NS	S/NS	S/NS	S/NS
S.aureus	S/NS	NS/S	S/NS	S/NS	S/NS	S/NS	S/NS	NS/S	S/ NS	NS/S	NS/S	NS/S
P.aeruginosa	S/NS	S/NS	NS/S	NS/S	NS/S	S/NS	S/NS	NS/S	NS/S	S/NS	S/NS	NS/S

S : significatif NS : non significatif

Tableau VI : Comparaison entre L'effet sur les souches pour même extrait

	EXTRAIT D'ETAT POUDRE			**EXTRAIT D'ETAT FRAIS**		
	E.coli/ S.aureus	***E.coli/ P.aeruginosa***	***S.aureus/ P.aeruginosa***	***E.coli/ S.aureus***	***E.coli/ P.aeruginosa***	***S.aureus/ P.aeruginosa***
C1	NS/S	NS/S	NS/S	S/NS	S/NS	S/NS
C1/2	NS/S	NS/S	S/NS	S/NS	S/NS	S/NS
C1/4	NS/S	NS/S	S/NS	NS/S	NS/S	NS/S
C1/8	NS/S	NS/S	NS/S	NS/S	S/NS	NS/S

Tableau VII : comparaison de l'effet antibactérien du deux extraits

Les concentrations	**Les souches**		
	S.aureus /S.aureus	***E.coli/ E.coli***	***P.aeruginosa /P.aeruginosa***
C1	S/NS	NS/S	NS/S
C1/2	NS/S	NS/S	NS/S
C1/4	S/NS	S/NS	S/NS
C1/8	NS/S	NS/S	NS/S

Tableau VIII : Activité antiradicalaire des extraits de spiruline.

Concentration de l'extrait mg/ml	**31.25**	**62.5**	**125**	**250**	**500**
I%(E.F)	40.76± 0.041	50.26 ±0.041	55.26± 0.11	65.2± 0.062	87.44± 0.43
I%(E.P)	30.24± 0.42	45.75 ±0.040	50.35± 0.062	60.55 ± 0.066	82.28 ± 0.043

Tableau IX : comparaison entre l'effet antioxydant de différentes concentrations de spiruline

Extrait / Concentration mg/ml	**Extrait de spiruline fraiche**	**Extrait de spiruline en poudre**
31.25/ 62.5	S/S	S/S
62.5/ 125	S/S	S/S
125/ 250	S/S	S/S
250/ 500	S/S	S/S
31.25/ 125	S/S	S/S
31.25/ 250	S/S	S/S
31.25/ 500	S/S	S/S
62.5/ 250	S/S	S/S
62.5/ 500	S/S	S/S

Tableau X : Comparaison entre la capacité antioxydant des deux extraits de spiruline

Extrait / Concentration	Extrait de spiruline poudre VS fraiche
31.25/ 62.5	S/S
62.5/ 125	S/S
125/ 250	S/S
250/ 500	S/S

Annexe VII

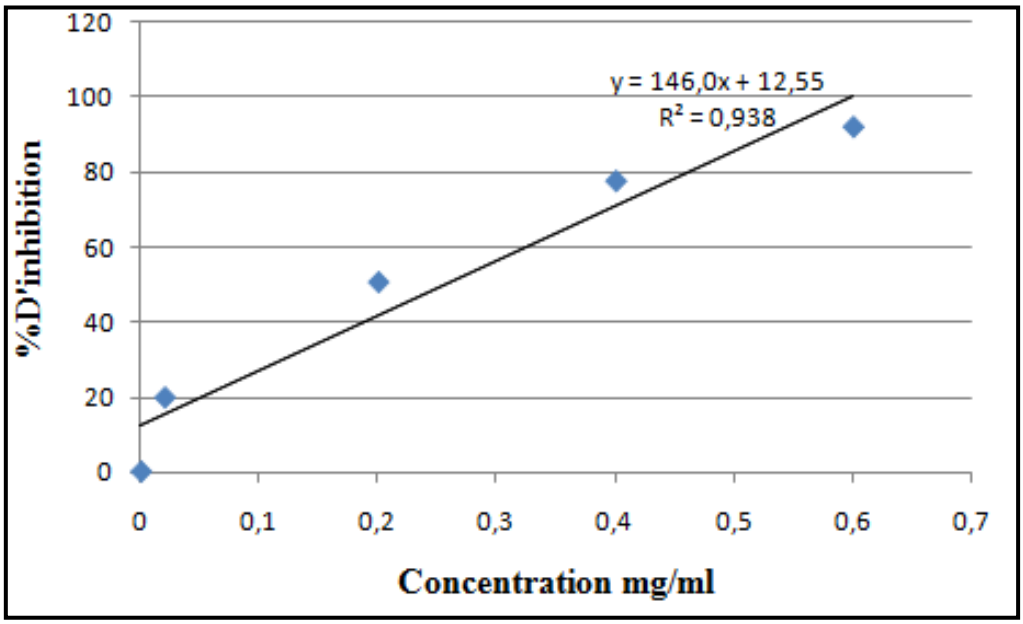


Figure 04: courbe d'étalonnage de vitamine C