

UNIVERSITE DE BLIDA 1
Faculté de des sciences de la nature et de la vie
Département de Biotechnologies

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Agroalimentaires

Présentée par

IMENE CHENTIR

THEME

**Optimisation de la culture de Spiruline et son impact
sur ses performances nutritionnelles**

Devant le jury composé de:

| | | | |
|----------------------|---------------|-------------|----------------------------|
| A. Benrima | Prof., | USDB | Présidente |
| A. Doumandji | Prof., | USDB | Directrice de thèse |
| A. Hadj Ziane | Prof., | USDB | Examinatrice |
| A. Ferradji | Prof., | ENSA | Examineur |
| M. Nasri | Prof. | ENIS | Examineur |

Blida, 2018

Résumé

Au cours de ce travail, la valorisation d'une souche autochtone de spiruline (*Arthrospira* sp.) a été envisagée. Dans une première partie, les conditions optimales de croissance en termes de lumière et de température ont été identifiées, en mode batch, et son profil biochimique intracellulaire en termes de sucres, lipides, caroténoïdes et phycocyanine a été établi. Intermédiairement, à travers l'étude de l'effet de l'intensité de la lumière et de la température sur la productivité en biomasse et en teneur en phycocyanine, les conditions de lumière favorisant la production de la phycocyanine sont inversement proportionnelles à la croissance. Pour avoir une idée plus développée sur ce phénomène, et de trouver un compromis entre la croissance et la synthèse de métabolites à valeur ajoutée, un mode de culture en deux phases a été adopté en utilisant la méthode des plans d'expérience dans la phase II de culture. Le profil biochimique suite à ce mode de culture, est 3,55, 1,73, 9,55, 2,92 et 1,46 fois supérieur en terme de carbohydrates, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et production d'EPS par rapport aux teneurs initialement obtenues dans les conditions optimales de croissance, sans restriction de productivité. Dans une seconde partie, les exopolysaccharides contenus dans les EPS ont été valorisés, et sont doués d'une bonne résistance thermique, d'un comportement de nature non-newtonienne par cisaillement, un comportement prédominant de type gel, d'une bonne résistance aux cycles consécutifs de chauffage et de refroidissement, et possède une activité anti radicalaire et un effet chélateur intéressant à des faibles concentrations. Dans un troisième volet, l'extrait de phycocyanine a été valorisé et est hautement soluble à pH supérieur ou égale 6,0, stable à une température ne dépassant pas les 50 °C et répondant bien à la thermostabilisation à 60 °C par ajout de polyols, avec des propriétés fonctionnelles et biologiques intéressantes dose dépendantes. Le dernier chapitre de cette thèse a pour but l'étude d'une application biotechnologique innovante impliquant l'ajout de l'extrait de phycocyanine dans des films à base de gélatine. Les films obtenus sont qualifiés de bioactifs, résistants à une température allant jusqu'à 250 °C, doués d'une activité anti-UV, avec maintenance de la résistance et l'élasticité de la gélatine.

Mots clé : *Arthrospira* sp., culture, caractérisation, valorisation, induction, métabolites, EPS, phycocyanine, film bioactif.

Abstract

In this work, we considered the valorization of an autochthonous *Spirulina* strain (*Arthrospira* sp.). In the first part, we defined the optimal growth conditions of light and temperature in batch mode, and established its intracellular biochemical profile in terms of sugars, lipids, carotenoids and phycocyanin. Intermediately, by studying the effect of light intensity and temperature on the productivity in biomass and phycocyanin content, we have shown that the light conditions favoring the production of phycocyanin are inversely proportional to growth. In order to have a more developed idea on this phenomenon, and to find a compromise between the growth and the synthesis of value-added metabolites, we experimented a mode of culture in two phases by using the plan of experiment in phase II of culture. The biochemical profile following this mode of culture is 3,55, 1,73, 9,55, 2,92 and 1,46 times higher in terms of carbohydrates, lipids, total carotenoids, phycobiliproteins and EPS production compared to the contents initially obtained under optimum growth conditions, without restricting the productivity. In the second part, the exopolysaccharides contained in EPS are valued. *Arthrospira* sp. produces exopolysaccharides with good thermal resistance, non-Newtonian behavior, predominant gel-like behavior, good resistance to consecutive heating and cooling cycles, and anti-radical activity and an interesting chelating effect at low concentrations. In the third part, the phycocyanin of *Arthrospira* sp. is valued. The phycocyanin extract is highly soluble at higher pH or equals 6.0, stable at a temperature not exceeding 50 ° C and responding well to the thermostabilization at 60 ° C by the addition of polyols, and has functional and biological properties of interesting dependent doses. The last part of this thesis aims at studying an innovative biotechnological application involving the addition of phycocyanin extract from *Arthrospira* sp. in gelatin-based films. The films obtained are bioactive, resistant to a temperature up to 250 ° C, endowed with an anti-UV activity, and maintain the strength and elasticity of the gelatin.

Key words: *Arthrospira* sp., Culture, characterization, enhancement, induction, metabolites, EPS, phycocyanin, film bioactive

ملخص :

حاولنا عبر هذا العمل تمييز سلالة محلية من بكتيريا سيبرولينا (*Arthrospira sp.*) عبر أربع مراحل. المرحلة الأولى قمنا بتحديد الظروف المثالية لنمو البكتيريا من حيث الإنارة و درجة الحرارة، عبر طريقة باتش mode batch ، كما أننا قمنا بتحديد هويتها البيوكيماوية مابين خلوية، من حيث السكريات، الدهون، الكاروتينات، و الفيكوسيانين. وكذا تأثير كل من الإنارة و درجة الحرارة على إنتاج المادة الحيوية و الفيكوسيانين، ومنه استطعنا أن نبين أن ظروف الإنارة التي تزيد من إنتاج الفيكوسيانين تؤثر سلبا على نمو البكتيريا. وبهدف الوصول إلى فهم أعمق لهذه الظاهرة وإلى حل وسط بين النمو وإنتاج مستقلب ذات قيمة مضافة، جربنا نموذج لتربية البكتيريا عبر مرحلتين، حيث أننا وظفنا الجانب التجريبي في المرحلة الثانية، و نتج عن هذه المرحلة النموذج البيوكيماوي التالي ، و أكبر بـ 9,55, 2,92, 1,46, 1,73,3,55 مرة من حيث مجموع السكريات و الدسم و الكاروتينيات، و الفيكوبيليروتين، و إنتاج لل (إ ب س) بالنسبة للمواد المتحصل عليها في البداية عبر ظروف النمو المثالية، وهذا دون كبت الإنتاج. أما في المرحلة الثانية من دراستنا فقد قمنا بتثمين الإيكزو بولي ساكاريد المتواجدة في ال (إ ب س) ، و تتميز الإكزو بولي ساكاريد التي تنتجها *Arthrospira sp* بمقاومتها للحرارة ، وبأنها ذات سلوك ذو طابع غير نيوتوني بالنسبة للتقطيع ، و ذات طابع يغلب عليه الصورة الهلامية ، و ذات مقاومة جيد لدورات متتالية من الحرارة المرتفعة و المنخفضة ، كما أنها تمتاز بتأثير مضاد للأوكسدة وتأثير مضاد للاستقلاب مثير للاهتمام عند تركيبات منخفضة. بينما المرحلة الثالثة قمنا عبرها بتركيز على الفيكوسيانين التي تنتجها *Arthrospira sp* ويمتاز مستخلص الفيكوسيانين بقدرة انحلال كبيرة في الأوساط ذات مستوى حموضة أكبر من أو يساوي 6، و يكون مستقر في درجات حرارة لا تتعدى 50° مئوية ، وله قابلية للاستقرار الحراري في 60° مئوية عبر إضافة البوليول ، كما أنه يمتلك خصائص وظيفية و بيولوجية مثيرة للاهتمام حسب التركيز. أم المرحلة الأخيرة من هذه الأطروحة فنتمحوور حول استعمال بيوتكنولوجيا مبتكر يشمل إضافة مستخلص الفيكوسيانين التي تنتجها *Arthrospira sp* إلى غلاف ذات قاعدة جيلاتين ، و نتج عن هذه العملية غلاف ناشط بيولوجيا ، يتحمل درجات حرارة تصل إلى 250° مئوية ، كما أنه يمتاز بمقاومته للأشعة ما فوق البنفسجية و محافظته على الطابع المرن للجيلاتين

الكلمات المفتاحية : *Arthrospira sp* ، التربية البكتيرية ، تشخيص ، تثمين ، استقراء ، مستقلب ، إ ب س ، فيكوسيانين ، غلاف ناشط بيولوجيا .

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, **Professeur Doumandji A.**, pour avoir dirigé cette thèse, pour avoir su me conseiller tout en me laissant travailler librement, sa disponibilité et ses qualités humaines. Je suis très honorée de partager avec vous ce moment solennel qui clôture mes études.

Mes plus profonds remerciements vont au **Professeur Nasri**. Je souhaite vous adresser toute ma reconnaissance et gratitude pour m'avoir encadré avec patience, rigueur et disponibilité, mais surtout pour m'avoir offert l'occasion de travailler dans les meilleures conditions, dans un environnement scientifique stable, fait connaître l'esprit et la vie dans un vrai laboratoire de recherche.

Mes plus profonds remerciements vont au **Professeur Ouada H. B.** Je vous adresse ma profonde reconnaissance pour m'avoir initié à la recherche à travers le mystérieux monde des autotrophes aquatiques et pour tous vos efforts qui ont joué un rôle important dans la réalisation de ce travail. Vos conseils et votre perception de la recherche me marqueront à jamais.

Aux membres du jury

Mes vifs remerciements vont au **Professeur Benrima A.** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Veuillez trouver, chère Professeur, le témoignage de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

Mes vifs remerciements vont au **Professeur Hadj Ziane A.** pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury en tant qu'examineur. Veuillez croire, chère professeur, à l'assurance de mon respect et de ma reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements au **Professeur Ferradji A.** pour son honorable présence dans ce jury en tant qu'examineur. Veuillez croire, cher professeur, à l'assurance de mon respect et de ma reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements au **Professeur Nasri M.** pour son honorable présence dans ce jury en tant qu'examineur. Veuillez croire, cher professeur, à l'assurance de mon respect et de ma reconnaissance.

J'adresse mes remerciements au Dr. Jridi, Grâce à toi j'ai compris que rien n'est impossible dans le monde de la recherche.

Je tiens à remercier le Dr. Zili F. et Madame J. Ammar, de l'INSTM, pour leur disponibilité et leur collaboration.

Mes vifs remerciements vont au Dr. HadjSadok A. pour m'avoir initié au mystérieux rhéomètre ainsi que pour sa disponibilité inconditionnelle et son efficacité.

Je tiens à remercier également l'ensemble collègues que j'ai croisé durant ma thèse pour leur collaboration et sympathie.

Je tiens à remercier mes professeurs de graduation au département de biotechnologies (Ex-Agronomie) qui ont contribué à ma formation et ont eu un impact sur ce que je suis à présent, je pense tout particulièrement au Dr. Kadri Brahim, Pr. Djazouli, Mr. Amalou Djamel et Pr. Boutekrabt Lynda.

Je tiens également à remercier Amina et Naima de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour leur grand cœur, leur Serviabilité ainsi que leur amitié. Soyez heureuses.

A mes parents

Tout ça est grâce à vous et à votre soutien inconditionnel durant ces années de thèse. Un grand **MERCI d'avoir financé ma thèse du premier jusqu'au dernier jour**, merci de m'avoir écouté, soutenu et conseillé à chacune des étapes de cette thèse. **MERCI** d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir laissé voler de mes petites ailes, d'avoir accepté et soutenu mes choix, rares sont les parents capables de le faire, je l'ai compris. Je vous aime du plus profond de mon cœur !

Au meilleur frère au monde !

MERCI pour ton soutien et pour tous ces moments où tu as été là pour moi, tes conseils et ta sagesse ont toujours été d'une précieuse utilité. Je te souhaite tous plein de bonnes choses dans ta vie petit frère ! Je t'aime fort.

A mes amis d'hier, d'aujourd'hui et de demain

A tous mes amis qui étaient là pour moi sans condition, sans hésitation. Je pense tout particulièrement à Sarah, Asma Gnouma, Hadjer, et Walid.

A la mémoire de ma regrettée grand-mère, qui nous quitté le 28/05/2018, lors de la finalisation de mon manuscrit de thèse, j'espère que tu es fière de moi là où tu es, repose en paix, je t'aime très fort.....

Tables des matières

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 18 |
| CHAPITRE 1 : Généralités sur les cyanobactéries..... | 21 |
| 1.1. Taxonomie..... | 21 |
| 1.2. Morphologie..... | 22 |
| 1.3. Ecologie | 22 |
| 1.4. Intérêt et utilisation..... | 23 |
| 1.5. Culture des cyanobactéries..... | 24 |
| 1.5.1. Mode de culture..... | 24 |
| 1.5.1.1. Autotrophie..... | 24 |
| 1.5.1.2. Hétérotrophie..... | 25 |
| 1.5.2. Systèmes de culture | 26 |
| 1.5.2.1. Systèmes ouverts : les bassins de culture | 26 |
| 1.5.2.2. Systèmes fermés : les photobioréacteurs..... | 27 |
| 1.5.2.3. Systèmes hybrides | 27 |
| 1.6. Le genre <i>Arthrospira</i>..... | 28 |
| 1.6.1. Taxonomie..... | 28 |
| 1.6.2. Morphologie | 29 |
| 1.6.3. Ecologie..... | 30 |
| 1.6.4. Cycle biologique..... | 30 |
| 1.6.5. Composition de la spiruline..... | 32 |
| 1.7. Paramètres influençant la croissance de la spiruline..... | 35 |
| 1.7.1. Facteurs climatiques : Température et Lumière..... | 36 |
| 1.7.2. Le milieu de culture..... | 37 |
| 1.7.3. L'agitation | 37 |
| 1.8. Intérêts et utilisation de la spiruline | 38 |
| CHAPITRE 2 : Les substances polymériques extracellulaires chez les cyanobactéries et chez le genre <i>Arthrospira</i> sp..... | 39 |
| 2.1. Définition des EPS | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2. Composition des EPS chez les cyanobactéries | 40 |
| 2.2.1. Les polysaccharides..... | 40 |
| 2.2.2. Les protéines | 41 |
| 2.2.3. Les substituants | 41 |
| 2.3. Les voies biosynthétiques des EPS cyanobactériens | 42 |
| 2.3.1. Le transport vers le cytoplasme..... | 42 |
| 2.3.2. La synthèse du sucre-1-phosphate..... | 42 |
| 2.3.3. La formation des unités basales répétitives..... | 43 |
| 2.3.4. La polymérisation..... | 43 |
| 2.4. Rôles des EPS cyanobactériens | 43 |
| 2.4.1. Une fonction d'attachement | 43 |
| 2.4.2. Piégeage des nutriments et des sels minéraux..... | 44 |
| 2.4.3. Une fonction de protection | 44 |
| 2.5. Facteurs influençant la production des EPS | 44 |
| Cyanobactériens | 44 |
| 2.6. Méthodes d'extraction des EPS | 45 |
| Cyanobactériens | 45 |
| 2.7. Applications des EPS | 46 |
| Cyanobactériens | 46 |
| 2.8. Les EPS chez le genre <i>Arthrospira</i> | 47 |
| CHAPITRE 3 : Les plans d'expériences et modélisation | 49 |
| 3.1. Définition et objectif | 49 |
| 3.2. Aperçu sur la méthodologie des plans | 49 |
| D'expériences | 49 |
| 3.3. Les types de plan d'expériences | 51 |
| 3.3.1. Les plans de screening..... | 51 |
| 3.3.2. Les plans pour surface de réponse ou «RSM» | 51 |
| 3.3.3. Les plans factoriels complets à trois niveaux..... | 52 |
| 3.3.4. Les plans centraux composites | 52 |
| 3.4. La modélisation mathématique | 52 |
| 3.4.1. Système d'équations..... | 53 |
| 3.4.2. Analyses statistiques et modélisation | 54 |
| 3.5. Les logiciels de modélisation | 55 |
| CHAPITRE 4 : Partie expérimentale | 56 |
| 4.1. Matériel utilisé | 56 |
| 4.1.1. Les souches utilisées | 56 |
| 4.1.2. Milieux de culture | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.3. Tampons et réactifs | 58 |
| 4.2. Méthodes expérimentales | 58 |
| 4.2.1 Isolement d' <i>Arthrospira</i> sp. | 58 |
| 4.2.2. Paramètres et procédés de culture d' <i>Arthrospira</i> sp. | 60 |
| 4.2.3. Culture en batch autotrophie | 62 |
| 4.2.4. Culture en batch menée en deux phases | 63 |
| 4.2.5. Conception expérimentale des cultures | 64 |
| 4.2.6. Extraction des exopolysaccharides produits par <i>Arthrospira</i> sp. | 67 |
| 4.2.7. Extraction de la phycocyanine | 69 |
| 4.2.8. Elaboration de films à base de gélatine incorporés avec l'extrait de phycocyanine d' <i>Arthrospira</i> sp. | 70 |
| 4.3. Méthodes analytiques..... | 71 |
| 4.3.1. Monitoring des cultures d' <i>Arthrospira</i> sp. | 71 |
| 4.3.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques | 72 |
| 4.3.4. Méthodes de caractérisation des films d'emballage incorporés en phycocyanine | 79 |
| 4.3.5. Méthodes d'analyses techno-fonctionnelles du PC-E | 80 |
| 4.4.7. Méthodes d'analyses thermiques..... | 82 |
| 4.4.8. Analyse du comportement rhéologique..... | 83 |
| 4.4.9. Propriétés mécaniques des films incorporés avec l'extrait de phycocyanine d' <i>Arthrospira</i> sp. | 84 |
| 4.4.10. Détermination des activités biologiques | 85 |
| 4.4. Méthodes de traitement des données | 88 |
| 4.4.1. Modélisation mathématique | 88 |
| 4.4.2. Analyse statistique..... | 90 |
| 4.4.2.1. Analyse par composante principale..... | 90 |
| 4.4.2.2. Analyse de la variance (ANOVA)..... | 90 |
| CHAPITRE 5: RESULTATS ET DISCUSSION..... | 91 |
| 5.1. Optimisation de la culture de la souche Saharienne <i>Arthrospira</i> sp. et son forçage métabolique..... | 91 |
| Introduction | 91 |
| 5.1.1. Culture d'<i>Arthrospira</i> sp. en batch autotrophie | 91 |
| 5.1.1.1. Examen microscopique et identification | 91 |
| 5.1.1.2. Culture d' <i>Arthrospira</i> sp. | 93 |
| □ Cinétique de croissance d' <i>Arthrospira</i> sp. | 94 |
| □ Caractérisation biochimique de la biomasse d' <i>Arthrospira</i> sp. | 96 |
| 5.1.1.3. Effet de l'intensité de lumière sur le taux de phycocyanine | 98 |
| d' <i>Arthrospira</i> sp. | 98 |
| Conclusion..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| 5.1.2. Induction des métabolites intracellulaires et extracellulaires chez <i>Arthrospira</i> sp., selon un procédé de culture en deux phases | 100 |
| 5.1.2.1. Phase I : Caractéristiques des précultures et de la biomasse d' <i>Arthrospira</i> sp. dans les conditions optimales de croissance | 101 |
| 5.1.2.2. Phase II : Induction des métabolites intracellulaire et des EPS sous des conditions de stress | 101 |
| 5.2.2.3. L'analyse par composantes principales (ACP) des métabolites intracellulaires et des EPS | 104 |
| 5.1.2.4. Plan d'expérience | 107 |
| <input type="checkbox"/> Paramètre des modèles | 107 |
| <input type="checkbox"/> Coefficients de régression des modèles réajustés et analyse des effets | 108 |
| <input type="checkbox"/> <i>Les sucres totaux et les lipides</i> | 110 |
| <input type="checkbox"/> <i>Les caroténoïdes totaux</i> | 112 |
| <input type="checkbox"/> <i>Les phycobiliprotéines</i> | 114 |
| <input type="checkbox"/> <i>Les substances polymériques extracellulaires (EPS)</i> | 114 |
| 5.1.2.5. Combinaison de facteurs et maximisation des métabolites intracellulaires et extracellulaires | 116 |
| <input type="checkbox"/> Validation des modèles | 121 |
| Conclusion..... | 121 |
| 5.2. Les EPS chez <i>Arthrospira</i> sp. :..... | 122 |
| Culture en vue de l'amélioration leur production, extraction et caractérisation partielle de leur fraction polysaccharidique | 122 |
| Introduction | 122 |
| 5.2.1. Induction des EPS chez <i>Arthrospira</i> sp. par combinaison de l'intensité de la lumière avec la concentration en NaCl..... | 122 |
| <input type="checkbox"/> Plan d'expériences..... | 123 |
| <input type="checkbox"/> Paramètre du modèle..... | 124 |
| <input type="checkbox"/> Analyse du modèle | 124 |
| <input type="checkbox"/> Combinaison de maximisation de la production en EPS | 126 |
| <input type="checkbox"/> Validation..... | 127 |
| 5.2.2. Extraction des exopolysaccharides (PS) à partir des EPS..... | 128 |
| 5.2.3. Caractérisation des EPS et du PS | 129 |
| 5.2.3.1. Composition physicochimique | 129 |
| 5.2.3.2. Propriétés calorimétriques des EPS et PS | 130 |
| 5.2.3.3. Structure des EPS dessalés et des exopolysaccharides (PS) | 131 |
| 5.2.3.4. Rhéologie des PS d' <i>Arthrospira</i> sp. | 132 |
| 5.2.3.5. Activité antioxydante du PS d' <i>Arthrospira</i> sp. | 138 |
| Conclusion..... | 140 |
| 5.3. Performances de la phycocyanine d'<i>Arthrospira</i> sp. : Préparation, stabilité, bio- | |

| | |
|---|------------|
| fonctionnalité et bio-activité. | 141 |
| Introduction | 141 |
| 5.3.1. Extraction de la phycocyanine brute | 142 |
| 5.3.2. Caractérisation de l'extrait de phycocyanine | 142 |
| 5.3.2.1. Composition biochimique | 142 |
| 5.3.2.2. Profile électrophorétique | 143 |
| 5.3.2.3. Solubilité de PC-E d' <i>Arthrospira</i> sp. | 144 |
| 5.3.2.4. Propriétés spectrales UV-visible de la phycocyanine PC en fonction du pH..... | 146 |
| 5.3.2.5. Propriétés fonctionnelles de PC-E..... | 147 |
| <input type="checkbox"/> Propriétés émulsifiantes | 147 |
| <input type="checkbox"/> Propriétés moussantes | 148 |
| 5.3.2.6. Activités biologiques de PC-E | 149 |
| 5.3.2.6.1. <i>Activité antioxydante in vitro</i> | 149 |
| <input type="checkbox"/> <i>Inhibition du blanchiment de β-carotène</i> | 149 |
| <input type="checkbox"/> <i>Pouvoir réducteur</i> | 149 |
| <input type="checkbox"/> <i>Effet chélateur de fer</i> | 150 |
| <input type="checkbox"/> <i>Activité antiradicalaire</i> | 150 |
| 5.3.2.6.2. <i>Activité antibactérienne</i> | 151 |
| 5.3.3. Thermostabilité de la phycocyanine (PC) d'<i>Arthrospira</i> sp. | 152 |
| 5.3.3.1. Effet de la température et du temps d'incubation..... | 152 |
| 5.3.3.2. Effets des stabilisants sur la thermostabilité de la phycocyanine..... | 154 |
| <input type="checkbox"/> <i>Considérations structurales</i> | 156 |
| <input type="checkbox"/> <i>Considérations thermiques</i> | 160 |
| 5.3.3.3. Paramètres de couleur du PC-E..... | 162 |
| Conclusion | 162 |
| 5.4. Performances de l'extrait de phycocyanine d'<i>Arthrospira</i> sp. dans l'élaboration de films d'emballages comestibles et bioactifs. | 163 |
| Introduction | 163 |
| 5.4.1. Poids sec et solubilité des films élaborés | 163 |
| 5.4.2. Couleur, transparence et transmission de la lumière | 165 |
| 5.4.3. Propriétés structurales des films | 167 |
| 5.4.3.1. Structure par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier | 167 |
| 5.4.3.2. Microstructure | 169 |
| 5.4.4. Propriétés mécaniques et thermiques des films | 170 |
| 5.4.4.1. Propriétés mécaniques..... | 170 |
| 5.4.4.2. Propriétés thermiques | 171 |
| <input type="checkbox"/> <i>Analyse par balayage calorimétrique différentiel</i> | 171 |

| | |
|---|------------|
| □Analyse thermogravimétrique | 172 |
| 5.4.5. Propriétés biologiques des films..... | 174 |
| 5.4.5.1. Activité antioxydante <i>in vitro</i> | 174 |
| □Activité anti radicalaire | 174 |
| □Pouvoir réducteur | 175 |
| □Effet chélateur du fer..... | 180 |
| □Inhibition du blanchiment du β -carotène | 180 |
| 5.4.5.2. Activités antibactériennes..... | 181 |
| Conclusion..... | 183 |
| CONCLUSION GENERALE | 184 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 0 |
| PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES | 24 |
| ANNEXES..... | 25 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | | | |
|------------------------------------|---|------------------------------|----------------------------------|
| IR-TF | Infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée | $^{\circ}\text{C}$ | Degré Celsius |
| BHA | Butylhydroxyanisole | f | Fréquence |
| BHT | Butylhydroxytoluène | PC | Phycocyanine |
| Chl | Chlorophylle | L | Lumière |
| DO | Densité optique | N | NaCl |
| DPPH | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl | NN | NaNO ₃ |
| Min | Minutes | P | K ₂ HPO ₄ |
| mL | Millilitre | K₂H | K ₂ HPO ₄ |
| M | masse | NaC | NaCl |
| EDTA | Ethylène diamine tétraacétique | E | Fonction exponentielle |
| Ferrozine | Acide 3-(2-pyridyl)-5,6-Bis(4-phényl)-sulfonique | Coeff CR | Coefficient centré et réduit |
| MS | Matière sèche | rpm | Rotation par minute |
| Rpm | Rotation par minute | RSM | Response surface methodology |
| | | RT | Résistance à la traction |
| | | ER | Elongation à la rupture |
| | | HR | Humidité relative |
| | | R² | Coefficient de détermination |
| | | IAE | Indice d'activité émulsifiante |
| | | ISE | Indice de stabilité émulsifiante |
| | | ΔH | Enthalpie de transition |
| t | Temps | | |
| T | Température | | |
| μg | Microgramme | | |
| V | Volume | | |
| UF | Ultrafiltration | | |
| UV | Ultra Violet | | |
| G' | Module de conservation | | |
| G'' | Module de perte | | |
| PC-E | Extrait de phycocyanine | | |
| PS | exopolysaccharides extracellulaire | | |
| EPS | Substances polymériques extracellulaires | | |
| GBC | Gélatine bovine commerciale | | |
| G-PC-E | Film à base de gélatine incorporé de PC-E | | |
| MPa | Méga Pascal | | |
| η_0 | Viscosité à zéro-cisaillement | | |
| η_{∞} | Viscosité à infini-cisaillement | | |
| $\dot{\gamma}_c$ | Taux de cisaillement critique | | |
| $\dot{\gamma}$ | Taux de cisaillement | | |
| P | Exposant du modèle de Carreau | | |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1.1 : Culture en bassin [41] | 26 |
| Figure 1.2 : Photobioréacteurs en colonnes verticales (A), tubulaires (B), et plates (C) [44]. | 27 |
| Figure 1.3 : Système mixte de culture [46]..... | 28 |
| Figure 1.4 : Les différentes formes du genre <i>Arthrospira</i> sp. [55]..... | 29 |
| Figure 2.5: Micrographies électroniques à balayage de <i>S. platensis</i> montrant (a) un unifilament de longueur normale (barre = 50 μm) et de longueur plus courte (flèche) ; et (b) un filament plus court (barre = 10 μm) recouvert d'une couche de polysaccharide d'apparence ridée (flèche) [66] | 39 |
| Figure 4.6: Guelta du Palmier (photographie originale) (a), Image satellite (Landsat8/CNES Airbus) de la Guelta du Palmier, Tamanrasset, Algérie (Arcgis) (b). | 56 |
| Figure 4.7 : Étapes d'isolement et de purification d' <i>Arthrospira</i> sp. | 60 |
| Figure 4.8 : Les étapes d'extraction de l'exopolysaccharide (PS)..... | 68 |
| Figure 4.9 : Les étapes d'extraction de l'extrait de phycocyanine (PC-E)..... | 70 |
| Figure 4.10 : Elaboration de films à base de gélatine bovine incorporés avec l'extrait de phycocyanine d' <i>Arthrospira</i> sp. | 71 |
| Figure 5.11: Observation microscopique de la souche <i>Arthrospira</i> sp. isolée depuis la Guelta du Palmier Tamanrasset (Algérie) (Gx100) (Photographie originale)..... | 92 |
| Figure 5.12 : Teneur en phycocyanine (%) et concentration de la biomasse (g/L) chez <i>Arthrospira</i> sp. en fonction de différentes intensités de lumière | 98 |
| Figure 5.13: Composantes principales de la composition intracellulaire et extracellulaire d' <i>Arthrospira</i> sp., exposées à différentes combinaisons d'intensités de lumière et de concentrations. Coefficients et scores pour PC1*PC2 (a) et PC1*PC3(b)..... | 105 |
| Figure 5.14 : Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la teneur en sucres totaux (a) et lipides (b) (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L : lumière ; N : NaNO ₃ | 110 |
| Figure 5.15 : Courbes des effets des interactions NaNO ₃ *K ₂ HPO ₄ et K ₂ HPO ₄ *NaCl identifiées pour la teneur en lipides. K ₂ H : K ₂ HPO ₄ ; Lip : Lipides. Low : Faible concentration, High : Forte concentration. | 111 |
| Figure 5.16: Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la teneur en caroténoïdes totaux (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L : lumière ; N : NaCl ; NN : NaNO ₃ ; P : K ₂ HPO ₄ ; Intervalle de confiance à 90%..... | 112 |
| Figure 5.17 : Courbes d'effets des interactions NaNO ₃ *K ₂ HPO ₄ , K ₂ HPO ₄ *NaCl et NaNO ₃ *NaCl identifiées pour la teneur en caroténoïdes totaux. K ₂ H : K ₂ HPO ₄ , Low : faible concentration. High : forte concentration | 113 |
| Figure 5.18 : Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la teneur en phycobiliprotéines (termes linéaires, quadratiques). L : lumière ; N : NaCl ; NN : NaNO ₃ ; P : K ₂ HPO ₄ . Intervalle de confiance à 90%..... | 114 |
| Figure 5.19 : Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la production d'EPS (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L ; lumière ; N : NaCl ; NN : NaNO ₃ ; P : K ₂ HPO ₄ . Intervalle de confiance à 90%. | 115 |

| | |
|--|-----|
| Figure 5.20 : Courbes des effets des interactions $\text{NaNO}_3 \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ et $\text{NaNO}_3 \cdot \text{NaCl}$ identifiées pour la production d'EPS. K_2H : K_2HPO_4 , Low : Faible concentration, High : Forte concentration. | 115 |
| Figure 5.21 : Les contours iso réponses des sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et la production d'EPS chez <i>Arthrospira</i> sp. en fonction de l'intensité de la lumière, NaCl , NaNO_3 et K_2HPO_4 | 119 |
| Figure 5.22 : Proportions maximales en sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines (%) (a) et production d'EPS g/g (b) sous les combinaisons optimales d'intensité de lumière et concentrations en NaCl , NaNO_3 et K_2HPO_4 (Phase II) contre celles obtenues en phase optimale de croissance. | 120 |
| Figure 5.23: Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur l'amélioration de la production d'EPS (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L : lumière ; Intervalle de confiance à 90%. | 125 |
| Figure 5.24 : Courbes des effets des interactions lumière* NaCl identifiées pour la production d'EPS. NaC : NaCl ; Light : Lumière. Low : Faible concentration, High : Forte concentration. | 125 |
| Figure 5.25 : Les contours isoréponses de production d'EPS en fonction de l'intensité de la lumière et de la concentration en NaCl chez <i>Arthrospira</i> sp.; LIGHT : Lumière | 127 |
| Figure 5.26 : Les valeurs de la conductivité (mS/cm) du retntât d'EPS en fonction du nombre de lavage. L : Lavage. | 129 |
| Figure 5.27: Spectres IR-TF des EPS et PS. Transmittance (%) | 132 |
| Figure 5.28: Variation de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement du PS en solution à diverses concentrations. $T=20^\circ\text{C}$ | 133 |
| Figure 5.29: Variation des deux modules de conservation G' et de perte G'' du PS en solution en fonction de la déformation de cisaillement. $f=1\text{ Hz}$; $T=20^\circ\text{C}$ | 136 |
| Figure 5.30: Dépendance à la température des deux modules de conservation G' et de perte G'' des solutions d'EPS. $f=1\text{ Hz}$; $\gamma=1\%$ | 138 |
| Figure 5.31: Activité antioxydante des PS. Activité antiradicalaire DPPH (a) ; Effet chélateur (b). | 139 |
| Figure 5.32 : Rendement d'extraction de la phycocyanine à différents ratios solide- liquide (m/v). | 142 |
| Figure 5. 33: Profile électrophorétique de PC-E. (a) : Gel 12%. (b) : Gel 7,5%. L1 et L4 : Migration des marqueurs de taille (kDa). L2 et L3 : Migration de PC-E. | 144 |
| Figure 5.34 : Solubilité de PC-E en fonction du pH. | 145 |
| Figure 5.35 : Spectres d'absorption UV-visible de PC-E à différentes valeurs de pH de 3,0, 5,0, 6,0, 7,0 et 9,0. | 146 |
| Figure 5.36: Activités antioxydantes de PC-E en fonction de sa concentration. | 150 |
| Figure 5.37: Thermostabilité de la phycocyanine contenue dansle PC-E incubée à différentes températures pendant 75 min. | 152 |
| Figure 5.38: Thermostabilité de la phycocyanine contenue dansle PC-E, incubée pendant 120 min à 60°C | 153 |
| Figure 5.39: Effets du sorbitol, du PEG-4000 et du sucrose (1: 4 m/m) sur la thermostabilité de la phycocyanine à différentes concentrations initiales de PC-E incubé pendant 75 minà 60°C | 154 |

| | |
|---|-----|
| Figure 5.40 : Effets de la concentration du PEG-4000 sur la thermostabilité de la phycocyanine à différentes concentrations initiales de PC-E incubée à 60 °C pendant 75 min. | 155 |
| Figure 5.41 : Effet du sorbitol à différents rapports sur la thermostabilité de la phycocyanine contenu dans PC-E extrait brut (pH 6,0) à 2,75 mg mL ⁻¹ , mis à incuber à 60 °C pendant 75 min. | 156 |
| Figure 5.42: Spectres IR-TFde PC-E natif, dénaturé et stabilisé. T (%) : Transmittance. | 159 |
| Figure 5.43 : Spectres IR-FT des films enrichis PC-E.Mesures faites à 25 °C et à une humidité relative de 50%. | 168 |
| Figure 5.44 : Micrographe d'une coupe transversale du film contrôle à base de gélatine | 169 |
| Figure 5.45: Thermogrammes des films enrichis en PC-E. (a) : Perte de poids (%) en fonction de la température. (b) : Dérivée de la perte de poids (%/° C) en fonction de la température. | 173 |
| Figure 5.46 : Activité antiradicalaire des films enrichis en PC-E. | 175 |
| Figure 5.47 : Pourvoir réducteur des films enrichis en PC-E. | 175 |
| Figure 5.48 : Effet chélateur des films enrichis en PC-E..... | 180 |
| Figure 5.49 : Capacité des films enrichis en PC-E à inhiber le blanchiment du β- carotène. | 181 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1.1: Distribution géographique naturelle de la spiruline [5] | 31 |
| Tableau 2.1 : Principaux acides gras de la spiruline [61] | 33 |
| Tableau 3.1: Composition de la spiruline en minéraux [46]..... | 35 |
| Tableau 4.4: Différentes combinaisons de température et d'intensités de lumières..... | 62 |
| Tableau 4.5 : Valeur quantitative de chaque facteur étudié : intensité de lumière et concentration en NaCl, NaNO ₃ et K ₂ HPO ₄ | 64 |
| Tableau 4.6 : Matrice expérimentale impliquant différentes combinaisons d'intensités de lumière et concentration en NaCl, NaNO ₃ et K ₂ HPO ₄ | 65 |
| Tableau 4.7 : Valeur quantitative de chaque facteur étudié : intensité de lumière et concentration en NaCl | 66 |
| Tableau 4.8 : Matrice expérimentale impliquant différentes combinaisons d'intensités de lumière et concentration en NaCl | 67 |
| Tableau 5.9: Caractères morphologiques d' <i>Arthrospira</i> sp. isolée depuis la Guelta du Palmier Tamanrasset (Algérie) | 92 |
| Tableau 10: Valeurs de la vitesse spécifique de croissance (μ_{max} , j-1) sous différentes combinaisons de température (°C) et d'intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$)..... | 93 |
| Tableau 5.11 : Profil nutritionnel d' <i>Arthrospira</i> sp. récoltée à la fin de la phase exponentielle..... | 96 |
| Tableau 5.12 : Valeurs expérimentales des réponses expérimentales en fonction des différentes combinaisons d'intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) et de concentrations en NaCl, NaNO ₃ et K ₂ HPO ₄ (g/L) au cours de la phase I et la phase II du procédé de culture | 103 |
| Tableau 5.13: Paramètres statistiques des modèles obtenus pour chaque réponse..... | 108 |
| Tableau 5.14 : Coefficients de régression des modèles réajustés liant les sucres totaux, les lipides, les caroténoïdes totaux, les phycobiliprotéines et la production des EPS chez <i>Arthrospira</i> sp., et la variation de l'intensité de la lumière et des concentrations de NaCl, NaNO ₃ et K ₂ HPO ₄ | 109 |
| Tableau 5.15: Comparaison des valeurs expérimentales avec celles prédites par le modèle pour la combinaison d'intensité de lumière et concentration en NaCl, NaNO ₃ et K ₂ HPO ₄ | 121 |
| Tableau 5.16 : Valeurs expérimentales de la production d'EPS en g g ⁻¹ biomasse sèche en fonction de différentes combinaisons d'intensité de lumière ($\mu\text{mol photons /m}^2/\text{s}$) et de concentration en NaCl (g/L) au cours de la phase I et de la phase II | 123 |
| Tableau 5. 17: Les coefficients de régression du modèle réajusté liant la production des EPS chez <i>Arthrospira</i> sp. et la variation de l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl..... | 124 |
| Tableau 18 : Comparaison des valeurs expérimentales avec celles prédites par le modèle pour la combinaison d'intensité de lumière et concentration en NaCl..... | 128 |
| Tableau 5.19: Composition physico-chimique des EPS et du PS..... | 130 |
| Tableau 5.20 : Valeurs des paramètres caractéristiques du modèle de Carreau en fonction de la variation de la concentration des PS en solution..... | 134 |
| Tableau 5.21: Valeurs des modules de conservation G' et de perte G" ainsi que de la | |

| | |
|---|-----|
| contrainte seuil τ_0 , en fonction de la variation de la concentration du PS en solution..... | 137 |
| Tableau 22: Composition physico-chimique d'Arthrospirasp.et de PC-E | 143 |
| Tableau 5.23: Propriétés émulsifiantes et moussantes de PC-E à différentes concentrations. | 148 |
| Tableau 5.24: Activité antibactérienne de PC-E a 5 et 10 mg/mL | 151 |
| Tableau 5.25: Température initiale d'amorphicité et d'enthalpie de transition de PC natif, destabilisé et stabilisé..... | 161 |
| Tableau 5.26: Valeur du poids sec, solubilité et activité de l'eau des films enrichis en PC- E..... | 164 |
| Tableau 5.27 : Valeurs de la couleur à la surface et de la transparence des films enrichis en PC-E..... | 165 |
| Tableau 5.28 : Valeurs de la transmission de la lumière des films enrichis en PC-E dans le domaine de l'UV-visible..... | 166 |
| Tableau 5. 29: Propriétés mécaniques des films enrichis en PC-E..... | 170 |
| Tableau 5.30 : Températures de transition vitreuse des films enrichis en PC-E | 172 |
| Tableau 5.31: Perte de masse, température maximale de dégradation et masse résiduelle des films enrichis en PC..... | 173 |
| Tableau 32 : Activité antibactérienne des films enrichis en PC-E | 182 |

INTRODUCTION GENERALE

Les cyanobactéries, autrefois appelées algues bleues ou cyanophycées, sont des bactéries dotées d'une activité photosynthétique et ont la capacité de produire de l'oxygène, suggérées ainsi, d'être parmi l'une des plus anciennes formes de vie sur la planète Terre. Les cyanobactéries peuplent divers biotopes. Elles sont rencontrées aussi bien dans les milieux aquatiques (eau douce, salée et polluée) que dans les milieux terrestres, les glaciers polaires ou encore dans les zones désertiques [1]. Ce caractère ubiquitaire reflète une grande flexibilité métabolique, qui leur confère, une importante habilité d'adaptation et de résistance face aux conditions fluctuantes sub- ou supra-optimales, voire extrêmes, à leur croissance.

Parmi les mécanismes de résistance déployés par les cyanobactéries face à un stress donné, sont cités i) la dissipation de l'excès d'énergie en enclenchant des mécanismes de piégeage de radicaux libres ou de fluorescence à travers la synthèse de caroténoïdes ou de phycobiliprotéines et/ou ii) la conversion du métabolisme de carbone de réserve résultant de la photosynthèse vers la production de métabolites d'ordre secondaires, tels que les lipides, les carbohydrates, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines, etc. [2,3]. Un autre mécanisme extracellulaire est également impliqué dans cette stratégie de survie, qui se caractérise par la sécrétion de substances polymériques, communément notés EPS «*Extracellular Polymeric Substances*» [4].

Il y a quelques décennies, milieu des années 70, les cyanobactéries étaient considérées comme nocives pour l'homme, n'ayant aucun intérêt alimentaire et n'ayant fait objet d'aucune exploitation industrielle. Leur richesse en toxines diverses en était la cause. L'intérêt pour la production en masse des cyanobactéries pour usage exclusivement alimentaire vit le jour avec la réémergence de la spiruline (le genre *Arthrospira*). Ainsi, la biotechnologie des cyanobactéries a commencé à se développer concrètement, passant de façon incontournable, par l'amélioration des techniques de culture et l'approvisionnement d'une biomasse à composition stable.

La spiruline, genre *Arthrospira*, est une cyanobactérie filamenteuse riche en protéines, en vitamines et diverses substances bioactives mais surtout exempte de toute toxicité. L'usage de la spiruline en tant que complément alimentaire ou aliment remonte à des siècles, notamment au Mexique par les aztèques et au Tchad [5], zones où l'algue vit spontanément dans un certain nombre de lacs chauds dont le pH est basique et la salinité est élevée.

Après 1970, la forte médiatisation des propriétés nutritionnelles de la spiruline suite à diverses expéditions à caractère scientifiques ou non, a engendré une forte demande de production, génératrice d'un marché actuellement en expansion touchant à la fois l'alimentaire, le pharmaceutique et le cosmétique. Par conséquent, de nombreuses entreprises, à l'échelle internationale, ont investi dans la culture et la commercialisation de la spiruline permettant son importante production mondiale. Cependant, les EPS produits par la spiruline sont que très peu valorisés, leur usage est restreint uniquement à quelques applications en médecine traditionnelle, notamment utilisés comme agent cicatrisant par certains peuples primitifs.

Par ailleurs, la spiruline a fait l'objet de plusieurs travaux de recherches. En vue de l'amélioration de sa culture, plusieurs études scientifiques se sont intéressées à l'effet de plusieurs systèmes et modes de culture, incluant la variation des conditions de croissance tels que le pH, la température, la salinité et éléments nutritifs, etc., sur la productivité en biomasse et sa qualité [6, 7, 8]. Cependant, les études sur la valorisation des EPS produits par la spiruline sont rares et ont porté exclusivement sur des recherches fondamentales élucidant leur structure et leurs fonctions physiologiques [9,4].

Par la suite, les EPS se sont avérés être doués de caractéristiques biologiques et rhéologiques intéressantes [10, 11, 12] les amenant à être de potentiels substituants à différentes substances synthétiques utilisées dans le domaine industriel. Par conséquent, en vue d'exploiter ces substances polymériques, quelques travaux de recherches sur l'amélioration de la production de ces EPS ont commencé à être entrepris [13].

Actuellement, l'axe principal de recherche en biotechnologie des cyanobactéries et microalgues porte à la fois sur l'amélioration ciblée de la composition de la biomasse, la mise en place d'un système adapté d'extraction et de stabilisation d'un métabolite à haute valeur ajoutée et son application notamment dans les formulations communes (nutraceutiques, cosmétiques et pharmaceutiques, ou encore très innovatrices, à savoir, son application dans l'emballage biodégradable [14, 15]. Suite à toutes ces considérations, l'objectif de ce présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des techniques et stratégies de culture de microalgues mais également de la valorisation d'une souche autochtone de spiruline isolée depuis le Désert du Sahara.

Dans un premier volet, le but s'est orienté vers l'étude de l'effet des modes de culture (autotrophie batch et culture en deux phases) sur la (i) croissance optimale et (ii) la composition intracellulaire (carbohydrates, lipides, phycobiliprotéines (phycocyanine),

caroténoïdes totaux) et extracellulaire (EPS), de cette souche d'*Arthrospira* sp.

Dans un deuxième volet, une contribution à la valorisation des EPS, produits par *Arthrospira* sp., en proposant un mode de culture en vue de l'amélioration de leur production, un processus de récupération et d'extraction de leur fraction polysaccharidique et l'évaluation de leurs performances rhéologiques à des fins d'applications industrielles (alimentaires et nutritionnelles), ont été entreprises.

La valorisation et l'étude des performances d'un autre métabolite à haute valeur ajoutée, qui est la phycocyanine de grade nutritionnel, a été de même effectuée, en passant par son extraction, sa caractérisation, sa stabilisation, la détermination de sa bio-fonctionnalité mais surtout son application en emballage bioactif.

En vue de ces objectifs, notre étude comportera :

Une introduction générale suivie d'une première partie bibliographique dans laquelle sont présentés un aperçu sur les cyanobactéries et le genre *Arthrospira*, des généralités sur les EPS, ainsi qu'un aperçu sur la modélisation mathématique.

Une seconde partie est consacrée à la partie expérimentale, décrivant les méthodologies adoptées pour chaque étude.

Une troisième partie, scindée autour de 4 chapitres, est concentrée sur la présentation et la discussion de l'ensemble des résultats obtenus. Ce travail sera clôturé par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE 1 : Généralités sur les cyanobactéries

Les cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, constituent le phylum des procaryotes photoautotrophiques [1]. Apparues il y a presque 3,5 milliards d'années, elles seraient à l'origine de la vie sur la planète par leur production d'oxygène qui a permis la modification de la composition de l'atmosphère. Il existe environ 6000 espèces connues à ce jour et appartenant à ce phylum [16, 17]. La dénomination cyanobactéries vient du fait que ces dernières contiennent de la phycocyanine, un pigment photosynthétique accessoire de couleur bleue («*cyano*» en grec) et qui lui confère une couleur bleue verte [18].

1.1. Taxonomie

Les cyanobactéries désignent les procaryotes unicellulaires ou pluricellulaires possédant de la chlorophylle «a» et produisant de l'oxygène par photosynthèse via les photosystèmes I et II [19, 20].

Selon la taxonomie proposée dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [21], les cyanobactéries sont divisées en cinq ordres :

- **Chroococcales** : englobe les cyanobactéries unicellulaires ou pluricellulaires en agrégats avec un mode de reproduction par fission binaire en un, deux ou trois plans (*Chroococcus*, *Mycrocystis*, *Synechroococcus*, etc.) ;
- **Pleurocapsales** : cyanobactéries unicellulaires ou en agrégats dont la reproduction se fait par fission interne multiple (*Cyanocystis*, *Dermocarpella*, *Xenococcus*, etc.) ;
- **Oscillatoriales** : possédant un trichome non ramifié, filamenteux et unisériel, ne produisant ni d'akinètes ni d'hétérocystes (Genres *Linnothrix*, *Oscillatoria*, *Plaktothrix*, *Spirulina*, etc.) ;
- **Nostocales** : possédant un trichome simple, filamenteux et unisériel, mais produisant des akinètes et des hétérocystes (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, etc.) ;
- **Stigonematales** : se présentant sous forme de filaments simples ou ramifiés, uni ou plurisériel, dont la reproduction s'effectue par fission binaire sur plusieurs plans (*Chlorogloopsis*, *Fischerella*, *Nosctochopsis*, etc.).

1.2. Morphologie

Les cyanobactéries peuvent se présenter sous forme unicellulaire (*Aphanocapsa raspigellae*) ou bien filamenteuses, les cellules dans ce cas sont alignées formant des filaments (trichome) simples (*Oscillatoria fracta*) ou bien ramifiés (*Adreanema adriaticum*) [22]. Elles peuvent être également mucilagineuses (*Coccopedia limnetica*). Les cellules des cyanobactéries ont un diamètre d'environ 1 à 10 μm et possèdent une paroi Gram-négative [22].

On distingue trois types cellulaires chez les cyanobactéries [22] :

- Les cellules végétatives constituant l'ensemble de l'individu et qui se présentent sous diverses formes (sphériques, ellipsoïdales, ovoïdes, cylindriques ou piriformes) ;
- Les hétérocystes qui ont une paroi épaisse et qui se situent en position terminale ou intercalaire dans le filament, ces cellules possèdent une enzyme spécifique, la nitrogénase qui leur permet l'acquisition de la capacité de fixer l'azote atmosphérique ;
- Les akinètes qui sont des cellules spécialisées de grande taille, elles sont considérées comme des spores vu leur résistance à la dessiccation et leur capacité à germer au retour des conditions favorables.

1.3. Ecologie

Grâce à leur grande diversité, les cyanobactéries ont pu coloniser la plupart des écosystèmes terrestres et aquatiques. La majorité d'entre elles, sont photoautotrophes, elles requièrent pour leur développement de l'eau, du dioxyde de carbone, des minéraux et de la lumière [23]. Cependant, il a été décrit que quelques espèces sont capables de survivre de longues périodes dans l'obscurité, de plus, il a été observé chez certaines cyanobactéries une aptitude à l'hétérotrophie [24].

Les cyanobactéries ont une impressionnante capacité à coloniser des substrats infertiles tels que les cendres volcaniques, les sables du désert et les roches. Elles ont de même une capacité de survie dans des environnements à températures extrêmes, elles sont en effet retrouvées dans les sources d'eau chaudes ainsi que dans les lacs de l'arctique et de l'antarctique [25, 20].

1.4. Intérêt et utilisation

Vue l'expansion démographique que connaît le monde actuellement, le besoin de ressources augmente également, ce qui accroît notre dépendance aux cultures agricoles [26]. Cependant, même après une surexploitation des cultures pour l'alimentation, les produits chimiques et les biocarburants, le besoin de population croissante n'est toujours pas satisfait. De plus, compte tenu des défis, qui augmentent en raison de la mauvaise gestion des ressources alimentaires et énergétiques, une question se pose : où allons-nous atterrir dans le futur à venir ? C'est pourquoi la nécessité de relever ces défis a été soulevée.

Pour répondre aux besoins alimentaires futurs, les cyanobactéries se sont révélées les plus prometteuses vu qu'elles sont dotées d'un système photosynthétique complexe et peuvent absorber une large longueur d'onde du rayonnement solaire pour canaliser cette énergie dans la synthèse de nutriments tel que les protéines, les acides gras, les glucides, nécessaires à l'alimentation de l'homme et des animaux [27]. Une autre caractéristique qui les rend plus appropriées, est qu'elles n'ont pas besoin de terres arables pour leur croissance. Elles peuvent se développer sur des nutriments résiduels donnant de haute productivité à coûts réduits, concurrençant ainsi les produits obtenus à partir de l'industrie agricole considérés comme onéreux [28, 26]. De plus, les cyanobactéries sont d'importantes usines à pigments, tels que la phycocyanine et le β - carotène utilisés en industrie agroalimentaire pour remplacer les pigments synthétiques à grand potentiel cancérigènes [26].

Elles produisent également des cyanotoxines pouvant être exploitées pour leur nature allélochimique et peuvent être introduites dans les champs agricoles en tant que pesticides, c'est-à-dire, algicides, fongicides, désherbants et herbicides [27].

Outre la production de métabolites toxiques, elles comprennent plusieurs composés biologiquement actifs : antibactériens [28], anticancéreux [29, 30], antifongiques [31, 32], et antiviraux (Abdo *et al.*, 2012) [33]. Ainsi, en raison des valeurs pharmaceutiques élevées, une nouvelle perspective d'utilisation des cyanobactéries et des algues dans le domaine de la médecine est envisagée.

1.5. Culture des cyanobactéries

1.5.1. Mode de culture

Les cyanobactéries sont consommées depuis des millénaires par plusieurs populations, des cultures artisanales à profit local existent un peu partout dans le monde, elles sont en outre cultivées de manière industrielle à des fins diverses telles que la nutrition ou la production de produits à haute valeur ajoutée ou encore debiocarburants. Les cyanobactéries peuvent être cultivées selon deux modes, l'autotrophie et la mixotrophie [34].

1.5.1.1. Autotrophie

En condition autotrophe, les cyanobactéries doivent être alimentées par des intrants d'origine minérale, via la photosynthèse, elles produisent elles-mêmes toutes les molécules dont elle a besoin. À cet effet, il faut gérer les sources de carbone, d'azote, de phosphore et d'éléments traces présents dans les milieux de culture, les apports minimums sont estimés en se basant sur la composition moléculaire des cyanobactéries. Le carbone, représentant 50% du poids sec des cyanobactéries, doit être constamment fourni durant les périodes de photosynthèse, le CO₂ en est la seule source chez les organismes photoautotrophes. Lorsque les cultures sont de l'ordre industriel, les apports en CO₂ peuvent provenir des industries émettant du gaz carbonique comme déchet [35].

L'azote peut être apporté de trois manières différentes : ammoniac, nitrates ou urée. Cependant, les cyanobactéries ayant la capacité de fixer l'azote atmosphérique, il est envisageable de recourir à des sources d'azote provenant d'effluents gazeux industriels contenant du monoxyde d'azote. On peut utiliser également comme source certaines eaux usées, ce qui permet en même temps leur recyclage [24, 36] (Richmond *et al.*).

Le phosphore doit être fourni de manière excessive car il tend à former des complexes non assimilables avec les ions métalliques, il peut être apporté de plupart les eaux usées [7].

Les minéraux dits «traces» sont apportés au milieu de culture en très faible quantité, néanmoins ils sont indispensables à la bonne culture des cyanobactéries. À titre d'exemple, les chlorophylles contiennent en leur centre un ion magnésium, une carence dans le milieu en ce minéral affecterait sensiblement la biosynthèse des chlorophylles, et par conséquent l'efficacité de la photosynthèse [2].

Outre l'approvisionnement en nutriments, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la croissance des cyanobactéries [2] : des facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, la salinité, le pH, la teneur en O₂, et des facteurs biotiques tels que des pathogènes (bactéries, champignons, virus), des compétiteurs pour les ressources (algues exogènes) ou des prédateurs (hydres, copépodes). En effet, une intensité lumineuse élevée sans agitation conduirait à la photolyse des cyanobactéries. Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donnera la croissance optimale. À l'inverse, en lumière et agitation faibles, la croissance sera lente, mais la pigmentation plus marquée [6,37]. De nombreuses cyanobactéries tolèrent bien des températures inférieures de 15°C de leur optimum mais ne survivent pas à 2-4°C d'excès par rapport à leur température optimale [6]. D'autre part, des températures nocturnes basses limitent la perte de biomasse par respiration (qui peut représenter 25% de la biomasse accumulée au cours de la journée) mais en même temps limitent la reprise de la photosynthèse en journée. Le pH est principalement déterminé par la concentration en CO₂. Au fur et à mesure qu'il est consommé le pH augmente. La mesure du pH sert donc d'indicateur pour modérer les flux entrants de CO₂ [2,6].

1.5.1.2. Hétérotrophie

À la différence des conditions autotrophes, la source de carbone en conditions d'hétérotrophie est d'origine organique, tels que les glucides lignocellulosiques. La culture via fermentation est également envisageable, où le maintien de conditions de culture optimales se fait aisément avec risque de contamination faible. Les concentrations cellulaires sont généralement relativement élevées ce qui limite la taille et les coûts relatifs des infrastructures de culture ainsi que les coûts du produit fini.

Néanmoins, ce système nécessite des souches capables de réaliser la fermentation et les sources de carbone externes, stérilisées, doivent être fournies en quantités équivalentes aux produits générés [38,39].

1.5.2. Systèmes de culture

Il existe plusieurs systèmes de culture des cyanobactéries ou microalgues en général. On en distingue alors des systèmes ouverts, fermés ou mixtes.

1.5.2.1. Systèmes ouverts : les bassins de culture

Les bassins de cultures font en général 15 à 50 cm de profondeur, la suspension des cellules est assurée par le mixage et la circulation de l'eau, qui sont assurés par divers moyens selon le type de bassin, à savoir des pales en rotation pour les raceways, un bras rotatif pour les bassins circulaires et un système de pompe pour les bassins inclinés [40]. Les cultures en système ouvert se font souvent en milieu hautement sélectif tels que des milieux hypersalins et hyperalcalins afin de limiter naturellement les contaminations. Ces systèmes donnent des productivités moyennes allant de 0,4 à 0,8 g/L de biomasse (**Figure 1.1**).



Figure 1.1 : Culture en bassin [41]

1.5.2.2. Systèmes fermés : les photobioréacteurs

Ce sont des systèmes destinés à des productions à échelle industrielle. Ce sont des systèmes fermés dotés d'une enceinte de mise en culture translucide permettant l'activité photosynthétique de la cyanobactérie. Les cultures sont mises en circulation soit par pompe mécanique soit par mécanisme de bullage [42]. Il existe trois grands types de photobioréacteurs : plats [37], tubulaires ou à colonne verticale [43] (**Figure 1.2**).

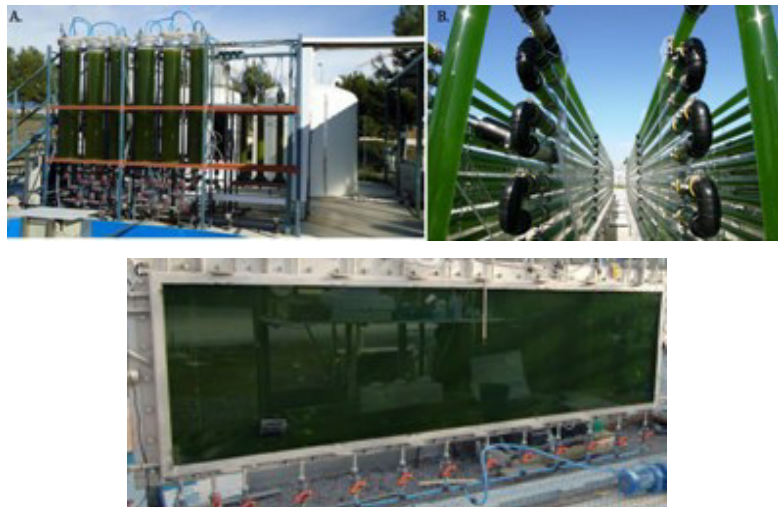


Figure 1.2 : Photobioréacteurs en colonnes verticales (A), tubulaires (B), et plates (C) [44].

1.5.2.3. Systèmes hybrides

Les systèmes mixtes sont des systèmes semi-industriels à industriels et comprennent le couplage d'un photobioréacteur avec un autre photobioréacteur ou alors à un bassin de culture [45]. Le photobioréacteur, généralement de faible volume, sert d'unité de production d'inoculum pour la culture en un deuxième photobioréacteur ou bassin. Le bassin de culture dans ce système est généralement ouvert pouvant être couvert par une bâche passant alors d'une culture ouverte à une culture fermée, permettant de réguler la température de l'eau lorsque le bassin est ouvert, et une protection contre les contaminations lorsque ce dernier est fermé [42] (**Figure 1.3**).

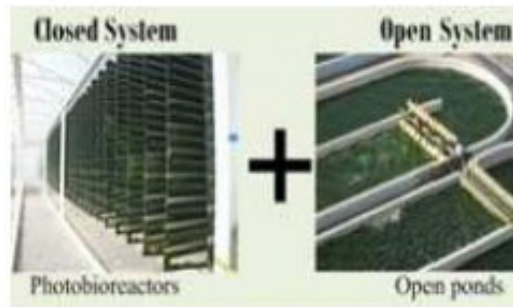


Figure 1.3 : Système mixte de culture [46]

1.6. Le genre *Arthrospira*

Arthrospira ou spirulines une cyanobactérie unicellulaire, consommée depuis des siècles par les aztèques (peuple originel du Mexique) sous forme de poudre issue d'un aliment appelée le tecuitlatl [47], elle est également consommée par les habitants du Sud Kanem situé aux environs du lac Tchad, incorporée dans des gâteaux appelés «Dihé» [48]. La spiruline à une haute valeur nutritionnelle, reconnue et établie depuis les années 1770 [49, 50].

1.6.1. Taxonomie

La spiruline appartient au genre *Arthrospira*, cyanobactérie filamenteuse qui est enroulée en spire, ondulée ou est droite (type M1) [51]. Elle est classée de la manière suivante:

Domaine : Prokaryota Règne : Eubacteria

Sous-Règne : Negibacteria Phylum : Cyanobacteria Classe : Cyanophyceae

Sous-Classe : Oscillatoriothyriceae Ordre : Oscillatoriales

Famille : Microcoleaceae Genre : *Arthrospira*

Espèces : *Arthrospira platensis* *Arthrospira maxima*

Fréquemment, il se produit une confusion entre la dénomination *Arthrospira* et *Spirulina*, qui sont deux genres différents avec des caractéristiques distinctes. Cette confusion provient d'une erreur de classification à la base, mais reste alimentée par la dénomination commerciale de la cyanobactérie alimentaire. C'est Geitler qui en 1932 proposait de regrouper toutes les cyanobactéries filamenteuses présentes sous forme de spires sous le même genre *Spirulina* [52] engendrant cette confusion, jusqu'au cours des

années 1990 où Tomaselli [53] établit que spiruline est le nom commercial de la cyanobactérie alimentaire *Arthrospira*. *Spirulina* étant la traduction de spiruline en anglais, la confusion entre les deux genres persiste à ce jour. Les espèces du genre *Spirulina* sont quant à elles assez éloignées du genre *Arthrospira* et elles ne sont pas comestibles, il existe des espèces du genre *Spirulina* telles que *Spirulina subtilissima*, *Spirulina princeps*, *Spirulina gigantea*, etc. Plus de 50 souches d'*Arthrospira* ont été décrites dans le monde, elles appartiendraient toutes à seulement une ou deux espèces génétiques, ainsi les plus connues sont *Arthrospira maxima* d'origine mexicaine et *Arthrospira platensis* d'origine africaine [5, 54].

1.6.2. Morphologie

La spiruline se compose de filaments mobiles, mesurant 10 à 12 μ m chacun, ils s'enroulent en formant des spires, en général 7, et présentent dans ce cas une taille moyenne de 250 μ m, elle est non ramifiée [53]. En revanche, les spires peuvent avoir plusieurs formes (**Figure 1.4**), c'est à dire plus ou moins rapprochées sur le filament, ouvertes et assez espacées ou encore complètement ouvertes donnant ainsi un filament droit [5]. La forme du filament est directement liée aux conditions de culture et peut être réversible [6].

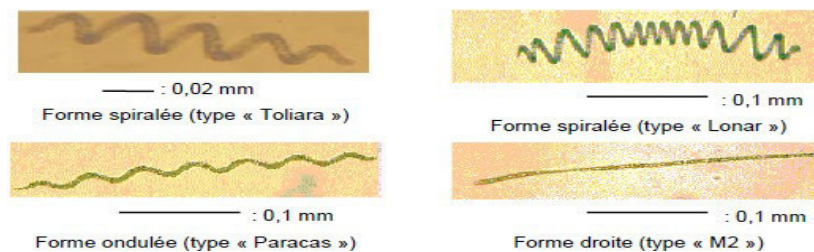


Figure 1.4 : Les différentes formes du genre *Arthrospira* sp. [55]

Malgré la grande diversité de forme, la spiruline se subdivise en seulement deux espèces quasi-identiques qui ne diffèrent que par une partie de leurs codes génétiques [56]. *Arthrospira platensis* est la plus connue et la plus utilisée lors des travaux de recherche ou lors de l'ensemencement de nouvelles cultures. Elle se compose de trichomes atteignant 350 μ m de long et entre 6 et 12,45 μ m de diamètre. Ils sont un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50 μ m, diminuant légèrement vers les extrémités [5].

Arthrospira maxima se caractérise par des trichomes de 70 à 80 μm de long, de 7 à 9 μm de diamètre et légèrement effilés aux extrémités. Ils forment une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60 μm de diamètre. Les cellules constituant les trichomes mesurent entre 5 à 7 μm de long et ne rétrécissent pas au niveau des articulations [5].

Le trichome de spiruline est enroulé sur lui-même formant une spire dont la rotation suit le sens des aiguilles d'une montre. Cette conformation lui confère la capacité de se déplacer dans l'eau en effectuant un mouvement oscillatoire, à une vitesse de 5 μm par seconde. Elle peut en outre se déplacer par flottabilité grâce à des vésicules de gaz de forme cylindrique d'environ 70nm de long et 10nm de diamètre, lui permettant d'aller vers la surface de l'eau afin de réaliser la photosynthèse [5]

1.6.3. Ecologie

La spiruline se développe en général dans les zones tropicales et semi-tropicales, elle se trouve dans les eaux saumâtres et les lacs salins avec un pH basique. Le **tableau 1.1** récapitule les différentes régions où la spiruline a été recensée. Le milieu de vie de la spiruline est très spécifique, en effet, elle croît dans des milieux fortement alcalins, chauds et très minéralisés, l'ensemble de ces conditions exclue en général le développement d'autres formes de vie, mais également, la spiruline joue un rôle de compétiteur pour les substrats, ce qui amoindrit encore plus les chances de développement d'un autre micro-organisme dans ces milieux [5, 21].

1.6.4. Cycle biologique

Un filament en maturité forme des cellules spéciales appelées «nécridies», des disques de séparation biconcaves. Au niveau de ces cellules, le trichome se fragmente pour donner naissance à de nouveaux individus de courtes chaînes (2 à 4 cellules) appelées «hormogonies» [53], qui se multiplient par bipartition par scission simple et croissent en longueur prenant la forme typiquement hélicoïdale. Dans les conditions expérimentales, le temps de génération maximal de la spiruline est voisin de 7 heures [57].

Tableau 1.1: Distribution géographique naturelle de la spiruline [5]

| Afrique | |
|---|---|
| Algérie | Tamenrasset |
| Régions du Kanem : lac Latir, Ouna, Borku, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseïrom, Ounianga Kebir | |
| Soudan | Cratère de Djebel Marra |
| Djibouti | Lac Abber |
| Ethiopie | Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltou, Navasha, |
| Rodolphe | |
| Congo | Mougounga |
| Kenya | Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron |
| Tanzanie | Lac Natron |
| Tunisie | Lac Tunis, Chot el Jerid |
| Zambie | Lac Banggweoulou |
| Madagascar | Beaucoup de petits lacs près de Toliara |
| Asie | |
| Inde | Lacs Lonar et Nagpur |
| Myanmar | Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank |
| Sri Lanka | Lac Beira |
| Pakistan | Mares près de Lahore |
| Thaïlande | Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province |
| Azerbaïdjan | <i>non précisé</i> |
| Amérique du Sud | |
| Pérou | Réservoir d'eau près de Pracas |
| Mexique | Lac Texcoco ; Lac Cratère |
| Uruguay | Montevideo |
| Equateur | Lac Quiliotoa : cratère de 1km de diamètre |
| Amérique du Nord | |
| Californie | Okland, Del Mar Beach |
| Haïti | Lac Gônave |
| République Dominicaine | Lac Enriquilo |
| Europe | |
| Hongrie | <i>non précisé</i> |
| France | Camargue |
| Autres sites possibles | |
| Partout où vivent le flamant nain, <i>Phoenicoenaias minor</i> (Afrique et Asie) et le flamant de James, <i>Phoenicoparrus jamesi</i> (Amérique du sud) | |
| Ethiopie | Lac Abiata |
| Kenya | Lac Rodolphe, lac Hannington |
| Tanzanie | Lac Manyara, lac Rukua |
| Zambie | Lac Mweru |
| Botswana | Makgadigka Salt Pans |
| Namibie | Etosha salt pans |
| Afrique du Sud | Etat libre d'Orange, près de Vaaldam |
| Bolivie | Lacs Colorado, Poopo, Chalviri, Salar d'Uyuni |
| Chili | Aguas Calientes, Lagunas Brava, lac Vilama, Salar de Surire |
| Mauritanie | Côte Sud |
| Inde | Rann of Kutch ; Gujarat |
| Madagascar | Côté Ouest |

1.6.5. Composition de la spiruline

La spiruline (*Arthrospira*) est reconnue comme un super-aliment puissant et secret et a su gagnée l'acceptabilité du consommateur. À la différence des autres sources végétales, la spiruline a un taux de digestibilité de 83 à 90%, ceci est dû au fait qu'elle ne contient pas de parois cellulosiques ce qui facilite sa digestion [58]. Elle contient pratiquement tous les composants présents dans un aliment complet idéal. Une proportion considérable de protéines, de vitamines, de sels minéraux, de glucides, de pigments, d'oligo-éléments et d'acides gras essentiels, est présente [46].

1.6.5.1. Protéines

La spiruline contient entre 60 et 70% de protéines de haute valeur biologique. En effet, elle renferme l'ensemble des acides aminés essentiels ce qui représente 47% du poids total en protéines. Toutefois, les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) sont les moins représentés [46,59].

1.6.5.2. Phycobiliprotéines

Chez le genre *Arthrospira*, les protéines ayant le potentiel économique et biologique le plus élevé, sont les biliprotéines. Les phycobiliprotéines chez *Arthrospira* sont majoritairement constituées de C-phycoyanine. Cette dernière peut constituer jusqu'à 20% du poids de la fraction protéique.

La phycoyanine est un pigment bleu soluble dans l'eau constituée de deux sous-unités α et β dont la masse moléculaire varie de 14 à 23kDa, respectivement. Les absorptions et les émissions de fluorescence maximales de la phycoyanine se produisent à 615-620 nm et 650 nm, respectivement. Le chromophore est la phycobiline, un tétrapyrrole ouvert.

La phycoyanine est par ailleurs commercialisée, elle a été introduite au Japon en tant que colorant naturel pour l'alimentation et les produits cosmétiques et est produite à un taux de 600 kg/mois. Elle est également utilisée comme traceur biochimique dans les immunodosages, la microscopie et Cytométrie en raison de ses propriétés fluorescentes du pigment.

Elle est de même utilisée comme un pigment naturel pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques, pour remplacer ainsi les pigments synthétiques actuellement utilisés qui sont soupçonnés d'être cancérigènes [60].

1.6.5.3. Lipides

Les lipides totaux de la spiruline varient entre 6 et 13% en poids selon les variétés de spiruline et les conditions de culture [61]. La fraction saponifiable, représentant 83% des lipides totaux, est composée de monogalactosyl diglycérides et de digalactosyl diglycérides (23 %), de sulfoquinovosyl diglycéride (5 %), et de phosphatidyl glycérol (25,9 %). Les triglycérides sont rares (0,3 %), outre 4,6 % de phospholipides indéfinis (Fox *et* Fox, 1999). La fraction insaponifiable qui représente 17% des lipides totaux contient quant à elle des paraffines (25%, hydrocarbures saturés à longues chaînes), des alcools terpéniques (5 à 10 %) et des stérols (1,5 %) [61].

La spiruline contient des acides gras dont une bonne partie est constituée d'acides gras essentiels, avec un bon équilibre entre les oméga-3 et les oméga-6. L'acide gamma linoléinique, un acide gras non essentiel mais jouant un rôle très important dans les réactions inflammatoires est présent dans la spiruline qui est l'une des meilleures sources de cet acide gras après le lait maternel. Le **tableau 1.2** regroupe les principaux acides gras de la spiruline :

Tableau 2.1 : Principaux acides gras de la spiruline [61]

| Acide gras | % AG totaux |
|-----------------------------|--------------------|
| Palmitique (16:0) | 25-60 |
| Palmitoléique (16:1) (ω6) | 0,5-10 |
| Stéarique (18:0) | 0,5-2 |
| Oléique (18:1) ω6 | 0,5-16 |
| Linoléique (18:2) ω6 | 10-30 |
| Gamma-linolénique (18:3) ω6 | 0,8-40 |
| Alpha-linolénique (18:3) ω6 | Absent |

AG : acides gras

1.6.5.4. Glucides

Le taux de glucides dans la spiruline varie entre 12% et 20% en poids sec, les glucides simples étant très faiblement retrouvés, les glucides sont surtout représentés par des polysaccharides tels que les glucosanes aminés (1.9% du poids sec) et des rhamnoses aminés [61]. Des polysaccharides spécifiques à la spiruline ont été isolés, les spirulans (calcium et sodium). Ces spirulans se présentent comme efficaces en tant qu'agents antiviraux [62].

1.6.5.5. Vitamines

Les vitamines naturellement présentes dans la spiruline sont la provitamine A (β -carotène), B1, B2, B12 et la vitamine E. Son contenu en β -carotène est inhabituellement élevé, ce qui est environ 30 fois plus élevé que dans une carotte (par 100 g). Elle est également exceptionnellement riche en vitamine B12 (cobalamine). Cette vitamine est difficilement obtenue lors d'un régime végétarien parce qu'aucun fruit, légume ou grain n'en contient. La spiruline a quatre fois plus de vitamine B12 que le foie cru, qui était considéré comme la meilleure source pour cette vitamine. Elle est également reconnue comme une excellente source de vitamine E comparable à celle trouvée dans le blé. Les vitamines antioxydantes primaires contenues dans la spiruline sont β -carotène, caroténoïdes et vitamine E [63].

1.6.5.6. Minéraux et oligoéléments

La spiruline contient des minéraux tels que le fer, le magnésium, le calcium et le phosphore. La spiruline est une source de fer qui contient 20 fois plus de fer que le gramme de blé. Le fer est un minéral qui est principalement présent dans les aliments provenant d'animaux, tels que la viande et le poisson [46]. La spiruline est très avantageuse pour les athlètes, les végétariens, femmes enceintes et adolescentes (**Tableau 1.3**).

Tableau 3.1: Composition de la spiruline en minéraux [46]

| Minéral | Teneur (mg/100g de matière sèche) |
|------------------|--|
| Calcium | 1000 |
| Phosphore | 800 |
| Magnésium | 400 |
| Fer | 58 |
| Zinc | 3 |
| Cuivre | 1,2 |
| Manganèse | 0,5 |
| Potassium | 1,4 |

1.5.5.7. Pigments

La composition pigmentaire de la spiruline est typique des cyanobactéries. La seule chlorophylle présente est la chlorophylle a, sa teneur varie de 0,8 à 1,5% du poids sec. La teneur en xanthophylle de la spiruline lyophilisée est considérable, atteignant 6,9 g/kg. Les autres caroténoïdes majeurs sont la myxoxanthophylle (37%), un caroténoïde monocyclique lié au rhamnose, au β -carotène (28%) et à la zéaxanthine (17%) [61].

1.7. Paramètres influençant la croissance de la spiruline

La variation des différents facteurs environnementaux, particulièrement l'intensité de la lumière et la température, outre d'autres facteurs, a une grande influence sur la croissance de la spiruline, telle que la composition du milieu de culture impliquant la salinité et la nutrition azotée et phosphorée, le pH et l'agitation, pouvant altérer la vitesse de croissance des organismes photosynthétiques. Sous conditions extrêmes, la croissance tend à s'arrêter s'accompagnant de changements importants observés à plusieurs niveaux : pigmentation, morphologie et métabolisme de la cellule [6, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70].

Le mode photoautotrophe des cyanobactéries implique une dépendance vis-à-vis des facteurs physicochimiques de l'environnement tels que l'intensité et la qualité de la lumière et la concentration de nutriments. Les variations de ces facteurs constituent les

stimuli primaires auxquels ces organismes doivent s'adapter. Ainsi, sous conditions sub-optimales de lumière et de température, un certain nombre de réponses générales et spécifiques qui influencent fortement la physiologie de la cellule s'y déroulent, agissant sur la croissance de toutes les cyanobactéries. Les réponses générales, principalement contrôlées par un seul ou quelques régulateurs principaux, fournissent une protection contre une grande variété de signaux environnementaux, quel que soit le stimulus initial. D'où, l'activation du métabolisme secondaire [3]. Ainsi, pour assurer une productivité optimale, une mise au point adéquate de la conduite de culture est nécessaire. Les facteurs majeurs influençant la productivité de la spiruline sont résumés dans ce qui suit :

1.7.1. Facteurs climatiques : Température et Lumière

La température et l'intensité de lumière sont des facteurs climatiques importants ayant un effet direct sur l'activité photosynthétique et ainsi sur le taux de croissance de la spiruline. En-dessous de 17 °C, la croissance est pratiquement nulle, mais la spiruline ne meurt pas. La température optimale pour sa croissance est comprise entre 29 et 35 °C, au-dessus de 38 °C, la croissance de la spiruline est inhibée [70, 71]. Tous les organismes photoautotrophes, y compris les bactéries photosynthétiques, les cyanobactéries et les plantes, convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique grâce à la photosynthèse. Il est rapporté que la qualité de la lumière, son intensité et sa durée sont des facteurs importants de la production d'algues [72, 73].

Dans un système de culture en bassin extérieur, la lumière directe du soleil n'est pas recommandée, 30% de plein soleil peuvent agir positivement sur la croissance, les 70% restant vont chauffer la culture et ainsi peuvent inhiber la croissance [74]. De ce fait, une lumière provenant d'un tube luminaire est facilement contrôlable et permet de maintenir la température initiale des cultures. La spiruline exige une intensité lumineuse entre 50 et 80 mol photon/m²/s pour assurer sa croissance [75]. La photopériode est également un paramètre important à prendre en compte. Dans un système de culture en bassin extérieur, les cultures sont exposées à un cycle naturel de lumière et d'obscurité, imposant ainsi un seul régime physiologique d'ajustement et d'acclimatation. En revanche, dans un système fermé, si le cycle de lumière est de 24/24h, il faudrait alors déterminer l'intensité de lumière qui augmenterait la concentration cellulaire de la culture, sans qu'il s'y provoque un auto-ombrage, responsable de la diminution du taux de croissance [76, 72,73].

1.7.2. Le milieu de culture

Différents milieux de culture sont utilisés pour démarrer de nouvelles cultures et ce en fonction de la source d'eau utilisée. L'eau de culture doit être propre (filtrée) pour éviter la croissance d'autres algues. L'eau potable peut être utilisée pour mener une culture, mais il est préférable d'utiliser une eau déionisée qui sera enrichie plus tard selon les besoins de la souche pour éviter tout excès d'un des éléments pouvant conduire à la formation de boues minérales (précipités) responsables du ralentissement des cultures. Le milieu de culture pour la spiruline est constitué de carbonate qui peut être remplacé par le bicarbonate, constituant la source de carbone. Elle peut se développer sur le nitrate ou l'urée seuls, mais l'utilisation des deux à la fois est plus avantageuse, permettant de meilleures productivités. La concentration en potassium dans le milieu de culture doit être au maximum cinq fois la concentration de sodium. Si des produits chimiques de qualité fertilisante sont utilisés, ils devraient être du type soluble ou cristallisé avec libération immédiate [77]. Ainsi, plusieurs préparations sont possibles. Cependant le milieu Zarrouk est le milieu référence de la spiruline le plus couramment utilisé dont le pH est à une valeur de 9,0 [57].

1.7.3. L'agitation

L'agitation de la culture est nécessaire pour homogénéiser et assurer une bonne répartition de l'éclairage parmi tous les filaments de la spiruline. L'agitation a donc un effet direct sur la productivité des cultures surtout à grande échelle. L'agitation est assurée par palette rotative à moyenne vitesse, qui maintient les cellules en suspension. Toutefois, une productivité élevée par le genre *Arthrospira* est obtenue quand les cultures sont aérées par bullage à l'aide de pompes à eau. Cette technique permet de distribuer uniformément la concentration de dioxyde de carbone et supprimer les substances inhibitrices comme l'oxygène [78]. Lorsque l'aération n'est pas adéquate, l'efficacité de l'utilisation de l'énergie et la production de biomasse seront faibles. De même, si le milieu de croissance n'est pas aéré, la cellule flotte à la surface du milieu de culture dû à la présence de vacuoles remplies d'air. Ces cellules subissent une photo- inhibition, résultant en faible croissance et ainsi perte dans la production de biomasse.

1.8. Intérêts et utilisation de la spiruline

La spiruline est utilisée dans plusieurs domaines, elle est d'un grand intérêt pour l'humain en tant qu'aliment ou cosmétique, mais également pour les animaux [46]. Chez l'humain, elle est surtout utilisée pour sa grande richesse en protéines afin de lutter contre la dénutrition et elle est utilisée comme complément alimentaire afin d'augmenter les défenses antioxydantes de l'organisme et de lutter contre les carences en vitamines et minéraux. Des effets hypoglycémiant, hypolipémiant, antiviraux et immunostimulants lui sont également accordés [46, 79, 80, 81].

En industrie, la spiruline est utilisée comme colorant naturel à travers la phycocyanine étant le seul colorant bleu d'origine naturelle, elle est incorporée dans plusieurs préparations alimentaires (pains, pâtes, boissons, produits laitiers, etc.) et cosmétiques [60, 82, 83]. Chez l'animal, la spiruline est utilisée comme complément pour favoriser la croissance et la fertilité des animaux ainsi que pour renforcer leur pigmentation afin de les rendre plus attrayants pour le consommateur (plumage des oiseaux, couleurs des poissons d'aquarium, couleur des crevettes, etc.).

CHAPITRE 2 : Les substances polymériques extracellulaires chez les cyanobactéries et chez le genre *Arthrospira* sp.

2.1. Définition des EPS

Les substances polymériques extracellulaires (EPS) ou les exopolysaccharides (**Figure 2.5**) sont de longues chaînes polysaccharidiques sécrétées par les bactéries et les microalgues, incluant les cyanobactéries, dans leur environnement immédiat pendant leur cycle de croissance, pouvant être associées ou non à la surface des cellules [84, 85]. Dans certains ouvrages anciens, les EPS sont appelés «glycocalyx», et sont définis comme étant la fine capsule ou la couche entourant les microorganismes [86].

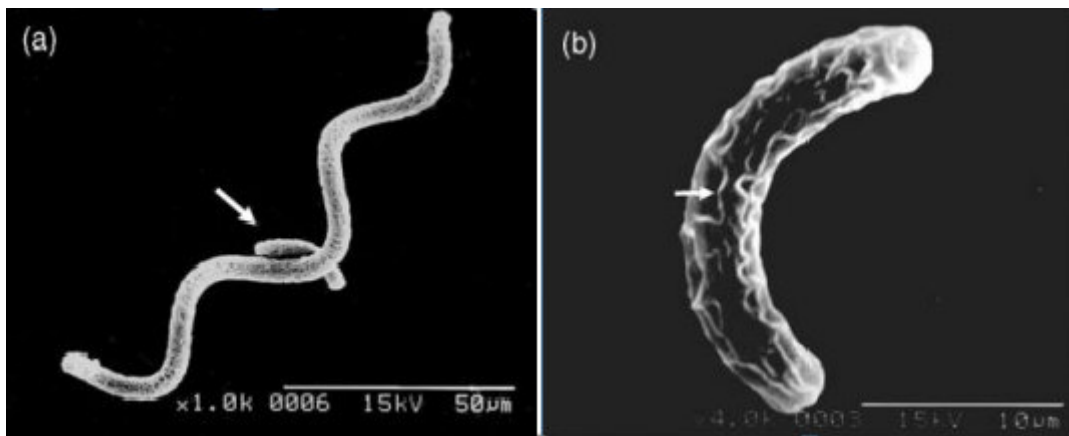


Figure 2.5: Micrographies électroniques à balayage de *S. platensis* montrant (a) un unifilament de longueur normale (barre = 50 µm) et de longueur plus courte (flèche) ; et (b) un filament plus court (barre = 10 µm) recouvert d'une couche de polysaccharide d'apparence ridée (flèche) [66]

Les cyanobactéries sont connus pour leur production importante d'EPS, où deux formes différentes peuvent être rencontrées: liée ou libre [85, 87, 88, 89].

En terme pratique, la distinction entre ces deux formes est également définie selon le mode d'extraction : une centrifugation ou ultrafiltration seulement pour les RPS, tandis que les CPS nécessitent un traitement additionnel pour assurer leur détachement de la cellule [87].

EPS capsulaires : il s'agit d'une matière dotée d'une structure compacte associée intimement à la surface cellulaire. Ils sont également appelés CPS pour «*Capsular PolySaccharides*» [90] :

EPS solubles (libres) : Il s'agit de polymères sécrétés dans le milieu immédiat de la cellule n'ayant aucun contact direct avec cette dernière. Ils sont appelés RPS pour «*Releasing PolySaccharides*» [87]. En terme général, chez les cyanobactéries, les RPS est la forme qui est la plus fréquente et abondante [91].

2.2. Composition des EPS chez les cyanobactéries

Durant ces dernières années, l'intérêt porté aux EPS produits par les cyanobactéries est de plus en plus grandissant. Un nombre dépassant les 70 espèces sont classées productrices d'EPS, rendant ainsi les cyanobactéries une source potentielle pour la synthèse de ces bio polymères [92]. Ces EPS des cyanobactéries se caractérisent par [89]:

- la présence de trois composants de nature différente : les polysaccharides, les protéines et les substituants [93];
- la présence de 6 à 10 monosaccharides de nature différente [91].
- un type anionique qui est du à la présence des oses acides et à des substituants anioniques [94];
- la présence de sulfate dans les EPS de certaines souches [11];

Les EPS cyanobactériens sont constitués par trois composants majeurs : les polysaccharides, les protéines et les substituants [4, 95].

2.2.1. Les polysaccharides

En général, les polysaccharides des EPS sont présents sous forme d'enchaînement de six à dix monosaccharides différents dont la composition est déterminée comme suit :

- **Des hexoses** : le glucose, le galactose (sucres neutres présents chez tous les EPS) et le mannose ;

- **Des deoxyhexoses** : le fructose ainsi que le rhamnose ;
- **Des pentoses** : le ribose, le xylose ainsi que l'arabinose.
- **Des acides uroniques** (hexoses acides) : l'acide glucouronique ainsi que l'acide galacturonique ;

Il est à noter que le taux des polysaccharides dans les EPS varie selon les genres et espèces. En effet, les EPS de *cyanothece* sp. sont composés de 87% de polysaccharides, 70% chez *Oscillatoria* sp. et 60% chez *Nostoc* sp. [96].

2.2.2. Les protéines

Les protéines occupent ainsi une place cruciale dans la structure des EPS. En effet, leur présence conditionne la structure des EPS et leur comportement physico- chimique en solution [96]. La présence et la quantification des protéines sont généralement effectuées par des méthodes spectrophotométriques (Lowry) ou en passant par le dosage de l'azote total (méthode de Kjeldahl). Il a été rapporté que le taux de protéines dans les EPS oscille considérablement, exemple il est de 0.6% chez *Anabeana* sp. C5, 1,4% chez *Cyanthece* sp. 16Som2 et 40% chez *Synechocystis* sp. PCC80 [4].

En revanche, la composition en acides aminés n'est déterminée que pour *Cyanothece capsulta* et *Cyanothece calcicola*. Ces deux cyanobactéries ont montré une composition identique riche en Glycine, Valine, Alanine, Isoleucine et Phénilalanine [4].

2.2.3. Les substituants

Les substituants sont des groupements de nature diverse liés aux EPS à travers des liaisons esters, amide, éther ou acétyle. Ils sont également responsables de certaines propriétés physicochimiques des EPS [4].

Il existe deux types de substituants organiques et inorganiques.

- **Les substituants organiques** : ils sont de nature anionique, et communément sous forme d'acides uroniques (acide glucouronique et acide galacturonique), de pyruvates, de méthyle, d'acétyle ou de sucicunyle [94];

- **Les substituants inorganiques** : les groupements sulfates ont fréquemment été attribués aux polysaccharides des eucaryotes mais il a été démontré que les polysaccharides sulfatés sont également présents chez les procaryotes et particulièrement chez les cyanobactéries et les archéobactéries [87, 96].

On les rencontre sous deux formes: sous forme de mono-ester ou de phosphodiester [97].

2.3. Les voies biosynthétiques des EPS cyanobactériens

L'intégralité des voies de synthèse des EPS ne sont pas encore bien élucidés chez les cyanobactéries du fait que chaque microorganisme détiendrait sa propre voie de biosynthèse [95, 92, 98, 89]. Toutefois, la biosynthèse de quelques EPS a été particulièrement étudiée chez les bactéries lactiques. Les hétéropolysaccharides sont synthétisés à partir de plusieurs exemplaire d'un oligosaccharide qui peut contenir des monosaccharides et des substituants différents [99, 92]. Selon la littérature, la biosynthèse des EPS peut être structurée en quatre étapes réactionnelles qui sont :

2.3.1. Le transport vers le cytoplasme

Le transport des hexoses, tels que le galactose ou le glucose du milieu extérieur vers le cytoplasme est assuré par un complexe protéique transmembranaire spécifique appelé phosphoenopyruvate-sugar phosphotransférase. Il permet dans un second lieu sa phosphorylation en sucre-6-phosphate [89].

2.3.2. La synthèse du sucre-1-phosphate

Dans le but d'être utilisé pour la biosynthèse des EPS, les sucres-1-phosphates sont métabolisés par des enzymes d'épimérisation, de décarboxylation, de phosphorylation et de déshydrogénation en des sucres nucléotidiques. Les produits de ces réactions enzymatiques seront les précurseurs de l'unité basale répétitive des EPS à savoir les UDP glucose/ galactose [89].

2.3.3. La formation des unités basales répétitives

Après la formation des sucres nucléotidiques, la formation chaîne de sucre est alors amorcée à l'aide des glycosyl-transférases. Ces dernières attachent le premier monomère produit au transporteur lipidique de la paroi cytoplasmique formant ainsi de façon ordonnée la chaîne glucidique [89].

2.3.4. La polymérisation

Les chaînes glucidiques ordonnées obtenues dans l'étape précédente, sous l'action d'une polymérase, elles s'attachent pour former un polymère. Cette action peut se dérouler sur le côté interne de la membrane cytoplasmique. Une fois la polymérisation achevée, le polymère est secrété à l'extérieur totalement ou demeure attaché à la surface de la cellule (capsule). Il est à noter que le processus de la polymérisation et de la sécrétion des EPS n'est pas encore bien élucidé [89].

2.4. Rôles des EPS cyanobactériens

Les substances polymériques extracellulaires secrétées par les différentes cyanobactéries possèdent un rôle important dans les fonctions biologiques permettant leur survie [100, 89] telles que :

2.4.1. Une fonction d'attachement

Dû à l'hydrophile des EPS, les cellules cyanobactérienne peuvent adhérer aux substrats solides, liquides ou encore à d'autres cellules vivantes tels que les poissons, les mollusques et les algues.

Quand la population cyanobactérienne est dansée, adhérant à un substrat, il se produit une formation de biofilm, permettant aux cyanobactéries de résister aux conditions physiques de l'environnement. Ainsi, les EPS ont un rôle de stabilisation physique des cellules cyanobactérienne [88, 89, 101, 102, 103, 104].

2.4.2. Piégeage des nutriments et des sels minéraux

Les EPS cyanobactériens représentent le composant fondamental du biofilm, après l'eau. Ce dernier peut être considéré comme un système de piégeage de la matière organique et des oligoéléments indispensables à la croissance des cellules. En formant un réseau, les EPS interviennent dans l'accumulation et la concentration de ces éléments [88, 89, 100, 105, 106].

2.4.3. Une fonction de protection

Les EPS sont considérés comme un facteur de protection des cyanobactéries contre la prédation ou contre certains stress tels que : La dessiccation, La prédation des protozoaires, les conditions de croissance extrêmes, et la chélation des ions métalliques cationiques [4, 89, 107, 108, 88, 103, 109].

2.5. Facteurs influençant la production des EPS Cyanobactériens

Il existe plusieurs études de l'effet des conditions environnementales sur la production des EPS chez les cyanobactéries. Cependant, le mécanisme concret et explicite de cette synthèse des EPS, ni les facteurs contrôlant leur sécrétion, ne sont élucidés. Il a été rapporté que ceci pourrait être dû à la grande variabilité physiologique des cyanobactéries ou encore au fait que les conditions de cultures utilisées par les expérimentateurs sont très différentes et distinctes, ce qui rend la conclusion difficile [87, 92]. Stal et Wolfstein [110] ont essayé de comprendre la nature de la production des EPS chez *Cylindrotheca closterium* sous différentes intensités de lumière. À travers leur étude, ils ont montré que la croissance et la synthèse des EPS sont en compétition pour l'utilisation du carbone fixé par photosynthèse. Lorsque l'augmentation de l'intensité lumineuse est associée à une température élevée, le carbone est utilisé pour la synthèse de biomasse, alors que si elle est associée à une température faible, ce carbone est orienté vers la synthèse des EPS.

Dans une autre étude menée par Otero et Vincenzini [87] sur des espèces capsulées et non capsulées du genre *Nostoc*, il a été démontré que l'augmentation de l'intensité lumineuse stimule la synthèse des carbohydrates pour toutes les espèces et qu'il existe un mécanisme dépendant de l'azote qui contrôle la répartition du carbone fixé entre métabolites intracellulaires et extracellulaires. En particulier, ils ont établi que le stress lumineux peut induire des changements dans le métabolisme primaire, qui engendre une production des métabolites secondaires tels que les EPS. De plus, plusieurs études ont rapporté que la température agit également sur la sécrétion des métabolites tels que les EPS [92]. Ainsi, une augmentation de la température stimule la sécrétion des EPS chez *Cylindrotheca closterium* [110] et *Anabaena* sp. [111]. Trabelsi et al. [13] ont, en revanche, montré qu'une température de 33 °C, en interaction avec une forte intensité de lumière, permet d'avoir une production élevée en EPS chez *Arthrospira platensis*.

2.6. Méthodes d'extraction des EPS Cyanobactériens

Une fois les conditions de culture d'une souche de cyanobactérie, connue pour sa production en EPS, sont mises au point et optimisées de façon à produire un maximum d'EPS, il est logique et tout aussi important de développer des méthodes économiques et efficaces afin de récupérer, isoler et purifier ces EPS dans le but d'assurer leur application industrielle [92]. Au cours de ces dernières décennies, plusieurs travaux se sont intéressés au développement de méthodes visant l'extraction des EPS à partir des milieux de culture. Plusieurs méthodes ont été évoquées. Ces méthodes se subdivisent en deux types : les méthodes conventionnelles (classiques) et les méthodes non conventionnelles.

Les méthodes conventionnelles impliquent principalement la précipitation alcoolique à l'aide de l'éthanol le méthanol, et l'isopropanol, ces dernières sont économique et ecoresponsable [92]. Cette méthode permet une concentration sélective des EPS et présente beaucoup d'avantages dont la récupération et le recyclage de l'alcool utilisé. Des étapes supplémentaires sont à envisager si on vise à purifier les EPS et ne garder que la partie polysaccharidique. Les molécules de contamination qu'on retrouve généralement sont des protéines, pouvant être éliminés par l'acide trichloracétique, les pigments, pouvant être éliminés par des reflux de solvant organique tels que l'acétone ou l'hexane, et enfin les sels minéraux, pouvant être éliminés par les membranes de dialyse [92].

Les méthodes non conventionnelles quant à elles, impliquent principalement l'ultrafiltration tangentielle, utilisant des membranes allant de 1 à 500 kDa. Cette technique est largement utilisée, car elle se déroule à des températures et pressions basses et permet de récupérer des EPS à l'état natif sans ajout de solvant. L'unique inconvénient rapporté par la littérature, est que les membranes ont tendance à colmater, ainsi un nettoyage régulier est nécessaire. L'ultrafiltration a été utilisée pour isoler des EPS d'*Arthrospira*, *Chlorella*, *Nostoc* et *Haematococcus* [92]. Récemment, parmi les méthodes non conventionnelles pour isoler les EPS, les méthodes utilisant les ultrasons et les microondes sont en cours de développement. Ce sont des méthodes qui ont déjà donné de bons résultats avec les polysaccharides des macroalgues [92].

2.7. Applications des EPS Cyanobactériens

Les études portant sur EPS cyanobactériens sont que très peu entamées, particulièrement d'un point de vue propriétés structurales, physico-chimiques, mécaniques, et biologiques. Ceci justifie la limitation dans leur utilisation en industrie en comparaison à celle des bactéries ou champignon (tel que le dextrane et le pullulane par exemple) [4]. De plus, cette limitation d'application serait également due à leur masse moléculaire élevée. Ainsi, des étapes de modifications telles que l'hydrolyse et la dépolymérisation afin de réduire leur masse sont nécessaires dans le cas où l'on vise une application médicale ou pharmaceutique de ces EPS [109,112, 92]. Il en va sans dire, que ces modifications sont onéreuses. Par ailleurs, plusieurs cyanobactéries sont connues pour leur sécrétion de toxines dans leur milieu, ce qui freine l'application des EPS particulièrement dans l'agroalimentaire [89].

Les EPS cyanobactériens présentent une panoplie d'avantages par rapport à celles des autres microorganismes, il est cité à titre d'exemple la non pathogénicité, une régularité structurale appréciable, purification facile et non exigeante [89,113]. Leur application permet d'atteindre des valeurs ajoutées à plusieurs étapes de leurs transformations.

De plus, la facilité dans la culture des cyanobactéries qui se traduit par une croissance ne nécessitant pas d'apport de substrat organique, ont une flexibilité métabolique importantes [89, 92, 114] ; ce qui permet facilement d'induire la production

des EPS et rendre cette matière disponible pour les industries.

2.8. Les EPS chez le genre *Arthrospira*

Identiquement à toutes les cyanobactéries, le genre *Arthrospira* produit également des EPS dans son milieu de culture. Il s'agit d'un polymère de masse moléculaire allant de 81 à 98 kDa [4]. Néanmoins, certains travaux ont montré que selon l'espèce ou encore les conditions de culture, les EPS peuvent varier en termes de masse moléculaire [4]. Selon De Philippis et Vincenzini [4], la composition des EPS produits par le genre *Arthrospira* a indiqué que la fraction polysaccharidique est formée par une unité répétitive de 15 sucres dont principalement des hexoses tels que le galactose, le glucose et le mannose. Ils ont également montré que, contrairement à tous les autres EPS cyanobactériens, les EPS produits par le genre *Arthrospira* sp. ont caractérisés par l'absence du pentose [90]. Les substituants inorganiques existent en outre chez les EPS du genre *Arthrospira*. Ce sont particulièrement des groupements phosphates et sulfates, représentant 5% du poids de l'EPS [4,37]. Les travaux sur la rhéologie des EPS produites par *Arthrospira*, ont montré que ces dernièrement sont doué d'un comportement non Newtonien et d'une grande pseudoplasticité même à des concentrations faibles, ce qui permet leur usage en industrie [10].

A grande échelle, les EPS du genre *Arthrospira* présentent divers avantages, du fait qu'ils soient issu d'une espèce qui n'est pas toxique, que sa culture est bien maitrisé dont la biomasse est commercialisée dans plusieurs pays du monde [4]. Il est donc évident que leurs utilisation industrielle nécessite sur le plan pratique une étude poussée des facteurs physicochimiques stimulant leur sécrétion afin d'augmenter le rendement d'extraction de ces polymères et donc leur compétitivité par rapport à d'autres polymères utilisés en industrie. En revanche, cet aspect n'a pas fait l'objet de nombreuses études.

La composition biochimique intra et extracellulaire n'est donc pas exhaustive et est sujette à différents changements et ce en fonction de diverses conditions de culture. Ces changements dans les conditions de culture peuvent être exploités afin d'induire un ou plusieurs métabolites d'intérêt. Les techniques impliquant la variation d'un seul facteur à la fois afin de provoquer la maximisation d'un ou plusieurs métabolites a ses limites et ne permets pas d'étudier l'effet de plusieurs facteurs à la fois mais aussi peut s'avérer très

coûteuse. Afin de palier à ce problème, les techniques des plans d'expériences sont généralement utilisées dans ce genre d'étude. La définition, les principes ainsi que les avantages de la méthodologie des plans d'expériences sont présentés dans le chapitre III.

CHAPITRE 3 : Les plans d'expériences et modélisation

3.1. Définition et objectif

Souvent, devant des situations expérimentales, on est face à une démarche classique qui se traduit par la formulation d'une ou d'un ensemble d'hypothèses, déduction des effets, et conduit une expérimentation dans le cas où les informations qui répondent à son hypothèse ne sont pas disponibles. Toutefois, l'expérimentation ne peut pas être arbitraire, l'information ciblée par l'expérimentation doit être précise et est d'une importance majeure.

Les méthodes pouvant être utilisées pour définir une problématique, conduire une expérimentation et traiter les résultats, sont regroupées sous le terme « plans d'expériences », où l'expérience est le seul moyen pour générer des informations pas disponibles.

3.2. Aperçu sur la méthodologie des plans D'expériences

Lundstedt *et al.* [121] dans son ouvrage a bien résumé la démarche de la méthodologie de la recherche expérimentale. Elle est définie comme étant une méthodologie multidisciplinaire applicable dans plusieurs domaines tels que l'agronomie, la chimie, le développement industriel et la qualité, en recherche scientifique [122]. Elle peut être ordonnée comme suit :

- **Une étape de réflexion** qui consiste à formuler clairement le problème étudié et les objectifs escomptés. Dans cette étape, les principaux éléments ciblés pour organiser au mieux l'expérimentation et cibler le plan adéquat au problème à traiter.
- Après l'étape de réflexion et fixation des objectifs, il est important de **faire une synthèse des connaissances**, issues des expérimentations préliminaires et de la littérature disponible, afin d'y chercher les réponses aux questions posées. Cette synthèse permet la détermination des facteurs pouvant influencer le système/

- phénomène étudié, la définition du domaine d'étude à conduire pour chaque facteur, la détermination des réponses enregistrées pour chaque expérience réalisée, la prévision des contraintes expérimentales éventuelles, considération des erreurs possibles pour mieux les contrer afin d'en évaluer l'erreur expérimentale et de les anticiper dans les expériences futures [122];

- **Etablir une stratégie expérimentale**, il s'agit d'une étape décisive portant sur le choix des expériences à réaliser en fonction des objectifs escomptés, de la logistique et moyens disponibles et des informations ciblées. L'expérimentation vise à la recherche d'une relation de cause causalité entre des paramètres définis du phénomène en question appelés «facteurs», supposés influencer le phénomène en question, et d'autres paramètres appelés «réponses» qui représentent le résultat de ce même phénomène. Pour résumer, les plans d'expériences consistent à faire varier des facteurs de façon précise et à des niveaux différents, à mesurer le changement provoqués des réponses, puis à déduire les relations entre facteur et réponse;

- **Effectuer les expériences**, ces dernières donneront les valeurs numériques des réponses étudiées. Il faut souligner que l'effet d'un facteur sur une réponse ne peut être démontrée expérimentalement que si la variation de ce facteur provoque une variation d'une réponse donnée suffisamment importante (statistiquement parlant) pour ne pas être attribué aux erreurs expérimentales soulignées plus haut. Ainsi, afin de pouvoir étudier l'effet d'un facteur sur une réponse, il doit être ajusté à au moins deux niveaux différents;

- **Déduire les réponses** de façon directe ou soit par le biais d'un modèle mathématique.

L'expérimentateur doit :

- s'assurer qu'il n'y a pas de résultats erronés avant de passer à traitement analytique.

- vérifier que les niveaux fixés pour chaque facteur sont respectés pendant la conduite de l'expérimentation.

- vérifier que le modèle mathématique validé, représente au mieux les résultats expérimentaux obtenus.

- **Etre sûr de la qualité des résultats** où l'expérimentateur peut enfin procéder aux calculs et à l'interprétation des réponses du phénomène étudié. De cette manière et selon les conclusions tirées, il sera fixé quant à l'objectif de départ, s'il est atteint ou s'il doit prévoir une nouvelle expérimentation pour vérifier ses résultats [122]

- **L'objectif du premier plan** permet de définir si le domaine d'étude fixé informe à propos de réponses intéressantes. Ainsi, si le domaine d'étude contient les réponses nécessaires à son travail, il le conservera. Sinon, il saura au moins, vers quelle direction doit-il orienter sa seconde expérimentation pour ainsi trouver ce qu'il cherche de façon plus efficace cette fois, évitant la perte d'argent et de temps [122].

3.3. Les types de plan d'expériences

Plusieurs types de plans d'expériences sont rapportés par la littérature, ils sont classés selon l'objectif escompté de l'étude [121, 122, 123].

3.3.1. Les plans de screening

Ce sont des plans d'investigation primaire de l'effet des facteurs sur les réponses, qui utilisent des modèles mathématiques simples, de premier degré et qui permettent de définir une relation linéaire entre les facteurs et les réponses sans ou avec interaction. Parmi ces plans, il existe les plans factoriels complets et fractionnaires: L-designs et Plackett-Burman.

3.3.2. Les plans pour surface de réponse ou «RSM»

Ce sont des plans qui sont utilisés pour la prédiction et /ou l'optimisation d'une réponse selon un modèle mathématique quadratique de second degré. Parmi ces plans, on peut citer les plans factoriels complets à trois niveaux, centrales composites, D- optimal design et Box Behnken [122, 123].

3.3.3. Les plans factoriels complets à trois niveaux

Ce sont des plans dont le nombre des niveaux de chaque facteur est égal à trois niveaux (-1, 0 et +1) et dont toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ils sont notés sous la forme de 3^k avec 3 est le nombre de niveaux et k est le nombre de facteurs.

3.3.4. Les plans centraux composites

Un plan composite centré à k facteurs est composé de Nf (+1/-1) essais d'un plan factoriel complet (ou fractionnaire $2^{(k-r)}$) possédant 2^k essais en étoile sur les axes à une distance (α) du centre du domaine accompagné de N(0) essais au centre du domaine.

3.4. La modélisation mathématique

Dans le cas où il n'existe aucune information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, une loi d'évolution dont la formule standard est $Y=f(x)$ est admise [122, 123].

Etant donné que cette fonction est générale, elle peut être exprimée par une fonction polynomiale, présentant une meilleure description de la relation entre les facteurs expérimentaux et les réponses dans le domaine expérimental fixe. On distingue ainsi deux types de modèles polynomiaux :

- **Un modèle linéaire:** Il s'agit du modèle mathématique le plus simple qui existe expliquant la réponse linéaire entre les facteurs et les réponses [121]. Il est exprimé par la fonction $Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+e$.

Toutefois, le modèle linéaire peut inclure un terme additionnel qui décrit l'interaction entre les différents facteurs étudiés [121], et est exprimé par la fonction $Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2+e$.

- **Un modèle quadratique:** Il s'agit d'un modèle auquel sont ajoutés deux termes correspondants à l'optimum [122]. Ce modèle rend possible la détermination de la

relation non linéaire entre les facteurs et les réponses étudiés, et est exprimé par la fonction $Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{11}x_1+b_{22}x_2+b_{12}x_1x_2+e$.

où y est la réponse mesurée au cours de l'expérimentation et est obtenue avec une précision donnée. X_1 (ou X_2) représente la valeur parfaitement connu du niveau affecté au facteur 1 (ou 2). b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} et b_{12} sont les coefficients du modèle mathématique adopté. Ils ne sont pas connus d'emblée et doivent ainsi être calculés à partir des résultats des expériences. e est le résidu ou l'erreur, additionnant les deux écarts.

3.4.1. Système d'équations

Dans la pratique, n expériences sont effectuées, ainsi on dispose de n résultats de mesures. Chaque point expérimental apporte une valeur de la réponse. Cette réponse est modélisée par un polynôme dont les coefficients sont les inconnus qu'il faut déterminer à la fin du plan d'expériences. C'est un système de n équations à p inconnues. La résolution de ce système à n équations est appelée «ajustement du modèle» [123]. Ce système s'écrit d'une manière simple en notation matricielle

$$Y=XA+e \text{ [122, 123];}$$

avec, Y vecteur des réponses, X matrice de calcul qui dépend des points Expérimentaux choisis pour exécuter le plan et le modèle postulé, A vecteur des coefficients, et e vecteur des résidus [122, 123].

En général, ce système ne peut pas être résolu de façon simple à cause du nombre d'équations qui est inférieur au nombre d'inconnus. Cette solution ne peut être aboutie que si une méthode de régression, introduisant p équations additionnelles, est utilisée. Généralement, cette méthode repose sur le critère de minimisation des moindres carrés, qui donnent les estimateurs qui conduisent au minimum de la somme des carrés des résidus (ou encore $\sum e_i^2 = \text{valeur minimale}$). On obtient alors les estimations les plus probables des coefficients, notées « \hat{a} ». Ce calcul aboutit au résultat suivant $\hat{a} = (tX)^{-1}tXY$; avec tX est la matrice transposée de X et t est la matrice unité.

3.4.2. Analyses statistiques et modélisation

L'analyse statistique a pour objectif la vérification du rapport de causalité entre les effets observés dans la réponse et les facteurs étudiés ou ce rapport viendrait des erreurs de mesures et/ou de la méthode de détermination de ces effets. L'analyse statistique essentiellement utilisée est l'analyse de la variance ANOVA [89] pour analyser un modèle mathématique, trois paramètres principaux sont pris en compte et déterminés, à savoir:

- **Le coefficient de détermination (R^2)** : plus il est élevé, plus le modèle est précis et explique la variabilité observée du système. Un modèle est valide pour décrire un phénomène si R^2 est supérieur ou égal à 0,8 en chimie et supérieur à 0,7 en Biologie [122, 89] ;
- **Le résidu ou manque d'ajustement (Lack of fit)** : il permet de comparer l'erreur expérimentale à celle due au modèle. Le lack of fit doit être supérieur à 0,05 pour que le modèle soit valable et permette de prédire et d'optimiser la réponse [122,89] ;
- **La probabilité p (*p-value*)** : c'est la probabilité de l'erreur commise en acceptant l'hypothèse qu'un paramètre a un effet significatif alors qu'il n'en a pas. C'est l'équivalent d'un test de Student-Fisher. Si la valeur est inférieure à un seuil de probabilité critique choisi par l'expérimentateur, le paramètre est considéré comme ayant un effet significatif. Les paramètres n'ayant pas d'effet significatif seront éliminés de l'équation bien avant l'étape d'optimisation [122,89].

3.5. Les logiciels de modélisation

Il existe deux manières pour calculer les coefficients des équations mathématiques, soit le tableur, soit les logiciels informatiques. La première méthode avec le tableur nécessite de la programmation et beaucoup du temps, alors que les logiciels informatiques sont dotés de bibliothèques de plan classiques et permettent la construction des plans adaptés à certaines situations. Ces logiciels informatiques sont efficaces et permettent de calculer des coefficients dans l'optique d'évaluer la qualité du modèle mathématique, de calculer des réponses à travers les domaines d'étude, d'effectuer les analyses de la variance, de tracer des courbes d'iso réponses, de déterminer les zones d'intérêts et de construire des surfaces de réponses.

CHAPITRE 4 : Partie expérimentale

Dans cette partie, plusieurs techniques de caractérisation, passant par les techniques de culture, de caractérisation physicochimique, structurales, microstructurales, thermiques ainsi que les techniques biologiques, ont été utilisés afin de mener les différents volets de ces travaux de thèse.

4.1. Matériel utilisé

4.1.1. Les souches utilisées

Souche cyanobactérienne

La souche utilisée au cours de ce travail est *Arthrospira* sp. isolée en Aout 2013 depuis un étang d'eau appelé «*Guelta du Palmier*», situé dans la Wilaya de Tamanrasset (Algérie) dans le *grand* parc national de l'Askrem, à une latitude de 23° 06' 11" Nord, une longitude de 5° 49' 01" Est et à une altitude de 1824 m (**Figure 4.6**).

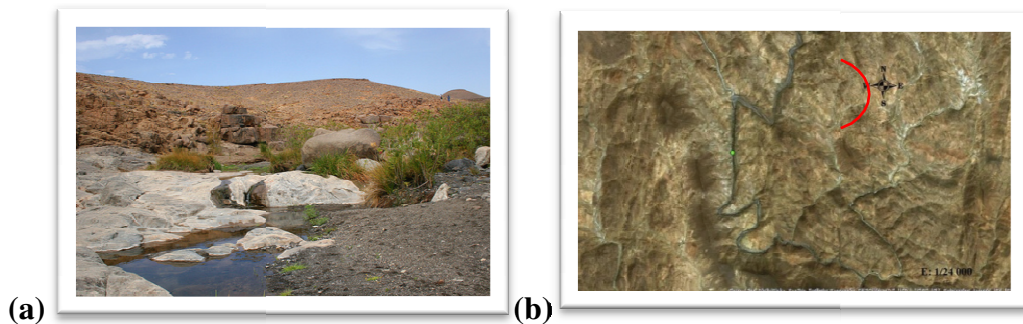


Figure 4.6: Guelta du Palmier (photographie originale) (a), Image satellite (Landsat8/CNES Airbus) de la Guelta du Palmier, Tamanrasset, Algérie (Arcgis) (b).

Souches bactériennes

Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne, des souches bactériennes Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas* sp.) et Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 et *Listeria monocytogenes*), ont été utilisées le long de ce travail de recherche.

4.1.2. Milieux de culture

Milieu BG11

1 L du milieu BG11, qui est le milieu spécifique pour l'isolement des cyanobactéries, contient (g/L): 1,5 NaNO₃, 0,04 K₂HPO₄, 0,075MgSO₄·7H₂O, 0,036 CaCl₂·2H₂O, 0,006 FeC₆H₅O₇ NH₄OH, 0,006 C₆H₈O₇, 0,001 C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈, 0,02 Na₂CO₃, auquel 1mL d'une solution d'oligoéléments A5 est ajouté, contenant (g/L): 2,86 H₃BO₃, 1,81 MnCl₂·4H₂O, 0,222 ZnSO₄·7H₂O, 0,39 NaMoO₄·2H₂O, 0,079 CuSO₄·5H₂O, 49,4 Co(NO₃)₂·6H₂O, pH (7,0).

Le milieu BG11 solide comprend la même composition que le liquide, supplémenté de 18 g d'agar par litre de milieu [124].

Milieu de culture liquide pour *Arthrospira* sp.

1L du milieu Zarrouk [57], milieu de référence utilisé pour la culture du genre *Arthrospira*, contient (g/L) : 2,5NaNO₃, 0,5K₂HPO₄, 10,0NaHCO₃, 1,0 NaCl, 0,2MgSO₄·7 H₂O, 0,02CaCl₂·2H₂O, 0,01 FeSO₄·7H₂O., auquel est ajouté 1mL de la solution A5 est ajouté contenant (g/L): 2,86 H₃BO₃, 1,81 MnCl₂·4H₂O, 0,39 Na₂MoO₄·2H₂O, 0,079 CuSO₄·5H₂O, 0,049 Co(NO₃)₂·6H₂O, et 0,222 ZnSO₄·7H₂O (pH 9,0).

Milieux de culture pour les souches bactériennes

- **Milieu liquide** : le milieu utilisé pour les précultures des souches bactériennes est le milieu Luria-Bertani (LB) contenant (g/L): extrait de levure 5, tryptone 10 et NaCl 10 (pH 7,0) ;
- **Milieu solide** : le milieu utilisé pour la culture des souches bactériennes indicatrices est le milieu Luria-Bertani solide (LB) contenant (g/L) : extrait de levure 5, tryptone 10, NaCl 10 et agar 18 (pH 7,0).

4.1.3. Tampons et réactifs

Réactifs

- Protéase alcaline Purafect® de *Bacillus licheniformis*, pH 10,0, 50 °C ;
- Gélatine bovine commerciale (GBC) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.) est utilisée comme polymère filmogène ;
- Glycérol anhydre, avec une pureté de 98%, a été utilisé comme plastifiant (Loba Chemie, Inde) ;
- Sulfate d'ammonium à 65% de saturation (Merk) utilisé comme agent précipitant.

Solutions et tampons

- 20 mM d'acétate de sodium et 50 mM de NaCl (pH 5,1) ;
- Tampon phosphate-citrate : 50 mM, pH 3,0 et 5,0;
- Tampon phosphate de sodium : 50 mM, pH 6,0 et 7,0;
- Tampon glycine-NaOH : 50 mM, pH 9,0;
- Tampon de charge : 2% SDS, 5% mercaptoéthanol et 0,002% de bleu de bromophénol (1:4; v/v).
- Solution de SDS à 0,1%.

4.2. Méthodes expérimentales

4.2.1 Isolement d'*Arthrospira* sp.

Afin de rechercher puis isoler les formes filamenteuses et spiralées appartenant au genre *Arthrospira* sp., les différentes étapes suivies sont :

Echantillonnage

Trois prélèvements d'eau de surface depuis la «Guelta du palmier», au niveau de différents points sont réalisés afin de rechercher et isoler des formes filamenteuses et/ou spiralées appartenant au genre *Arthrospira* sp. Les échantillons recueillis sont collectés séparément dans des flacons stériles d'une capacité de 1,5 L chacun, mis à 4 °C puis transportés au laboratoire.

Observations microscopiques des échantillons d'eau

L'examen microscopique est indispensable pour l'identification précise des genres et espèces de cyanobactéries dans les échantillons prélevés (si elles existent). L'examen direct des échantillons permet d'apprécier la morphologie des cyanobactéries, leur abondance ainsi que leur mobilité [124].

Dans notre étude, l'identification des genres de cyanobactéries existantes est réalisée, selon la clé d'identification proposée par Komàrek *et al.* [22] basée sur les caractères morphologiques de cultures axéniques.

Dans le but de chercher les formes filamenteuses et spiralées ou droites du genre *Arthrospira*, les échantillons d'eau sont observés au microscope optique *in situ* le jour même du prélèvement, par mise de quelques gouttes de l'échantillon naturel sur une lame, recouvrement avec une lamelle, et observation avec un grossissement x100 après ajout d'huile d'immersion.

Isolement des filaments d'*Arthrospira* sp.

L'isolement des filaments s'est effectué suivant les protocoles standards de microbiologie [124, 125, 126]

Plusieurs étapes de prétraitement par centrifugation, filtration sur filtres millipore (0,22 μm), lavage, dilution et repiquage sur milieu liquide des échantillons d'eau recueillis sont effectuées afin de concentrer les filaments et d'éliminer les impuretés ainsi que les potentiels contaminants (**Figure 4.7**).

Subséquentement, une aliquote de 1 mL de cet échantillon d'eau prétraitée est en premier lieu étalée sur milieu solide BG11 (pH 7,0), dans des conditions stériles.

Les boîtes de Pétri ainsiensemencées sont incubées à une température de 30 °C sous une lumière blanche d'une intensité de 20 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, en respectant une

photopériode de 24h/24h, durant 15 jours. Les filaments bleu-vert d'*Arthrospira* ainsi obtenus à partir de cette préculture solide sont réensemencés dans le milieu BG11 liquide (10 mL) puis exposés sous les mêmes conditions suscitées (**Figure 4.7**).

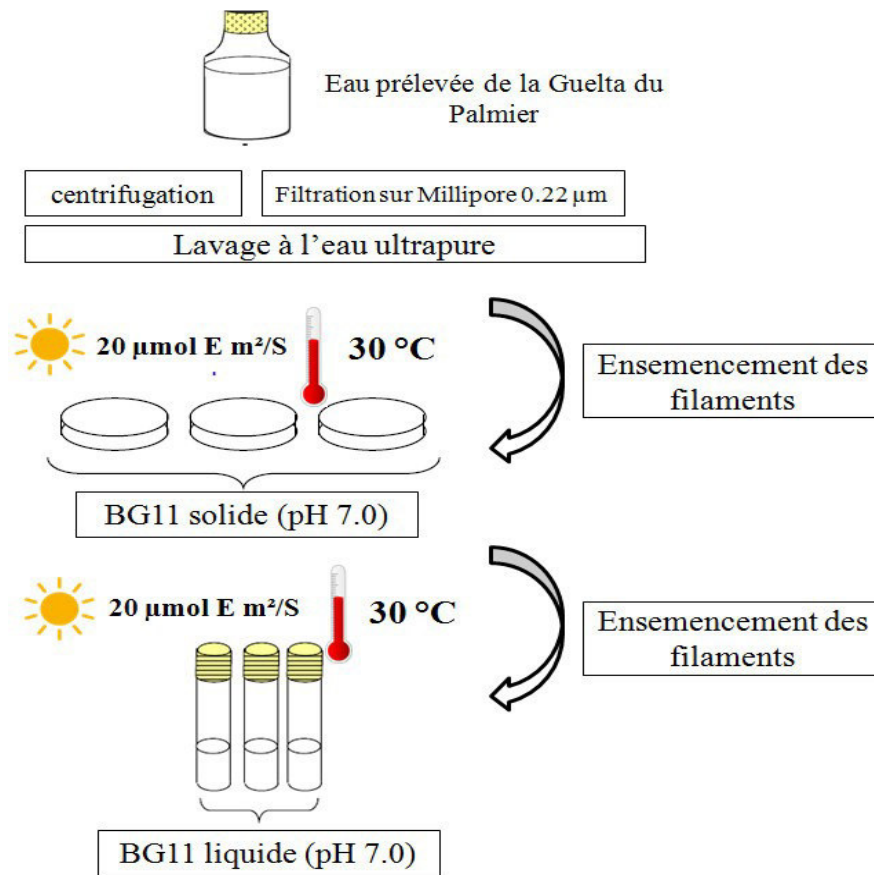


Figure 4.7 : Étapes d'isolement et de purification d'*Arthrospira* sp.

4.2.2. Paramètres et procédés de culture d'*Arthrospira* sp.

Suite à son isolement, *Arthrospira* sp. a été cultivée en bioréacteur dans le milieu de référence Zarrouk (1966) [57]. Les paramètres communs à la culture sont présentés comme suit :

- Caractéristiques du bioréacteur

Les cultures d'*Arthrospira* sp. ont été menées dans des bioréacteurs de 2, 10 et 20 L constitués d'un cylindre en verre. Un dispositif de prélèvement aseptique d'échantillons de la culture compose chaque bioréacteur;

- Préparation de l'inoculum

À partir de la culture pure d'*Arthrospirasp.*, un inoculum est préparé pour l'ensemencement de la culture menée dans le milieu Zarrouk (1966). Ceci consiste en une mise de 100 mL de milieu Zarrouk dans un Erlenmeyer de 250 mL, un ensemencement de l'Erlenmeyer avec 10 mL de la culture pure d'*Arthrospira sp.*, et d'une incubation pendant une semaine à une température de 30 °C, sous une lumière blanche continue d'une intensité de 20 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ selon une photopériode de 24h/24h;

- La température

Les bioréacteurs inoculés ont été soumis à différentes températures assurées par une chambre de culture;

- L'intensité de lumière

Les bioréacteurs inoculés ont été exposés à des intensités de lumière fournies par des lampes halogènes Phytoclaude (400 W). Cette intensité est mesurée au centre de chaque bioréacteur moyennant un photomètre type QSPAR Quantum silicon sensor (HD 8366);

- Agitation

L'agitation des cultures a été effectuée de façon continue à l'aide d'une pompe à air, dont le débit est constant et exprimé en volume d'air par volume de bioréacteur. La taille des bulles d'air conférées est de 3 mm;

- Récolte de la biomasse

La biomasse obtenue après chaque culture a été récupérée par filtration sur toile en nylon (20 μm de diamètre), rincée à l'eau distillée afin d'éliminer les sels de culture puis lyophilisée et maintenue à -20°C jusqu'à analyse.

Procédés de cultures

Dans ce travail, deux principaux modes de culture ont été adoptés afin de déterminer, d'une part, les conditions optimales pour la croissance de la souche isolée, et d'étudier, d'autre part, la variation de sa composition biochimique et sa production en EPS en fonction d'un stress à multiples facteurs combinés.

4.2.3. Culture en batch autotrophie

- Détermination des conditions optimales de croissance

Dans le but d'optimiser sa croissance, des cultures d'*Arthrospira* sp. ont été conduites en *triplicata* sous différentes combinaisons de température et d'intensité de lumière durant 8 jours (**Tableau 4.4**).

Chaque culture est inoculée initialement avec $0,08 \pm 0,0047$ g/L de biomasse sèche et menée en batch autotrophie dans des bioréacteurs fermés et stériles d'une capacité de 2 L, contenant 1,5 L du milieu Zarrouk stérile où l'agitation est de 0,1 v/v/min. Des prélèvements journaliers sont effectués afin de déterminer les phases de croissance.

Tableau 4.4: Différentes combinaisons de température et d'intensités de lumières

| Température (°C) | Intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) |
|---------------------|--|
| 30 | 20 |
| 30 | 40 |
| 30 | 80 |
| 35 | 20 |
| 35 | 40 |
| 35 | 80 |
| 40 | 20 |
| 40 | 40 |
| 40 | 80 |

- Détermination de l'effet de l'intensité de lumière sur la teneur en phycocyanine

Dans une seconde expérimentation, et afin d'étudier l'effet de l'intensité de la lumière, à la fois, sur la concentration en biomasse et la teneur de phycocyanine produite par *Arthrospira* sp., des cultures expérimentales axéniques en batch (1,5 L)

dans les mêmes conditions précédemment citées sont conduites en *triplicata* dans le milieu Zarrouk (1966), exposées, cependant, cette fois séparément à différentes intensités de lumière de 10, 20, 40, 60 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. Une culture menée dans les mêmes conditions, exposée à 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sa}$ été utilisée comme culture témoin. Des prélèvements journaliers ont été effectués afin de déterminer la phase exponentielle de croissance.

4.2.4. Culture en batch menée en deux phases

- Phase I : Précultures dans les conditions optimales de croissance

Des précultures en batch autotrophie sont conduites en *triplicata*, durant 10 jours, sous les conditions optimales de croissance (lumière et température) prédéfinies précédemment.

Ces précultures ont été menées dans des bioréacteurs contenant le milieu Zarrouk (1966) où l'agitation est de 0,1 v/v/min. Chaque préculture est inoculée initialement avec $0,08 \pm 0,0047$ g/L de biomasse sèche. Des prélèvements journaliers ont été effectués afin de déterminer la phase exponentielle de croissance.

- Phase II : Induction des métabolites intracellulaires et extracellulaires (EPS)

La biomasse est récoltée à partir des précultures à la fin de la phase exponentielle, et est concentrée par filtration. Cette biomasse est ensuite resuspendue de manière égale à raison de 10 mg/mL biomasse sèche dans plusieurs bioréacteurs de 250 mL contenant 100 mL du milieu expérimental Zarrouk (1966) approprié, où certains composants ont été variés.

Chaque culture expérimentale est incubée à 30 °C et exposée séparément à différentes intensités de lumière constantes, selon l'expérience à réaliser. Ainsi, plusieurs cultures expérimentales, impliquant différentes combinaisons de facteurs, sont générées. Après 3 jours de traitement, chaque culture expérimentale est filtrée, après avoir prélevé 15 mL pour la détermination des pigments.

Chaque biomasse ainsi obtenue est rincée 3 fois par de l'eau distillée afin d'éliminer les sels de culture puis lyophilisée et conservée à -20°C jusqu'à analyse ultérieure.

La totalité des filtrats recueillis de chaque culture expérimentale est conservée pour caractérisation.

4.2.5. Conception expérimentale des cultures

Afin d'investiguer l'effet d'un stress à facteurs multiples combinés (≥ 2 facteurs) appliqué aux cultures d'*Arthrospira* sp. et d'améliorer la production de ses métabolites intra et extracellulaires (EPS), une conception expérimentale basée sur les plans d'expérience est adoptée. Ainsi, deux plans ont été appliqués et les modalités de chaque plan sont décrites dans ce qui suit :

4.2.5.1. Plan composite central

- Domaine d'étude

Quatre facteurs indépendants ont été étudiés et variés tenant compte des essais préliminaires et de la littérature disponible. Le domaine de variation pour chaque facteur est résumé dans le **tableau 4.5**.

Tableau 4.5 : Valeur quantitative de chaque facteur étudié : intensité de lumière et concentration en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄

| Facteurs | Niveau des facteurs | | |
|---|---------------------|-------|-------|
| | -1 | 0 | 1 |
| Intensité de lumière ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 10,0 | 65,0 | 120,0 |
| NaNO ₃ (g/L) | 0,50 | 2,50 | 4,50 |
| K ₂ HPO ₄ (g/L) | 0,50 | 2,50 | 4,50 |
| NaCl (g/L) | 1,0 | 20,50 | 40,0 |

• Réponses expérimentales

Pour évaluer l'influence de l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄ sur la composition de la biomasse et la production en EPS, les réponses ciblées ont portées sur : le taux de sucres totaux, de lipides, de caroténoïdes totaux, de phycobiliprotéines exprimées en % de poids sec et sur la production en EPS exprimée en g d'EPS par g de poids sec de biomasse.

• La matrice expérimentale

Le plan d'expérience a généré un total de 27 expériences, dont 24 représentent les points du plan d'expérience impliquant la combinaison des facteurs aux différents niveaux étudiés. Les 3 points restants, représentent les points centraux qui permettent d'évaluer l'erreur expérimentale du modèle. La matrice expérimentale est indiquée dans le **tableau 4.6**.

Tableau 4.6 : Matrice expérimentale impliquant différente combinaisons d'intensités de lumière et concentration en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄

| | Lumière | NaCl | NaNO ₃ | K ₂ HPO ₄ |
|-----------------|---------|------|-------------------|---------------------------------|
| Phase I | 80 | 1 | 2,5 | 0,5 |
| Phase II | | | | |
| Essais | | | | |
| 1 | 10 | 1 | 0,5 | 0,5 |
| 2 | 120 | 1 | 0,5 | 0,5 |
| 3 | 10 | 40 | 0,5 | 0,5 |
| 4 | 120 | 40 | 0,5 | 0,5 |
| 5 | 10 | 1 | 4,5 | 0,5 |
| 6 | 120 | 1 | 4,5 | 0,5 |
| 7 | 10 | 40 | 4,5 | 0,5 |
| 8 | 120 | 40 | 4,5 | 0,5 |
| 9 | 10 | 1 | 0,5 | 4,5 |
| 10 | 120 | 1 | 0,5 | 4,5 |
| 11 | 10 | 40 | 0,5 | 4,5 |

| | | | | |
|----|-----|------|-----|-----|
| 12 | 120 | 40 | 0,5 | 4,5 |
| 13 | 10 | 1 | 4,5 | 4,5 |
| 14 | 120 | 1 | 4,5 | 4,5 |
| 15 | 10 | 40 | 4,5 | 4,5 |
| 16 | 120 | 40 | 4,5 | 4,5 |
| 17 | 10 | 20,5 | 2,5 | 2,5 |
| 18 | 120 | 20,5 | 2,5 | 2,5 |
| 19 | 65 | 1 | 2,5 | 2,5 |
| 20 | 65 | 40 | 2,5 | 2,5 |
| 21 | 65 | 20,5 | 0,5 | 2,5 |
| 22 | 65 | 20,5 | 4,5 | 2,5 |
| 23 | 65 | 20,5 | 2,5 | 0,5 |
| 24 | 65 | 20,5 | 2,5 | 4,5 |
| 25 | 65 | 20,5 | 2,5 | 2,5 |
| 26 | 65 | 20,5 | 2,5 | 2,5 |
| 27 | 65 | 20,5 | 2,5 | 2,5 |

4.2.5.2. Plan factoriel complet

- Domaine d'étude

Sur la base de quelques essais préliminaires et de considérations d'ordre industriel et économique, le domaine choisi pour les facteurs étudiés est résumé dans le **tableau 4.7**.

-

Tableau 4.7 : Valeur quantitative de chaque facteur étudié : intensité de lumière et concentration en NaCl

| Facteurs | Niveau des facteurs | | |
|---|---------------------|-------|------|
| | -1 | 0 | 1 |
| Intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) | 10 | 65 | 120 |
| NaCl (g/L) | 1 | 20,50 | 40,0 |

- Les réponses expérimentales

Une seule réponse a été sélectionnée et a porté sur la quantité d'EPS produite en g d'EPS par g de poids sec de biomasse.

• La matrice expérimentale

Le plan d'expérience a généré une matrice de 12 expériences, dont 9 représentent les points du plan d'expérience impliquant la combinaison des facteurs aux différents niveaux étudiés, et 3 représentent les points centraux qui permettent d'évaluer l'erreur expérimentale du modèle. La matrice expérimentale est indiquée dans le **tableau 4.8**.

Tableau 4.8 : Matrice expérimentale impliquant différentes combinaisons d'intensités de lumière et concentration en NaCl

| Essai | Intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) | NaCl(g/L) |
|-----------------|---|-----------|
| Phase I | 80 | 1 |
| Phase II | | |
| 1 | 10 | 1 |
| 2 | 65 | 1 |
| 3 | 120 | 1 |
| 4 | 10 | 20,5 |
| 5 | 65 | 20,5 |
| 6 | 120 | 20,5 |
| 7 | 10 | 40 |
| 8 | 65 | 40 |
| 9 | 120 | 40 |
| 10 | 65 | 20,5 |
| 11 | 65 | 20,5 |
| 12 | 65 | 20,5 |

4.2.6. Extraction des exopolysaccharides produits par *Arthrospira* sp.

L'extraction des exopolysaccharides chez *Arthrospira* sp. est initiée par filtration, à travers un papier filtre Whatman n° 2 (Whatman International Ltd., Maidston, UK), de 5 L de culture conduite sous les conditions qui maximisent la production en EPS, pour séparer les cellules du milieu de culture. Ensuite, le filtrat résultant de cette culture, contenant le milieu de culture et les EPS, a été concentré à 20 fois en utilisant un système d'ultrafiltration tangentielle (TFF Millipore, USA) à travers une membrane Millipore dont le seuil de coupure est de 5 kDa, sous une pression de 2 bars et un débit d'alimentation de 2 mL/min (**Figure 4.8**). Le retentât ainsi obtenu, contenant un concentré d'EPS et de sels de culture, est soumis à une étape de dessalement moyennant de l'eau ultra pure à un ratio d'un volume de retentât pour 5 volumes d'eau ultrapure (v/5v). Le nombre de lavages testé

est de 1 à 8 lavages, pour un dessalement optimal du retentât. Le dessalement est suivi par conductivité (conductimètre HI 8633), et le rendement en EPS est déterminé, après les étapes d'ultrafiltration et de lavage, comme suit :

$$\text{Rendement EPS} = (m_{\text{EPS total}} / m_{\text{EPS ultrafiltrés /lavés}}) \times 100$$

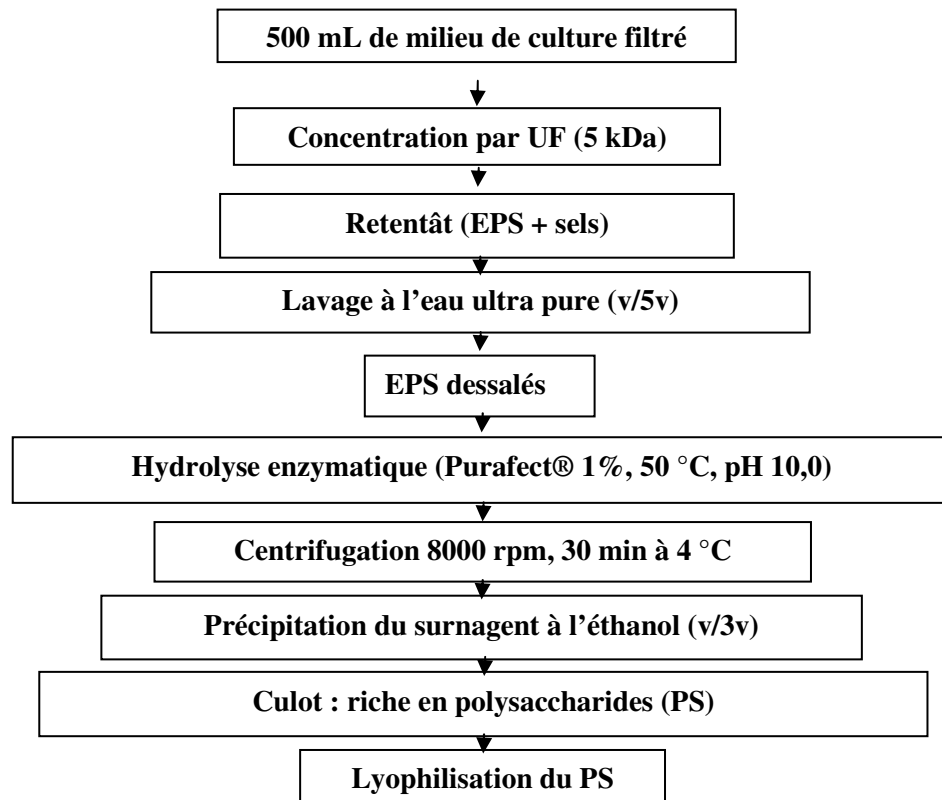


Figure 4.8 : Les étapes d'extraction de l'exopolysaccharide (PS)

Les EPS dessalés sont subséquemment déprotéinisés selon la méthode adoptée par Abdelhedi et al. [127]. Brièvement, les EPS sont mis en suspension dans de l'eau (20%, w/v). Le pH de la solution est ajusté à 10,0. Ensuite, 1% d'une protéase alcaline (Purafect®) est ajouté pour amorcer le processus de déprotéinisation. La réaction est effectuée durant 24 h à 50 ° C. Après refroidissement, le mélange est centrifugé à 8000 rpm pendant 30 min à 4 °C et le surnageant est précipité avec de l'éthanol absolu (96%) (v/3v) pendant une nuit à 4 °C. Le précipité obtenu est récupéré par centrifugation à 8000 rpm pendant 30 min à 4°C et le culot obtenu, enrichi en polysaccharides, est dissout dans un volume réduit d'eau distillée puis lyophilisé (**Figure 8**). Le rendement en PS est déterminé après l'étape de déprotéinisation comme suit :

$$\text{Rendement PS} = (m_{\text{EPS dessalés}} / m_{\text{PS}}) \times 100$$

4.2.7. Extraction de la phycocyanine

La biomasse d'*Arthrospira* sp. ayant servie pour l'extraction de la phycocyanine est obtenue suivant le procédé de culture en deux phases précédemment décrit. L'extrait aqueux brut de phycocyanine (PC-E) est obtenu selon la méthode de Kumar *et al.* [128] avec de légères modifications (**Figure 4.9**). La biomasse d'*Arthrospira* sp. est dégraissée à l'hexane puis dépigmentée à l'acétone selon un rapport de 1:10 (m/v).

De la biomasse dégraissée et dépigmentée est mise en suspension dans 100 mL tampon contenant 20 mM acétate de sodium et 50 mM NaCl (pH 5,1) à différents ratios (1/10, 1/20, 1/30, 1/40 et 1/50 (m/v)). Les mélanges sont ensuite soumis à trois cycles consécutifs de congélation à -20 °C et décongélation à température ambiante (25 °C ± 2), jusqu'à ce que le tampon se charge en une couleur bleue, la phycocyanine, suivis d'une centrifugation à 8000 rpm pendant 30 min à 4 °C, pour éliminer les débris cellulaires.

Afin d'isoler la phycocyanine, le surnageant est soumis à une précipitation en une seule étape à l'aide du sulfate d'ammonium à 65% de saturation pendant une nuit à 4 °C. Le culot contenant la phycocyanine est récupéré par centrifugation à 8000 rpm, pendant 30 min à 4 °C puis dissout dans 50 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 6,0).

L'extrait obtenu est dialysé à 4 °C pendant 48 h contre l'eau distillée en utilisant une membrane de dialyse dont le seuil de coupure est de 3,5 kDa. L'extrait dialysé résultant, noté PC-E, est ainsi récupéré puis filtré à travers un filtre Whatman n°2 (Whatman International Ltd., Maidston, UK).

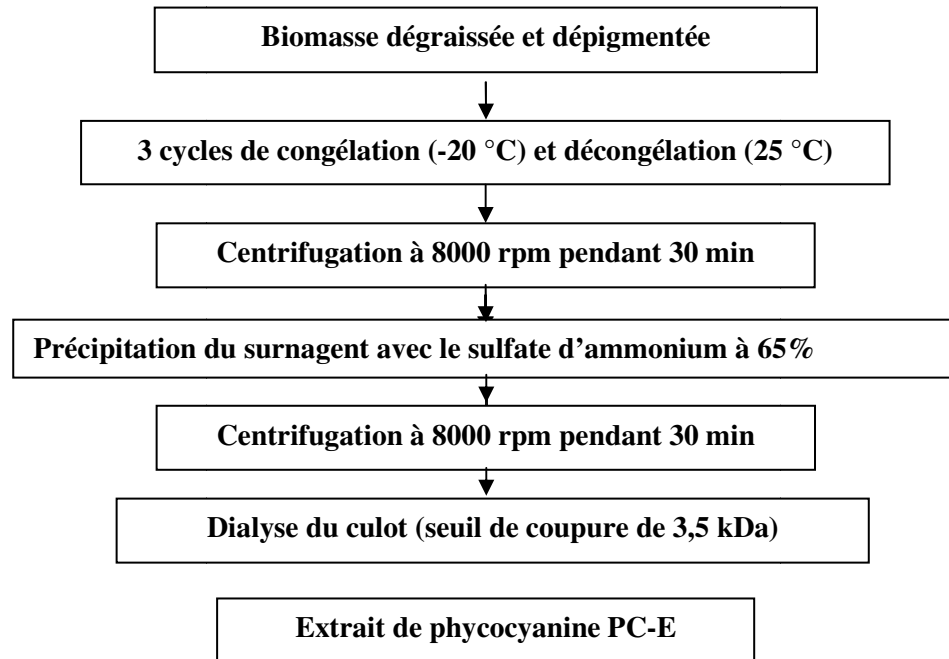


Figure 4.9 : Les étapes d'extraction de l'extrait de phycocyanine (PC-E)

4.2.8. Elaboration de films à base de gélatine incorporés avec l'extrait de phycocyanine d'*Arthrospira* sp.

Des films à base de gélatine bovine commerciale (GBC) incorporés avec l'extrait de phycocyanine (PC-E) ont été élaborés en adoptant le protocole de préparation schématisé sur la **figure 4.10**. Une solution de GBC, à une concentration de 4%, est préparée par solubilisation à 60 °C pendant 30 min, pH 5,5.

Après refroidissement de la solution de gélatine, l'extrait de phycocyanine est ajouté à différents ratios de 1,25, 2,5, 6,25 et 12,5% (m/m) par rapport à la masse de gélatine. Les mélanges sont agités à température ambiante (25 °C ± 2) pendant 60 min afin d'assurer la dispersion complète et homogène de l'extrait.

Le glycérol, utilisé comme plastifiant, est ensuite ajouté à raison de 15% (m/m GBC). Après agitation, 25 ml de chaque solution filmogène contenant le PC-E à différents ratios sont coulés dans des boîtes Pétri en plastique (12x12 cm) puis séchés dans une chambre climatisée et ventilée à 25 °C et à 30% humidité relative (HR) durant 24 h. Après séchage, les films obtenus sont pellés manuellement de la surface des boîtes Pétri, puis conservés à 25 °C et 50% HR jusqu'à analyse.

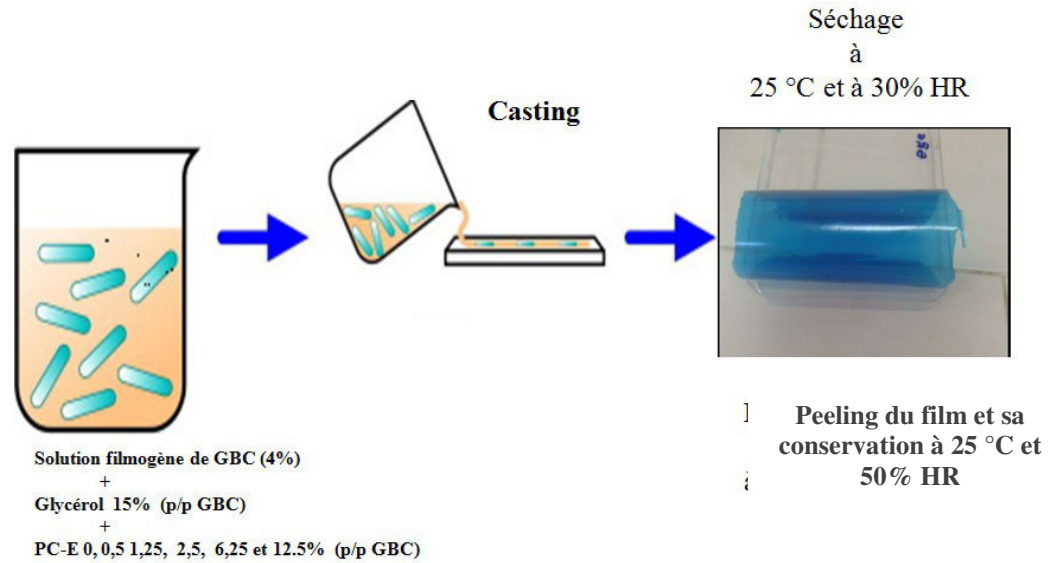


Figure 4.10 : Elaboration de films à base de gélatine bovine incorporés avec l'extrait de phycocyanine d'*Arthrospira* sp.

4.3. Méthodes analytiques

4.3.1. Monitoring des cultures d'*Arthrospira* sp.

Le monitoring des cultures d'*Arthrospira* sp. a été effectué en tenant compte de deux paramètres importants, la détermination de la concentration de la biomasse cultivée (g/L) et la détermination de la vitesse spécifique de croissance (μ_{\max} , jour⁻¹) de la souche cultivée. Une cinétique de croissance est ainsi établie.

4.3.1.1. Détermination de la concentration de la biomasse d'*Arthrospira* sp.

La concentration de biomasse est effectuée selon la méthode de Costa *et al.* [129] en mesurant quotidiennement la densité optique à 670 nm des échantillons de culture prélevés en rapportant ces valeurs à une courbe d'étalonnage préalablement préparée de la densité optique par rapport au poids sec de la biomasse (**Annexe 1**).

4.3.1.2. Vitesse de croissance d'*Arthrospira* sp.

La vitesse de croissance spécifique (μ_{\max} , jour⁻¹) d'*Arthrospira* sp. est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\mu_{\max} = (\ln X_2 - \ln X_1) / t_2 - t_1$$

où X_1 et X_2 sont les concentrations de biomasse en phase exponentielle, t_1 et t_2 sont l'intervalle de temps indiquant le début et la fin de la phase exponentielle, respectivement.

4.3.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques

4.3.2.1. Détermination de la matière sèche et du taux en cendres

Les teneurs en matière sèche et en cendres ont été déterminées selon les méthodes AOAC [130]. En ce qui concerne l'analyse de la matière sèche, 0,5g d'échantillon est séché à 105°C jusqu'à un poids constant, dans un creuset, préalablement lavé, séché et taré. Le creuset est pesé et la différence entre le poids du creuset contenant la matière sèche et la masse vide du creuset constitue le poids sec de l'échantillon. Quant au taux de cendre, 0,5 g d'échantillon est incinéré pendant 4 à 6 h à 550°C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le creuset est enfin pesé après refroidissement et le taux de cendres est calculé par simple soustraction.

4.3.2.2. Détermination de la teneur en protéines

- **Méthode de Kjeldahl**

La quantité des protéines totale dans la matière première ainsi que les différents échantillons préparés a été déterminée selon la méthode de Kjeldahl décrite par Crooke *et* Simpson [131]. Le processus consiste en une minéralisation de l'échantillon en présence d'un catalyseur (CuSO_4 et K_2SO_4 (10/1; m/m)) et de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). L'ammonium libéré suite à la minéralisation est distillé par du NaOH (10 N) pour former l'hydroxyde d'ammoniac (NH_4OH), récupéré subséquentement dans l'acide borique à une concentration de 20 g/L en présence du rouge de méthyle et du bleu de bromothymol. L'azote total est dosé par une titration acide-base moyennant l'acide sulfurique (0,1N).

La teneur en protéines est calculée par la formule suivante en utilisant un facteur de conversion de 6,25:

$$\text{Protéines (\%)} = \frac{N \times V \times 14 \times 6,25}{m} \times 100$$

avec m = la masse de l'échantillon analysé en g ; N = normalité de l'acide sulfurique (H₂SO₄) 0,1 N ; V = Volume de l'acide sulfurique en litres.

- **Détermination du taux de protéines solubles**

Méthode de Lowry

L'estimation de la teneur en protéines solubles a été réalisée selon la méthode décrite par Lowry *et al.* [132]. Dans un premier temps, 200 µ L de l'échantillon ont été mélangés avec 2 mL du réactif de Lowry (2% Na₂CO₃ dissoute dans la soude (NaOH, 1 M); 5% CuSO₄; 10% tartrate double de Na et de K; avec un ratio volumique 50:1:1) et 200 µ L du réactif de Folin dilué 2 fois.

Suite à une incubation à l'obscurité durant 30 min, la DO a été mesurée à 750 nm. Le sérum albumine bovine (SAB) est utilisé comme référence pour tracer la courbe d'étalonnage (**Annexe 1**). Le taux de protéines est exprimé en mg de protéines par 100 mg de poids sec de l'échantillon.

Méthode de Bradford

La détermination de la teneur en protéines solubles a été réalisée suivant la méthode de Bradford [133]. Brièvement, 100 µ L de l'échantillon ont été mélangés avec 1 mL du réactif de Bradford. Suite à une incubation à l'obscurité durant 5 min, la DO a été lue à 595 nm. Le sérum albumine bovine (SAB) a été utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage (**Annexe 2**). Le taux de protéines est exprimé en mg de protéines par 100 mg de poids sec de l'échantillon.

4.2.2.3. Détermination du taux de lipides

Méthode de Soxhlet

Le taux des lipides a été déterminé moyennant une extraction par Soxhlet selon la méthode décrite par l'AOAC [130], en utilisant l'hexane comme solvant d'extraction des lipides. Après évaporation à 50 °C moyennant un évaporateur rotatif et séchage à 105°C, le ballon est pesé et la masse de la matière grasse est déterminée par différence entre la masse du ballon contenant les lipides et celle du ballon vide.

Méthode de Folch

Les lipides totaux sont estimés par gravimétrie selon la méthode de Folch [134]. Brièvement, 10 mg de l'échantillon ont été mis dans 2 mL d'un mélange de solvants composés de chloroforme et de méthanol (2:1; v/v). Le mélange est agité pendant 15 min à l'aide d'un shaker à une température ambiante, et après filtration de l'extrait obtenu à travers une membrane de 0,22 µm de diamètre (Millipores), 10 mL d'eau distillée sont ajoutés au filtrat. Une fois que les deux phases sont bien distinguées, la phase organique (supérieure) est prélevée et évaporée sous un flux de N₂. Les lipides totaux sont exprimés en % (mg de lipides par 100 mg de poids sec de l'échantillon).

Méthode de Razenka

La teneur en lipides totaux est déterminée selon la méthode de Razenka *et al.* [135]. Ainsi, 30 mg de l'échantillon sont mélangés avec 5 mL d'une solution composée de méthanol/eau/HCl à un ratio volumique de 30:3:1 (v/v/v) et maintenus à 55 °C durant 6 h. Par la suite, 15 mL d'un mélange eau-hexane froid (2:1; v/v) sont ajoutés à chaque échantillon et vortexés pendant 20 s. Après séparation, la phase d'hexane est récupérée, filtrée puis concentrée à sec sous un flux d'azote. Cette opération est répétée avec le résidu obtenu en utilisant 5 mL de chloroforme. La couche de chloroforme est filtrée puis concentrée à sec sous un flux d'azote (N₂). L'ensemble des extraits secs obtenus sont combinés et dissous dans 1 mL de mélange hexane-chloroforme (1:1; v/v), éliminé ensuite par évaporation sous azote. La teneur en lipides totaux est estimée par gravimétrie et est exprimée en % (mg de lipides par 100 mg de poids sec d'échantillon).

4.2.2.4. Détermination du taux de sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois [136]. Un mélange de 1 mL de l'échantillon avec 5 mL d'acide sulfurique et 1 mL de phénol (5%) sont incubés à 100 °C pendant 5 min. Cette réaction produit des dérivés du furfural qui se condensent avec le phénol (5%) pour donner un complexe de couleur brun, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de sucres neutres. La densité optique est déterminée à 490 nm et la concentration des sucres neutres est obtenue par courbe d'étalonnage préétablie (**Annexes 1 et 2**). Le taux de sucres totaux est exprimé en % (mg de sucres totaux par 100 mg de poids sec de l'échantillon).

4.2.2.5. Détermination des caroténoïdes totaux

Un volume de 5 mL de chaque culture expérimentale a été filtré à l'aide d'un filtre en microfibrilles de verre (diamètre 24 mm; taille des pores de 1,5 µ m; Whatman, Royaume-Uni), puis dissout dans 5 mL d'acétone. Après 24 h de macération à l'obscurité, une centrifugation est réalisée (4000 rpm, 10 °C, pendant 20 min), et la DO est mesurée à 470 et 662 nm moyennant un spectrophotomètre UV-visible (DU-530, Beckman Coulter, USA). La concentration des caroténoïdes totaux a été calculée selon la formule de Lichtenthaler [137] :

$$\text{Caroténoïdes totaux (mg/mL d'extrait)} = DO_{470} - 1,90 (DO_{662} / 92,45) / 214$$

La teneur en caroténoïdes totaux est exprimée en% (mg de caroténoïdes totaux par 100 mg de poids sec d'échantillon).

4.2.2.6. Détermination des phycobiliprotéines

Un volume de 10 mL d'une culture d'*Arthrospira* sp. est filtré à travers un filtre en microfibrilles de verre (diamètre 24 mm; taille des pores de 1,5 µ m; Whatman, Royaume-Uni), mis en suspension dans 10 mL d'une solution de CaCl₂ à 10%, puis, soumis à 3 cycles consécutifs de congélation et de décongélation. Après apparition de la couleur bleue, une centrifugation est menée à 4000 rpm pendant 30 min à 10 °C, suivie par une lecture de la DO à 620, 652 et 565 nm moyennant un spectrophotomètre UV-visible (DU-530, Beckman Coulter, USA).

La concentration en phycobiliprotéines, pour une biomasse fraîche, est calculée selon la formule donnée par Bryant *et al.* [138]:

$$\text{Phycobiliprotéines} = \text{Phycocyanine (PC)} + \text{Allophycocyanine (APC)} + \text{Phycoérythrine (PE)}$$

$$\text{Phycocyanine (mg/mL d'extrait)} = (DO_{620} - 0,72DO_{652}) / 6,29$$

$$\text{Allophycocyanine (mg/mL d'extrait)} = (DO_{652} - 0,191 DO_{620}) / 5,79$$

$$\text{Phycoérythrine (mg/mL d'extrait)} = (DO_{565} - 2,41 (PC) - 1,4 (APC)) / 13,02$$

La détermination de la concentration en phycocyanine, pour une biomasse séchée, est calculée selon l'équation proposée par Bennett *et Brograd* [139] :

$$\text{Phycocyanine (mg/mL d'extrait)} = (DO_{620} - 0,474 DO_{652}) / 5,34$$

La pureté de la phycocyanine est déterminée selon le ratio suivant :

$$\text{Pureté de la phycocyanine} = DO_{620}/DO_{280}$$

Les résultats sont exprimés en% (mg de phycobiliprotéines par 100 mg de biomasse sèche).

4.2.2.7. Quantification des EPS

La quantité produite en EPS est déterminée en utilisant la méthode décrite par Lewin [140]. Brièvement, les filtrats totaux récupérés des cultures ont été séchés par évaporation dans une étuve à 105 °C. Les matières séchées obtenues sont ensuite incinérées dans un four à moufle à 550±5 °C jusqu'à apparition de cendres blanches. Enfin, le creuset est pesé après refroidissement et la teneur en EPS est calculée par simple soustraction de l'humidité et des cendres. La teneur en EPS est exprimée en g par g de biomasse sèche.

4.2.2.8. Détermination des groupements sulfate

Les groupements sulfates ont été déterminés selon la méthode de chlorure de baryum- gélatine décrite par Llyod *et al.* [141]. Brièvement, 10 mL de l'échantillon (EPS et PS) sont hydrolysés avec 0,5 mL de HCL (2M) pendant 2h à 100 °C. Après refroidissement de l'hydrolysate, une centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min est effectuée. Ensuite, 1 mL du surnageant est mélangé avec 0,5 mL du réactif chlorure et

baryum-gélatine. Le mélange est laissé 30 min à température ambiante et l'absorbance est lue à 360 nm. La teneur en sulfate de l'EPS et PS est déterminée par courbe d'étalonnage préétablie (**Annexe 2**) et est exprimée en % (mg de sulfate par 100 mg de poids sec d'EPS/PS).

4.2.2.9. Détermination de la couleur

Les paramètres colorimétriques du PC-E et des différents films enrichis en PC-E (L^* : mesure de 0 (noir) à 100 (blanc) ; a^* : mesure de -100 (vert) à +100 (rouge) et b^* : mesure de -100(bleu) à +100 (jaune)) ont été déterminés à l'aide d'un spectro-calorimètre (Hunter Associates Laboratory, USA).

Une plaque de couleur blanche standard ($L^*= 96,74$; $a^*= 0,09$; $b^*=2,20$) a été utilisée comme fond de référence pour la mesure de la couleur des films. La différence entre les couleurs a été calculée comme suit :

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

où ΔL^* , Δa^* et Δb^* sont les différences entre les paramètres de couleur correspondants entre le film et le PC-E par rapport à la référence.

4.3.3. Méthodes de caractérisation de PC-E

4.3.3.1. Détermination du profil électrophorétique

La distribution de la masse moléculaire du PC-E est investiguée moyennant une électrophorèse sur gel suivant la méthode de Laemmli [142]. De ce fait, des gels de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium ou «*SDS-PAGE*» (7,5% et 12%) sont préparés. Avant dépôt, l'échantillon est mélangé à une proportion de 1:4 (v/v) avec le tampon de charge contenant 2% SDS, 5% mercaptoéthanol et 0,002% bleu de bromophénol, et ensuite soumis à une dénaturation à 100 °C pendant 5 min. L'électrophorèse est effectuée à 100 V pendant 90 min, et après migration, le gel est coloré avec du bleu de Coomassie brillant R-250, puis décoloré. La distribution de la masse moléculaire de l'échantillon est déterminée à l'aide de marqueurs protéiques standards de masses moléculaires connues allant de 14 à 220 kDa.

4.3.3.2. Solubilité en fonction du pH

La solubilité du PC-E est évaluée selon la méthode décrite par Nirmala *et al.* [143]. Brièvement, 100 mg de PC-E sont mélangés avec 10 mL d'eau distillée, puis le pH de la solution est ajusté à des valeurs de pH allant de 2,0 à 11,0 moyennant du HCl (1 M) ou du NaOH (1 M). Les mélanges sont agités pendant 15 min puis centrifugés à 8000 rpm pendant 15 min. Le surnageant résultant de chaque solution est récupéré et utilisé pour quantifier la teneur en protéines solubles selon la méthode de Lowry *et al.* [133]. Les résultats sont exprimés en % de protéines solubles pour chaque valeur de pH, par rapport à la quantité de protéines initiale.

4.3.3.3. Propriétés spectrales en fonction du pH

La détermination des propriétés spectrales de PC-E en fonction du pH est effectuée par la préparation de solutions de PC-E dans différents tampons : tampon phosphate-citrate (50 mM) pour des valeurs de pH de 3,0 à 5,0, tampon phosphate de sodium (50 mM) pour des valeurs de pH de 6,0 et 7,0, et tampon glycine-NaOH (50 mM) pour pH 9,0. Les spectres d'absorption UV-visible des solutions de PC-E ont été enregistrés en utilisant un spectrophotomètre UV-visible dans la gamme de 200 à 800 nm.

4.3.3.4. Détermination de la thermostabilité de la phycocyanine contenue dans le PC- E

La stabilité thermique de la phycocyanine a été déterminée selon la méthode proposée par Antelo *et al.* [144] avec de légères modifications. Dans un premier temps, des solutions de PC-E ont été préparées dans le tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 6,0), puis incubées à différentes températures allant de 30 à 90 °C pendant 75 min.

Dans un second temps, la thermostabilité de PC-E en fonction du temps d'incubation a été déterminée suite à l'incubation des solutions de PC-E (pH 6,0) à une température donnant 50% d'instabilité durant 120 min. Des prélèvements réguliers à un intervalle de 15 min ont été effectués. La stabilité thermique est définie comme étant la concentration relative ($CR_{PC}\%$) restante de l'échantillon par rapport à sa concentration initiale et est calculée comme suit :

$$CR_{PC} (\%) = [C_{PC} (f) / C_{PC} (i)] \times 100$$

où $C_{PC(f)}$ est la concentration après chaque traitement, et $C_{PC(i)}$ est la concentration initiale de l'échantillon. L'évaluation de la stabilité thermique est effectuée en *triplicata*.

4.3.3.5. Effet du type et de la concentration des agents stabilisants sur la stabilité thermique de PC-E

L'effet du type de l'agent stabilisant et de sa concentration sur la stabilité thermique de la phycocyanine est évalué selon la méthode de Chaikhalan *et al.* [145] avec quelques modifications. Des solutions de l'échantillon préparées dans le tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 6,0) ont été mélangées avec différents stabilisants, à savoir le sucrose à un rapport de 1:4 (m/m), ainsi que le polyéthylène glycol 4000 (PEG- 4000) et le sorbitol à un ratio allant de 1:4 (m/m) à 1 :100 (m/m), puis lyophilisées. Les poudres ainsi obtenues sont ré-solubilisées dans le tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 6,0) et incubées pendant 75 min à 60 °C. Les valeurs de RC ont ensuite été déterminées comme précédemment mentionné.

4.3.4. Méthodes de caractérisation des films d'emballage incorporés en phycocyanine

4.3.4.1. Solubilité dans l'eau

La solubilité des films préparés dans l'eau a été déterminée selon la méthode de Gennadios *et al.*, [146]. Brièvement, 100 mg de chaque film sont immergés dans des flacons contenant 50 mL d'eau distillée. Les flacons sont ensuite placés dans un agitateur à une température de 25 °C pendant 24 h. Les résidus des échantillons non dispersés dans l'eau obtenus ont été récupérés puis séchés à 105 °C pendant 24 h, afin déterminer leur poids sec. La solubilité est calculée par simple soustraction entre le poids sec des résidus non dissous et le poids sec initial de chaque échantillon comme suit :

$$\text{Solubilité (\%)} = [(m_i \times (100 - TH)) - n_f] / [m_i \times (100 - TH)] \times 100$$

Où m_i : poids initial de l'échantillon (g), n_f : poids final de l'échantillon sec (g), TH ; teneur en humidité (%).

4.3.4.2. Mesure de l'épaisseur

L'épaisseur des films préparés est mesurée en utilisant un pieds à coulisse numérique (PosiTector6000, DeFelsko Corporation, USA). Chaque mesure a été effectuée à partir de différentes positions (centre et périmètre). La valeur d'épaisseur moyenne a été utilisée dans le calcul de la transparence et a été prise en compte pour la détermination des propriétés mécaniques.

4.3.4.3. Détermination de la transmission de la lumière et de la transparence

Le principal objectif de ces mesures est de déterminer l'effet barrière à l'UV des différents films préparés ainsi que leur transparence. Les mesures de transmittance ont été effectuées moyennant un spectrophotomètre UV-visible de 200 à 800 nm. La transparence des différents films est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Transparence} = -\log T_{600}/X$$

avec T_{600} est la transmittance à 600 nm et X est l'épaisseur moyenne du film

4.3.5. Méthodes d'analyses techno-fonctionnelles du PC-E

4.3.5.1. Propriétés émulsifiantes

L'indice de l'activité émulsifiante (IAE) et l'indice de la stabilité de l'émulsion (ISE) du PC-E ont été déterminés selon la méthode de Pearce *et* Kinsella [147] avec une légère modification. Des solutions de PC-E à différentes concentrations de 0,025, 0,05, 0,5, 0,75, 1 et 1,5 % (m/v) et à pH 6.0 où le PC-E est hautement soluble, ont été préparées. Ensuite, 10 mL d'huile de soja sont ajoutés à chaque solution et homogénéisés pendant 1 min à température ambiante (25 ± 1 °C) moyennant un ultra-turrax. Des aliquotes de chaque émulsion (100 uL), prélevées à partir de chaque tube à 0 et 10 min après l'homogénéisation, sont subséquemment ajoutées à 900 μ L d'une solution de SDS à 0,1% et l'absorbance à 500 nm des échantillons dilués est mesurée immédiatement. L'indice d'activité émulsifiante (IAE) est calculé comme suit :

$$\text{IAE (m}^2/\text{g)} = (2 \times 2,303 \times A_0) / (Q \times C)$$

où A_0 représente l'absorbance de l'émulsion à 500 nm ; C : concentration en protéine dans PC-E (g/mL) ; et ϕ est la fraction volumique de l'huile (0,25). Toutes les déterminations ont été effectuées en *triplicata*.

L'indice de stabilité de l'émulsion (ISE) représente la différence entre l'IAE à temps 0 et celle mesurée après 10 min. ISE est calculé en suivant la formule ci-dessus :

$$\text{ISE (min)} = A_0 \times \Delta T / \Delta A$$

4.3.5.2. Propriétés moussantes

La capacité moussante (CM) et la stabilité de la mousse (SM) du PC-E ont été déterminées selon la méthode de Shahidi *et al.* [148]. Brièvement, des solutions de PC- E (20 mL) préparées à différentes concentrations de 0,025, 0,05, 0,5, 0,75, 1 et 1,5% (m/v), ont été homogénéisées à température ambiante (25 ± 1 °C) à l'aide d'un ultra- turrax pendant 1 min afin d'incorporer l'air. Les échantillons aérés sont ensuite immédiatement transférés dans une éprouvette graduée de 50 mL où le volume total est mesuré. La capacité moussante est exprimée en pourcentage d'augmentation du volume après homogénéisation à 0 min, et calculée par rapport au volume initial de l'échantillon, selon la formule suivante :

$$\text{CM (\%)} = [(V_T - V_0) / V_0] \times 100$$

Les échantillons traités ont été laissés au repos pendant 30 et 60 min à température ambiante, ensuite les volumes ont été remesurés. La stabilité de la mousse a été calculée en se basant sur le volume de la mousse restant après 30 et 60 min selon la formule suivante :

$$\text{SM (\%)} = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100$$

où V_0 , V_T et V_t sont, respectivement, le volume de la solution avant la formation de la mousse, volume de la mousse à temps 0 min et le volume de la mousse après 30 et 60 min.

4.4.6. Méthodes d'analyses structurales

4.4.6.1. Analyse de la structure par infrarouge

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IR-TF) ont été déterminés en utilisant un spectromètre infrarouge Perkin Elmer Spectrum équipé d'un accessoire de réflexion totale atténuée (ATR). Les échantillons sont analysés dans la région des nombres d'onde comprise entre 500 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} .

4.4.6.2. Analyse de la microstructure

Les micrographes de la section des films préparés, dont la plage d'agrandissement est de 500 à 1000 fois, ont été réalisés à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage Environnemental (ESEM, Phillips XL 30 ESEM, Japan).

4.4.7. Méthodes d'analyses thermiques

4.4.7.1. Analyse par balayage calorimétrique différentiel (DSC)

L'analyse DSC a été effectuée sur des échantillons préalablement conditionnés à 25 °C et à 0% d'humidité relative (gel de silice) pendant 48 h pour assurer un état de déshydratation maximal avant analyse. Ensuite, 5 mg de l'échantillon (EPS, PS, PC-E et films enrichis en PC-E) ont été conditionnés et scellés hermétiquement dans des capsules en aluminium (DSC, PerkinElmer®) et analysés à l'aide d'un calorimètre à balayage différentiel (DSC Q20 V24.11 construire 124, TA instruments). Le programme de température adopté est le suivant :

- Une étape d'équilibre de l'échantillon à 25 °C , suivi par un refroidissement de 25 à -50 °C avec une vitesse de 10 °C ;
- Un isotherme pendant 5 min suivi d'un chauffage jusqu'à 200 °C avec une vitesse de 10 °C/min ;
- Un refroidissement de 150 °C à -50 °C à une vitesse de 10 °C/min ;
- Un second chauffage jusqu'à 150 °C à une vitesse de 10 °C/min ;
- Un dernier refroidissement jusqu'à 25 °C .

La température des transitions structurales et les enthalpies de transition sont déterminées en *duplicata* à partir du second chauffage en utilisant le logiciel TA Universal Analysis (TA Instruments Universal Analysis 2000, version 4.5A).

4.4.7.2. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été utilisée pour étudier la stabilité thermique des différents films préparés. Les mesures ont été effectuées en *duplicata* en utilisant un appareil d'analyse thermique TA (Q500 Haute Résolution, TA Instruments), sous flux d'azote. Environ 10 mg des différents films ont été chauffés de 25 à 600°C, à une vitesse de chauffage de 20°C/min. Le poids de l'échantillon a été constamment mesuré avec une précision de 0,01 mg. Les films ont été initialement stockés à 25°C et 50% d'humidité relative pendant deux semaines avant chaque mesure.

4.4.8. Analyse du comportement rhéologique

Précédant l'analyse, des solutions de l'expolysaccharides obtenu après déprotéinisation des EPS (PS) à différentes concentrations ont été préparées dans du NaCl 0,1 M (pH 6,5) afin d'annuler toute interaction électrostatique entre les chaînes du polymère pouvant fausser son comportement rhéologique. L'analyse rhéologique a été ainsi réalisée en utilisant un rhéomètre (Physica MCR 301, Anton Paar, GmbH, Allemagne) de géométrie plan-plan (diamètre de 25mm, espace de 0.5mm). La température utilisée lors de l'analyse est 20 °C, modulée à l'aide d'un bain circulant Viscotherm VT 2 et contrôlée avec un système Peltier (Anton Paar) d'une précision égale à 0,1 °C et les données rhéologiques ont été analysées avec le logiciel Rheoplus (Anton Paar). Afin d'explorer le comportement rhéologique de l'échantillon dans les milieux aqueux, trois types d'analyse sont à réaliser.

4.4.8.1. Détermination de l'écoulement

Il s'agit de l'analyse du comportement visqueux, effectuée sous cisaillement variable en régime continu allant de 10^{-3} à 10^3 s⁻¹. Les courbes du comportement d'écoulement sont ajustées selon le modèle rhéologique de Carreau [149], présenté par l'équation suivante:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{\left(1 - \left(\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_c\right)^2\right)^P}$$

Les courbes d'écoulement obtenues sont exprimées par la variation de la viscosité apparente, η (Pa. s), en fonction de la vitesse de cisaillement, $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) et sont appréciées par les quatre paramètres η_0 , η_{∞} , $\dot{\gamma}_c$ et P où:

η_0 : Viscosité zéro-cisaillement (Pa. s) ; η_{∞} : Viscosité infini-cisaillement (Pa. s); $\dot{\gamma}_c$:

Taux de cisaillement critique (s^{-1}); $\dot{\gamma}$: Taux de cisaillement (s^{-1}) ;

P : Exposant du modèle de Carreau.

4.4.8.2. Détermination de la viscoélasticité

L'analyse du comportement viscoélastique a été effectuée sous cisaillement oscillatoire pour une fréquence $f = 1$ Hz, sous une température de 20 °C. Des courbes traduisant la variation des deux modules de conservation «G'» et de perte «G''», en fonction de l'application d'une rampe croissante de déformation, γ , allant de 0,1 à 1000 %, ont été obtenues.

4.4.8.3. Détermination de la thermo-viscoélasticité

L'analyse du comportement thermo-viscoélastique, dans le domaine de la viscoélasticité linéaire (*LVE range*), a été effectuée par la mesure de la sensibilité des deux modules G' et G'', à l'application d'une rampe croissante de température allant de 20 à 80 °C à raison de 2 °C par min, suivie d'une rampe décroissante allant de 80 °C à 0 °C (2 °C par min), sous un cisaillement constant ($f = 1$ Hz, $\gamma = 1\%$).

De l'eau distillée a été ajoutée autour du dispositif analytique de la plaque pour éviter l'évaporation de la solution d'eau lors du chauffage.

4.4.9. Propriétés mécaniques des films incorporés avec l'extrait de phyco cyanine d'*Arthrospira* sp.

Les propriétés mécaniques des films préparés sont principalement basées sur la détermination de deux paramètres, l'élongation à la rupture (ER, %) et la résistance à la

traction (RT, MPa), en utilisant un rhéomètre MCR (Anton Paar) selon la norme NF EN [149]. Préalablement aux analyses, l'échantillon a été équilibré pendant deux semaines à 25 °C et 50% d'humidité relative, puis découpé en rectangles (1 cm x 4,5 cm) en utilisant un cutter de précision standardisé (Thwing-Albert JDC Precision Cutter de l'échantillon) afin d'obtenir une largeur précise et des côtés parallèles sur toute la longueur du film. L'échantillon rectangulaire de film équilibré est fixé par des pinces d'extension liées à l'appareil et est étendu de manière uniaxiale avec une vitesse de traverse égale à 50 mm/min [150] jusqu'à ce que la rupture ait lieu. La force maximale et l'extension finale à la rupture sont alors déterminées à partir des courbes de contrainte-déformation obtenues et servent, respectivement, au calcul de la RT et de l'ER. Cette opération a été réalisée à température ambiante (25 ± 2 °C), et répétée au moins six fois pour chaque échantillon.

4.4.10. Détermination des activités biologiques

4.4.10.1. Activités antioxydantes

L'évaluation de la capacité antioxydante a été réalisée selon plusieurs tests complémentaires. Tous les tests ont été réalisés au moins trois fois, en utilisant un antioxydant de référence appliqué comme standard. L'activité antioxydante de PC-E et du PS a été testée sur une gamme de concentrations allant de 0,25 à 5 mg/mL et 0,15 à 1,5 mg/mL, respectivement. Par ailleurs, la capacité antioxydante pour chaque film préparé, a été testée sur 10 mg de film immergés dans 0,5 mL d'eau distillée.

- **Test de l'inhibition du blanchiment au β-carotène**

Une émulsion, contenant 0,5 mg de β-carotène dissous dans 1 ml de chloroforme, 25 µl d'acide linoléique et 200 µ L d'un émulsifiant (Tween 40), est tout d'abord préparée. Suite à l'évaporation du chloroforme, le résidu du β-carotène et d'acide linoléique est dilué dans 100 mL d'eau bidistillée pour former la solution A. La solution B est préparée de la même manière que la solution A, mais sans ajout du β-carotène. Ensuite, 500 µ L de l'échantillon ou du BHA (témoin positif) sont mélangés avec 2,5 mL de la solution A pour les tubes réactions et contrôles, alors que les tubes blancs contiennent l'échantillon (0,5 mL) avec 2,5 mL de la solution B. Le mélange est incubé pendant 2 h à 50°C, et le pouvoir antioxydant est calculé selon la formule suivante [151] :

$$\text{Inhibition du blanchiment de } \beta - \text{ carotène}(\%) = \left(1 - \frac{A_{0E} - A_{120E}}{A_{0C} - A_{120C}}\right) \times 100$$

avec A_{0E} et A_{0C} sont les absorbances, mesurées à l'instant T_0 , de l'échantillon et du contrôle, respectivement. A_{120C} et A_{120E} sont les absorbances de l'échantillon et du contrôle, mesurées à T_{2h} , respectivement.

- **Pouvoir réducteur**

Cette méthode permet de déterminer la capacité de l'échantillon à réduire le fer ferrique du $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) selon la méthode décrite par Yildirim *et al.* [152]. Brièvement, 0,5 mL de l'échantillon sont mélangés avec 1,25 mL d'une solution de $K_3Fe(CN)_6$, 10 g/L et 1,25 mL de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et le mélange est incubé pendant 30 min à 50 °C. Par la suite, 1,25 mL TCA (10%) est additionné et le mélange est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant (1,25 mL) est mélangé avec 1,25 mL d'eau distillée et 250 μ L du chlorure ferreux (1 g/L). Enfin, la DO est lue à 700 nm après une incubation pendant 10 min.

- **L'effet chélateur**

L'effet chélateur des différents échantillons est déterminé selon la méthode de Decker *et Welch* [153]. Le principe consiste à inhiber la formation du complexe Fe^{2+} -Ferrozine après l'ajout de l'échantillon. Un volume de 100 μ L de l'échantillon est ajouté à 50 μ L de $FeCl_2$ (2 mM) et 450 μ L d'eau distillée. Après incubation pendant 3 min, 200 μ L de la solution de Ferrozine (5mM) sont ajoutés et le mélange est agité et incubé de nouveau pendant 10 min à température ambiante. L'éthylène diamine tétra- acétique (EDTA) a été utilisé comme étant l'agent chélateur de référence. La capacité de l'échantillon à chélater les ions Fe^{2+} et inhiber la formation du complexe Fe^{2+} -Ferrozine est déterminée en mesurant la DO à 562 nm et le pouvoir antioxydant est exprimée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Chélation(\%)} = \frac{A_C + A_B - A_R}{A_C} \times 100$$

avec A_C est l'absorbance du tube contrôle, A_R et A_B sont les absorbances de la solution de chitosane dans le mélange réactionnel et sans addition de Ferrozine, respectivement. Les expériences ont été réalisées en *duplicata*.

- **Activité antiradicalaire**

Le pouvoir antiradicalaire des échantillons est déterminé selon la méthode détaillée par Bersuder *et al.* [154]. Ce test a pour objectif d'estimer la capacité de l'échantillon à neutraliser le 2,2-phényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Le test consiste à mélanger 500 μ L de l'échantillon avec 125 μ L DPPH (0,02%) et 375 μ L éthanol absolu. Le BHA est utilisé comme étant un contrôle positif. Après incubation du mélange à l'obscurité pendant 60 min à température ambiante, l'absorbance est déterminée à 517 nm et le pouvoir antiradicalaire est estimé selon la formule suivante :

$$\text{Activité anti - radicalaire(\%)} = \frac{A_C + A_B - A_R}{A_C} \times 100$$

avec A_C est l'absorbance du tube contrôle, A_R et A_B sont les absorbances de la solution de chitosane dans le mélange réactionnel et sans addition de DPPH, respectivement.

4.3.10. 2. Activité antibactérienne

Le test de l'activité antibactérienne est réalisé selon la méthode décrite par Vanden Berghe *et Vlietinck* [155] contre trois souches bactériennes à Gram-négatives et trois à Gram-positives via la méthode des puits. Une suspension de la culture de cellules bactériennes (200 μ L) de chaque souche (estimée par absorbance à 600 nm : 10^6 UFC/mL) est étalée sur gélose LB. Par la suite, des puits d'une profondeur de 3 mm et d'un diamètre de 5 mm sont réalisés en utilisant une pipette Pasteur stérile, dans lesquels une solution de PC-E à une concentration de 5 et 10 mg/mL ainsi que les différentes solutions filmogènes y sont déposées. Le solvant ayant servi pour la dissolution de l'échantillon solide est utilisé comme témoin négatif. Les boîtes de Pétri sont maintenues pendant 2 h à 4 °C afin d'assurer la diffusion de l'échantillon, puis incubées pendant 18 h à 37 °C. L'activité antibactérienne est évaluée par mesure du diamètre des zones d'inhibition en millimètres (y compris le diamètre du puits de 5 mm) et l'évaluation de l'activité est menée en *duplicata* pour chaque souche.

4.4. Méthodes de traitement des données

4.4.1. Modélisation mathématique

Afin de traiter et de transcrire les résultats obtenus, une modélisation mathématique a été réalisée suite à l'utilisation de la méthodologie des plans d'expériences, à l'aide du logiciel MODDE 6.0 (Umetrics AB, Sweden), qui permet d'estimer les coefficients des modèles, de réaliser des tests statistiques afin de les valider, de prédire et d'interpréter les résultats obtenus, illustrés par des graphiques et des courbes.

- **Système d'équation**

Les plans utilisés admettent un modèle mathématique quadratique (de second degré) avec interactions et a pour formule : $Y_i = K_0 + K_1X_1 + K_2X_2 + K_{11}X_1^2 + K_{22}X_2^2 + K_{12}X_1X_2 + e$

Avec Y_i : la réponse (sucres totaux, lipides, etc.) ; K_0 : la constante du modèle ; K_1 et K_2 : les coefficients linéaires correspondants à chaque facteur à part ; K_{11} et K_{22} : les coefficients quadratiques correspondants à chaque facteur à part ; K_{12} : le coefficient de l'interaction des deux facteurs; et e : l'erreur [89].

- **Paramètres du modèle**

La qualité du modèle (Goodness of Fit)

La qualité du modèle mathématique est principalement jugée sur trois paramètres, à savoir [89]:

Le coefficient de corrélation (R^2) qui exprime le pourcentage de variation des réponses expliquées par le modèle. Les facteurs étudiés sont considérés comme expliquant significativement la variation de la réponse si le R^2 est supérieure à **0,7** [89] ;

La validité du modèle : qui est une comparaison entre l'erreur due au modèle et l'erreur expérimentale. Si cette mesure est supérieure à **0,25**, il n'y a pas de manque d'ajustement (ou Lack of Fit) et le modèle est considéré comme **valide** [89] ;

La reproductibilité : qui exprime la variabilité des réponses pour les mêmes conditions (erreur pure), c'est-à-dire entre les points centraux, comparée à la variation totale des réponses. Le modèle est considéré comme **reproductible** si cette valeur est supérieure à **0,5** [89]. Ces trois coefficients sont estimés par le test ANOVA à niveau de confiance de 90%, et sont illustrés dans un graphique résumant les paramètres de chaque modèle, après réajustement [89].

Réajustement du modèle

Ce réajustement du modèle est effectué si présence :

De termes sont non significatifs. Un terme est jugé non significatif si la valeur de p- value est supérieure à 0,1 (dans le présent cas d'étude), c'est-à-dire l'équivalent d'un test de Student Fisher dans un intervalle de confiance de 90% [89];

D'une magnitude de la réponse étudiée variant au-delà de 10 dans le domaine expérimental, une transformation mathématique Box-Cox est donc appliquée (Puissance, logarithmique, linéaire, etc.) [157]. Par ailleurs, si l'ajustement n'améliore pas les paramètres du modèle, le modèle est considéré **non valide**.

- **L'analyse des effets**

Pour un modèle mathématique valide, la totalité ou certains termes ont un effet sur la variation de la réponse. Cependant, cet effet varie d'un terme à un autre par :

Nature de l'effet : le logiciel MODDE 6.0 effectue une présentation graphique de l'effet de chaque facteur sur la réponse. Un terme présente une influence positive si son ordonnée sur le graphique est positive et une influence négative si son ordonnée sur le graphique est négative.

Importance de l'effet : le logiciel MODDE 6.0 permet également de définir les facteurs qui ont un effet majeur sur la variation de la réponse, et de prédire également leur influence sur la réponse indépendamment des autres facteurs. Ceci est donné par un graphique «*main effect*».

- **L'optimisation**

Le modèle mathématique peut être interprété sous forme d'un graphique qui montre des courbes isoréponses en fonction des facteurs étudiés. Ce graphique permet de prévoir la variation des surfaces de réponses dans un espace à deux ou trois dimensions.

- **Vérification du modèle**

Dans le but de vérifier la validité des résultats de l'optimisation, une expérience supplémentaire en adoptant les valeurs des facteurs permettant de maximiser les réponses ciblées dans les deux plans d'expérience adoptés, a été réalisée.

4.2. Analyse statistique

4.4.2.1. Analyse par composante principale

L'analyse par composantes principales (ACP) a été utilisée pour permettre le retour à un espace d'informations de dimension réduite en déformant le moins possible l'information originale et en s'assurant de donner le résumé le plus pertinent de la dispersion des données initiales, appelée «composante principale» [157]. Ces composantes principales sont caractérisées par des scores et des charges avec lesquels les données peuvent être classées et l'importance des variables de chaque composante en fonction de toutes les variables initiales peut être étudiée. L'analyse ACP a été réalisée en utilisant SPSS 19.0.

4.4.2.2. Analyse de la variance (ANOVA)

Toutes les données ont été exprimées en tant que moyennes \pm SD (écart-type). Une analyse de variance (ANOVA) est ensuite appliquée pour estimer l'importance de la variation à niveau de confiance de 95%.L'ANOVA a été réalisée en utilisant SPSS ver. 19.0 (SPSS Inc., Chicago, États-Unis). Les différences significatives sont indiqués par des lettres sur la même ligne ou colonne (a, b, c, d, e, f..) dans les tableaux ou par des étoiles (*, **, ***, ****) dans les histogrammes.

CHAPITRE 5: RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. Optimisation de la culture de la souche Saharienne *Arthrospira* sp. et son forçage métabolique

Introduction

Depuis quelques décennies, le genre *Arthrospira* ou spiruline connaît un regain d'intérêt par la communauté scientifique vu sa valeur nutritive importante. Plusieurs travaux portant sur la culture des espèces *Arthrospira platensis* (Tchad) et *Arthrospira maxima* (Mexique) et sur la valorisation de leurs métabolites ont été effectués. L'Algérie renferme une grande biodiversité faunistique et floristique grâce à la diversité de son écosystème, y compris une souche d'*Arthrospira*, caractéristique des zones désertiques. Cependant, à notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées au volet biotechnologique de la culture de cette souche autochtone.

C'est dans cette optique que s'inscrit ce présent chapitre, dont l'objectif est d'isoler la souche d'*Arthrospira* depuis son biotope naturel le Sahara Algérien, optimiser sa culture dans différentes conditions suivant deux modes de culture, et d'induire l'accumulation de ses métabolites intracellulaires afin d'obtenir plusieurs types de biomasse.

5.1.1. Culture d'*Arthrospira* sp. en batch autotrophie

Après avoir examiné l'ensemble des échantillons d'eau prélevés de «la Guelta du Palmier», les filaments d'*Arthrospira* sp. ont été isolés, purifiés avec succès puis mis en culture.

5.1.1.1. Examen microscopique et identification

Les résultats de l'observation microscopique de la souche *Arthrospira* sp. après isolement et purification sont présentés sur la **figure 5.11**. Les caractéristiques de cette souche sont résumées dans le **tableau 5.9**.

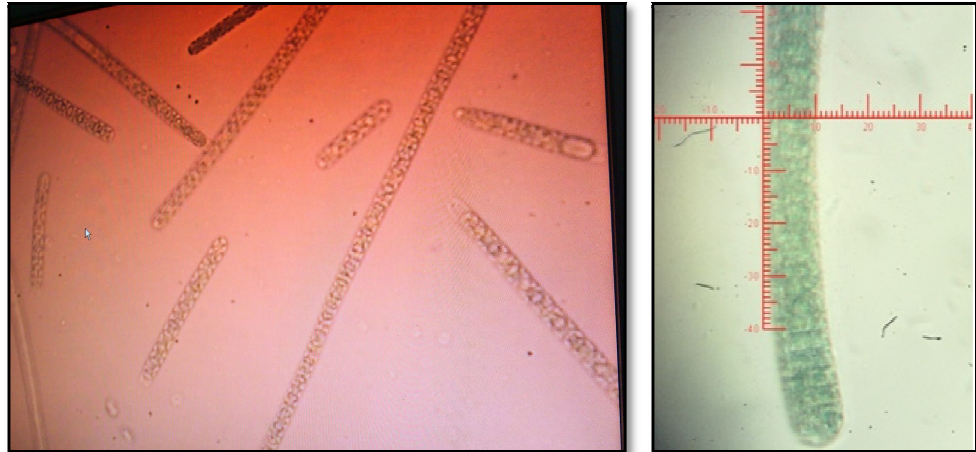


Figure 5.11: Observation microscopique de la souche *Arthrospira* sp. isolée depuis la Guelta du Palmier Tamanrasset (Algérie) (Gx100) (Photographie originale).

Tenant compte des résultats indiqués dans le tableau 5.9, la souche isolée est caractérisée par des filaments droits, il s'agit donc de la souche M1 rapportée auparavant par Fox et Fox [5]. Le reste des caractères morphologiques identifiés se rapprochent de ceux rapportés par de nombreux travaux portant sur l'étude morphologique du genre *Arthrospira*, [158, 21, 5, 22], confirmant ainsi l'appartenance des filaments isolés au genre *Arthrospira*. Cependant, il est à noter que cette souche possède un diamètre cellulaire de 10 μm et une longueur de 90-110 μm . Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés pour *Arthrospira maxima* avec un diamètre de 7 à 9 μm et une longueur de 70 à 90 μm [5]. Ces caractéristiques pourraient être dues aux facteurs génétiques de la souche elle-même ou encore à des facteurs épigénétiques amenant la cellule à une adaptation phénotypique due à son habitat naturel qualifié d'extrême (Désert du Sahara).

Tableau 5.9: Caractères morphologiques d'*Arthrospira* sp. isolée depuis la Guelta du Palmier Tamanrasset (Algérie)

| Souche | Caractère morphologique |
|------------------------|---|
| <i>Arthrospira</i> sp. | <p>Trichome: en spires très ouvertes (droit) ;</p> <p>Couleur : vert ;</p> <p>Diamètre : 10 μm ;</p> <p>Longueur : 90 à 110 μm ;</p> <p>Parois : visible et granulée ;</p> <p>Gaine : absente ;</p> <p>Akinètes : absents ;</p> <p>Hétérocystes : absents ;</p> <p>Vacuoles : fortement présentes.</p> |

5.1.1.2. Culture d'*Arthrospira* sp.

Le **tableau 5.10** regroupe les valeurs de la vitesse de croissance (μ_{max}) d'*Arthrospira* sp. cultivée dans le milieu Zarrouk sous différentes conditions de température et d'intensité de lumière. Les résultats indiquent que la vitesse spécifique de croissance peut atteindre une valeur de $0,435 \pm 0,002 \text{ j}^{-1}$ sous une température de 30°C combinée à une intensité de lumière de $80 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, alors qu'elle est minimale ($0,16 \pm 0,003 \text{ j}^{-1}$) quand l'intensité de lumière est de $20 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, à la même température. De plus, quand la température est au-delà de 30°C et ce quel que soit l'intensité de lumière utilisée, il se produit une chute significative de la vitesse de croissance d'*Arthrospira* sp. Ainsi, l'intensité de lumière a un effet significatif positif sur la vitesse spécifique de croissance ($p < 0,05$) alors que la température exerce un effet significatif négatif plus important ($p < 0,05$). L'intensité de lumière a toujours été considérée comme un facteur déterminant pour la photosynthèse chez l'ensemble des organismes autotrophes. Cependant, la température demeure le facteur fondamental affectant toutes les activités métaboliques pour tout organisme confondu, passant par l'activité photosynthétique elle-même [159]. Cette dernière se trouve conditionnée par la température puisque toutes les activités enzymatiques impliquées dans la chaîne de transfert d'électrons lors de la photosynthèse sont étroitement liées aux conditions thermiques de l'environnement. En effet, il a été établi que la température optimale est le point où toutes les réactions biochimiques, en relation avec le transfert d'électrons pour la photosynthèse, sont bien équilibrées [160].

Tableau 10: Valeurs de la vitesse spécifique de croissance (μ_{max} , j^{-1}) sous différentes combinaisons de température ($^\circ\text{C}$) et d'intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$)

| Température ($^\circ\text{C}$) | Intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) | Vitesse spécifique de croissance (μ_{max} , j^{-1}) |
|----------------------------------|--|---|
| 30 | 20 | $0,167 \pm 0,002^a$ |
| 30 | 40 | $0,239 \pm 0,001^b$ |
| 30 | 80 | $0,435 \pm 0,002^c$ |
| 35 | 20 | $0,184 \pm 0,003^d$ |
| 35 | 40 | $0,381 \pm 0,005^e$ |
| 35 | 80 | $0,369 \pm 0,001^f$ |
| 40 | 20 | $0,235 \pm 0,007^b$ |
| 40 | 40 | $0,242 \pm 0,002^b$ |
| 40 | 80 | $0,228 \pm 0,005^b$ |

Les différentes lettres indiquent une différence significative

Dans ses travaux, Richmond [159] a souligné que pour un bon nombre de microalgues, l'activité photosynthétique varie avec la température selon une courbe parabolique qui montre un optimum thermique à 31 °C, et que toute déviation (même de quelques degrés) de cet optimum pouvait entraîner un effet inhibiteur de la photosynthèse, où de la croissance.

Les résultats obtenus dans le présent travail sont en accord avec cette tendance, puisque une température supérieure à 30 °C induit une baisse de la vitesse de croissance chez la souche *Arthrospira* sp. plusieurs études ont présenté différentes valeurs de μ_{max} pour le genre *Arthrospira*, à savoir la valeur $\mu_{max} = 0,41 \text{ j}^{-1}$ enregistrée par Trabelsi *et al.* [13] chez *Arthrospira platensis*, obtenue à une température de 20 °C et à une intensité de lumière de 150 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. Par conséquent, une confrontation directe de nos résultats avec ceux de la bibliographie reste difficile, puisque différentes souches ont été utilisées, pouvant ainsi être différentes génétiquement aussi bien par leurs optima de croissance que par leur sensibilité vis-à-vis des valeurs extrêmes de température et de luminosité.

En effet, bien que le genre *Arthrospira* soit considéré comme étant thermophile avec un optimum de température entre 35 et 38 °C [51], l'optimum de température atteint dans notre étude n'est que de 30 °C et toute augmentation de cette valeur provoque la diminution de la vitesse spécifique de croissance (μ_{max}).

- **Cinétique de croissance d'*Arthrospira* sp.**

La cinétique de croissance de la souche saharienne d'*Arthrospira* sp. cultivée dans les conditions maximisant la vitesse spécifique de croissance (milieu Zarrouk, 30°C, 80

$\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) est présentée sur la **figure 5.12**. Cette courbe de croissance est établie *via* le suivi de l'évolution de la concentration de biomasse (g/L) d'une culture en batch en fonction des jours de culture.

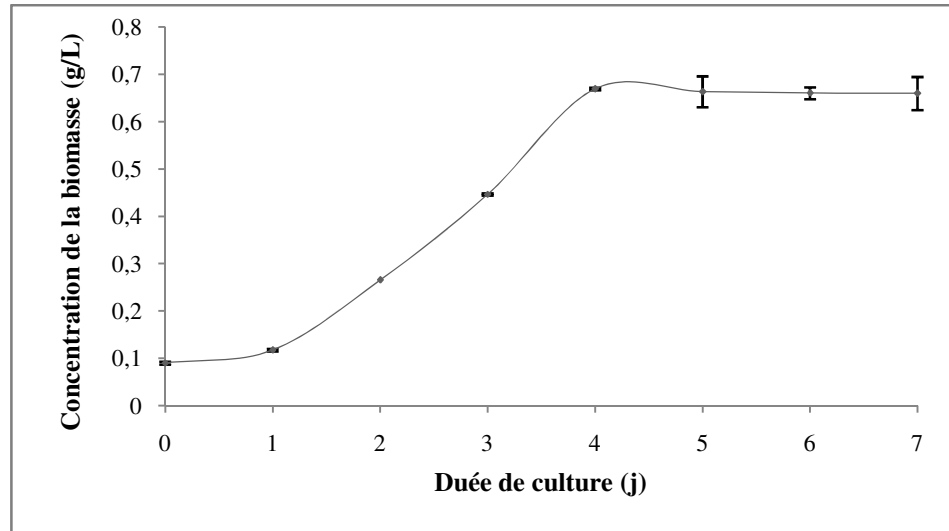


Figure 5.12 : Cinétique de croissance d'*Arthrospira* sp. cultivée dans le milieu Zarrouk à 30 °C et 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$

Sous ces conditions de culture (température, intensité de lumière et jour de culture), la souche *Arthrospira* sp. présente les quatre phases de croissance classique chez les cyanobactéries observées lors de la mise en culture. La **figure 5.12** montre typiquement la présence, dans un premier temps, d'une phase de latence relativement courte (1 jour) où la concentration en biomasse n'a pas varié de manière significative ($0,117 \pm 0,0044$ g/L) par rapport au jour 0 (biomasse d'ensemencement $0,080 \pm 0,0047$ g/L). Une courte phase d'accélération a également été observée entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour de culture. Entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour de culture, la phase exponentielle est clairement distinguée, où la concentration de la biomasse augmente de $0,28 \pm 0,003$ g/L à $0,67 \pm 0,0043$ g/L. Au bout du 5^{ème} jour de croissance, une stabilisation de la concentration de biomasse ($0,663 \pm 0,032$ g/L) indique que la souche *Arthrospirasp.* est entrée en phase stationnaire, demeurant sur cet état durant le reste des jours de culture (6, 7 et 8^{ème} jours avec des valeurs respectives de biomasses de $0,66 \pm 0,001$; $0,659 \pm 0,025$ et $0,657 \pm 0,021$ g/L).

Cette même tendance de croissance a été observée dans l'étude de Doumandji *et al.* [162] sur la même souche saharienne, où les trois principales phases décrites ont été observées distinctement, à l'exception d'un décalage notable dans les différentes phases de croissance. En effet, Doumandji *et al.* [161] ont rapporté une phase exponentielle entre le 7^{ème} et le 8^{ème} jour de culture de cette même souche, avec une concentration de biomasse n'excédant pas les 0,5 g/L.

Ceci pourrait s'expliquer par l'adaptation rapide et efficace de notre souche saharienne d'*Arthrospira* sp. à la composition du milieu Zarrouk [57] sur lequel elle a été cultivée, en présence de ces conditions optimales de température (30 °C) et d'intensité de lumière (80 μ mol photons/m²/s).

• Caractérisation biochimique de la biomasse d'*Arthrospira* sp.

Les résultats de la composition nutritionnelle d'*Arthrospira* sp. cultivée sous les conditions optimales de croissance et récoltée à la fin de la phase exponentielle (5^{ème} jour de culture) sont indiqués dans le **tableau 5.11**.

Les résultats obtenus indiquent que les composants les plus prédominants sont les protéines avec un taux de 58,15±5,24% (par rapport à la biomasse sèche), suivies par les cendres avec 20,4±3,45%, puis les lipides et les sucres avec 8,2±0,6% et 7,2±0,45% (par rapport à la biomasse sèche), respectivement, et finalement la phycocyanine, avec une teneur estimée de 5,02±1,35% (par rapport à la biomasse sèche).

Plusieurs travaux ont admis que le taux de protéines chez la spiruline (*Arthrospira platensis*) varie entre 55 et 70% [5]. Le taux de protéines obtenu dans le présent travail (58,15± 5,24% biomasse sèche) montre que la souche étudiée constitue une bonne source de protéines, avec une valeur 1,53 fois supérieure que celle notée avec les meilleures sources de protéines végétales notamment le soja (38% protéines).

Tableau 5.11 : Profil nutritionnel d'*Arthrospira* sp. récoltée à la fin de la phase exponentielle

| | Composition (%) |
|-----------------------------|-----------------|
| Matière sèches | 92,28±1,65 |
| Cendre | 20,4±3,45 |
| Lipides * | 8,2±0,60 |
| Sucres totaux | 7,22±0,45 |
| Protéines solubles** | 58,15±5,2 |
| Phycocyanine | 5,02±1,3 |

*Les lipides ont été déterminés selon la méthode de Folch *et al.* (1957) ;

** Les protéines ont été déterminées selon la méthode de Bradford (1976). Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche.

Les phycobiliprotéines constituent une fraction importante des protéines de la spiruline, dont le composé majeur est la phycocyanine pouvant aller jusqu'à 15 à 20% de son poids sec [162]. La teneur en phycocyanine obtenue pour la souche saharienne d'*Arthrospira* sp. est inférieure par rapport à celles rapportées précédemment. D'après la littérature, le taux en phycocyanine est sensiblement affecté par les conditions de culture particulièrement l'intensité de lumière. Plusieurs études ont, en effet, démontré que sous des conditions d'intensité de lumière forte, le taux de phycocyanine chute de manière significative [69]. L'environnement extrême à partir duquel cette souche a été isolée (Désert du Sahara), se caractérisant par une forte irradiation solaire [163], pourrait être à l'origine de ces faibles taux en phycocyanine.

Le taux de lipides obtenu ($8,2 \pm 0,6\%$ biomasse sèche) est compris dans l'intervalle enregistré dans plusieurs travaux allant de 5,6 à 11% [164]. Il a été bien établi que les cyanobactéries en général, et la spiruline en particulier, ne sont pas riches en lipides comparativement à d'autres microalgues tels que *Dunaliella tertiolecta* (71,4%) [165] et *Chlorella protothecoides* (15-55%) [166]. Cependant, d'un point de vue technologique, la faible teneur en lipides chez le genre *Arthrospira* lui confère une stabilité lors de sa conservation, évitant ainsi l'oxydation et le rancissement de sa biomasse conditionnée [161].

Le taux de sucres totaux enregistré dans ce travail, $7,2 \pm 0,45\%$ (par rapport à la biomasse sèche), est inférieur aux taux rapportés par plusieurs travaux, variant en moyenne entre 10 et 25% [2, 167].

Idem pour la vitesse spécifique de croissance, plusieurs études ont présenté différents profils nutritionnels chez le genre *Arthrospira*. De ce fait, il n'existerait pas une composition exhaustive pouvant attester de sa qualité ou de ses performances nutritionnelles. Plusieurs auteurs ont, en fait, démontré et expliqué que les conditions environnementales de culture mais également le choix de la souche et l'espèce d'*Arthrospira* elles-mêmes (ou autre cyanobactéries et microalgues), aussi bien que les phases de culture, ont un effet significatif sur la variation dans profil nutritionnel [2].

5.1.1.3. Effet de l'intensité de lumière sur le taux de phycocyanine d'*Arthrospira* sp.

Etant donné le taux inférieur en phycocyanine chez la souche saharienne *Arthrospira* sp., lorsqu'elle est cultivée à une intensité de lumière égale à 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, il s'est avéré intéressant d'étudier l'influence de l'intensité de la lumière sur le taux de phycocyanine, afin de confirmer l'induction des phycobiliprotéines sous une variation de l'intensité de lumière.

La **figure 5.13** résume les résultats des teneurs en phycocyanine chez *Arthrospira* sp. en fonction de différentes intensités de lumière allant de 10 à 80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. Les résultats montrent que le taux de phycocyanine varie significativement de $5,45 \pm 0,58\%$ à $9,10 \pm 0,07\%$ par rapport à la biomasse sèche quand l'intensité de lumière diminue de 60 à 10 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ pour être quasi-stable à une intensité de 80 $\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ avec un taux de $5,02 \pm 1,35\%$ biomasse sèche ($p < 0,05$). Il est donc clair que l'intensité de lumière a un effet négatif et significatif sur le taux de phycocyanine. En revanche, la concentration de biomasse diminue significativement de $0,67 \pm 0,03 \text{g/L}$ à $0,285 \pm 0,04 \text{g/L}$ avec la diminution de la lumière de 80 à 10 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$.

La phycocyanine, et les phycobiliprotéines en général, sont des pigments secondaires et accessoires de la photosynthèse, leur taux chute lorsque les intensités de lumière sont très importantes, servant ainsi, à prévenir l'excès d'absorption de lumière et jouant un rôle photo-protecteur [168].

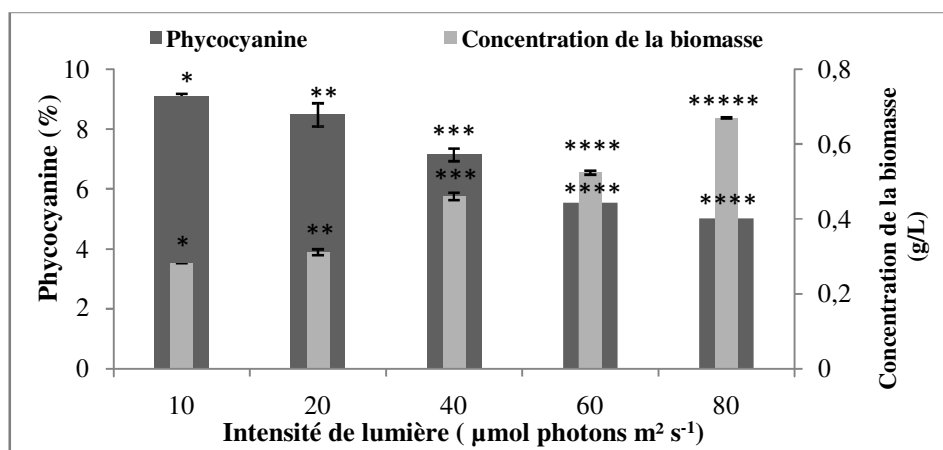


Figure 5.12 : Teneur en phycocyanine (%) et concentration de la biomasse (g/L) chez *Arthrospira* sp. en fonction de différentes intensités de lumière

Les résultats obtenus corroborent avec ceux obtenus par Olievra *et al.* [169] portant sur une autre cyanobactérie *Nostoc* sp. affirmant ainsi que le taux de la phycocyanine est à son maximum quand l'intensité de la lumière est faible ($10\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$). De même, Pojidaeva *et al.* [170] rapportent, dans leur étude menée sur *Synechocystis* sp., qu'à fortes intensités de lumière, les phycobiliprotéines diminuent, dû à la diminution de leur synthèse et l'augmentation de leur dégradation par les protéases. En effet, selon Wyam *et* Fay [171], sous de faibles intensités de lumière, la production des phycobiliprotéines est attribuée à leur capacité à étendre la totalité de la bande d'absorption de la lumière de façon à maintenir l'équilibre de distribution entre les photosystèmes PSI et PSII.

De ce fait, il s'est avéré possible de confirmer l'hypothèse émise sur le fait que les fortes intensités de lumière affaiblissent les mécanismes de production de phycocyanine. En baissant l'intensité de la lumière à $10\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, une amélioration de presque 2 fois du taux de phycocyanine accompagné, cependant, d'une restriction de la productivité en biomasse, sont obtenues.

Conclusion

Arthrospira sp. isolée depuis le Sahara Algérien, a montré une grande flexibilité métabolique significative, lui permettant une amélioration de son taux de phycocyanine quand les conditions de lumières sont réduites. L'influence significative de la lumière sur le taux de phycocyanine confirme ainsi que les lumières nécessaires à la croissance d'*Arthrospira* sp. ne sont pas forcément celles qui stimulent la synthèse de la phycocyanine, et permet d'envisager l'élargissement de l'étude vers d'autres intervalles d'intensités de lumière mais également vers d'autres facteurs environnementaux, afin d'avoir une meilleure amélioration dynamique du taux de phycocyanine.

5.1.2. Induction des métabolites intracellulaires et extracellulaires chez *Arthrospira* sp., selon un procédé de culture en deux phases

Il est bien établi par la littérature, que durant la phase de croissance, les cellules microalgales orientent leur potentiel biotique et leur flux de carbone vers la croissance et la reproduction, par conséquent, la synthèse de protéines a lieu. En revanche, durant la phase stationnaire de croissance ou sous des conditions de stress (épuisement du milieu de culture), le flux de carbone est dévié de la synthèse des protéines (croissance) vers l'accumulation de métabolites secondaires (de défense) notamment les carbohydrates, les lipides ou les pigments, etc., afin que les cellules assurent leur survie [2,3].

Ainsi, les deux métabolismes primaire (croissance et synthèse de protéines) et secondaire (métabolites de défense) s'opposent selon les phases de culture ou selon les conditions de culture. En outre, la synthèse des métabolites de défense est généralement associée à une baisse de productivité de la biomasse [172]. Cette tendance a été précédemment démontrée dans le présent travail de recherche, où les conditions de synthèse de la phycocyanine par la souche saharienne *Arthrospira* sp. ont été mise en évidence s'opposant à celles qui favorisent la croissance.

Dans le but de palier à cette restriction de productivité lors de l'induction d'un métabolite donné, dans la seconde partie de ce chapitre, une culture en deux phases «*Two-phase culture strategy*» est adoptée, où dans une première phase la production de la biomasse est menée dans les conditions optimales de croissance prédéfinies pour *Arthrospira* sp. suivie par une seconde phase dite d'induction de métabolites, par exposition des cultures concentrées d'*Arthrospira* sp. à différentes combinaisons de stress multifactoriels.

Par ailleurs, ce chapitre se concentre sur une tentative de modulation, en plus des phycobiliprotéines, de la composition intracellulaire, en termes de sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, ainsi que substances polymériques extracellulaire (EPS).

5.1.2.1. Phase I : Caractéristiques des précultures et de la biomasse d'*Arthrospira* sp. dans les conditions optimales de croissance

Les résultats du suivi de la croissance d'*Arthrospira* sp. cultivée en batch autotrophie dans les conditions optimales de croissance (80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 30 °C), à plus grande échelle (10 L) sur une période de 10 jours (**Annexe 2**), ont indiqué une vitesse spécifique de croissance maximale μ_{max} de $0,46 \pm 0,003 \text{ j}^{-1}$ permettant d'atteindre une concentration de biomasse maximale de $0,66 \pm 0,03 \text{ g/L}$ au bout du 5^{ème} jour de croissance (phase de croissance exponentielle). Ce comportement de croissance est ainsi similaire à celui enregistré pour la culture à petite échelle (1,5 L) présentée ci-dessus.

À la fin de la phase exponentielle de croissance (jour 5), la composition intracellulaire d'*Arthrospira* sp. en protéines totales, sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, et phycobiliprotéines est de $68,34 \pm 1,15\%$, $7,50 \pm 0,04\%$, $9,00 \pm 0,06\%$, $0,1 \pm 0,019\%$, $5,50 \pm 0,09\%$, respectivement. Par ailleurs, la production d'EPS dans ces conditions est de $0,619 \pm 0,0087 \text{ g}$ par gde biomasse sèche (**Tableau 5.12**).

Ces résultats de composition biochimique sont similaires à ceux obtenues lors de la culture à petite échelle (1,5 L) et relativement comparables à celle rapportée pour *Arthrospira* sp. cultivée dans le milieu Zarrouk dans des conditions contrôlées [37].

5.1.2.2. Phase II : Induction des métabolites intracellulaire et des EPS sous des conditions de stress

Les biomasses ainsi que les filtrats de culture d'*Arthrospira* sp. obtenus à partir des cultures expérimentales concentrées conduites sous un stress multifactoriel de 3 jours ont été caractérisés.

Les résultats de la composition intracellulaire d'*Arthrospira* sp. en termes de protéines totales, sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et production d'EPS en fonction des différentes combinaisons expérimentales de facteurs, sont présentés dans le **tableau 5.12**. Les résultats révèlent une grande variation dans les réponses expérimentales.

En fait, la teneur en protéines varie entre 36,39% et 63,88% de biomasse sèche, ce qui demeure inférieure à la teneur en protéines enregistrée dans les conditions optimales de

croissance (Phase I) avec $68,34 \pm 1,15\%$ de biomasse sèche. Ainsi, dans la phase II du procédé de culture utilisé, la croissance des cellules d'*Arthrospira* sp. est inhibée suite à leur concentration, et l'application à la fois d'un stress a permis que le flux de carbone soit dévié de la synthèse des protéines (corrélée à la croissance) vers l'accumulation des autres métabolites [173]. À partir de ces résultats, l'état de stress dans lequel se trouvent les cultures d'*Arthrospira* sp. est confirmé.

Par ailleurs, les teneurs en sucres totaux et en lipides, en fonction des différentes combinaisons de facteurs, varient respectivement de 7,50 à 31,62% et de 5,43 à 15,33% par rapport à la biomasse sèche. La teneur en phycobiliprotéines et en caroténoïdes totaux varie de 2,96 à 13,34% et de 0,29 à 0,85% (par rapport à la biomasse sèche), respectivement, alors que la production d'EPS varie de 0,092 à 0,97 g/g biomasse sèche.

Tableau 5.12 : Valeurs expérimentales des réponses expérimentales en fonction des différentes combinaisons d'intensité de lumière ($\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) et de concentrations en NaCl, NaNO_3 et K_2HPO_4 (g/L) au cours de la phase I et la phase II du procédé de culture

| | Lumpier | NaCl | NaNO_3 | K_2HPO_4 | Prot.* | Sucres | Lipides** | Carot.T | Phyco. | EPS |
|-----------------|-----------|-------------|-----------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| Phase I | 80 | 1 | 2.5 | 0.5 | 68.34±1.15 | 7.50±0.04 | 9.0±0.06 | 0.1±0.019 | 5.50±0.09 | 0.619±0.0087 |
| Phase II | | | | | | | | | | |
| Essais 1 | | | | | | | | | | |
| | 10 | 1 | 0.5 | 0.5 | 51.68 | 16.10 | 12.00 | 0.41 | 7.51 | 0.152 |
| 2 | 120 | 1 | 0.5 | 0.5 | 36.39 | 25.98 | 15.33 | 0.7 | 4.46 | 0.092 |
| 3 | 10 | 40 | 0.5 | 0.5 | 56.43 | 13.76 | 11.29 | 0.3 | 8.77 | 0.319 |
| 4 | 120 | 40 | 0.5 | 0.5 | 40.93 | 31.62 | 13.75 | 0.39 | 3.38 | 0.282 |
| 5 | 10 | 1 | 4.5 | 0.5 | 63.60 | 12.27 | 6.88 | 0.37 | 10.84 | 0.454 |
| 6 | 120 | 1 | 4.5 | 0.5 | 43.52 | 21.86 | 13.00 | 0.43 | 4.82 | 0.387 |
| 7 | 10 | 40 | 4.5 | 0.5 | 62.81 | 10.52 | 6.67 | 0.36 | 8.52 | 0.382 |
| 8 | 120 | 40 | 4.5 | 0.5 | 57.10 | 16.12 | 5.45 | 0.41 | 3.90 | 0.316 |
| 9 | 10 | 1 | 0.5 | 4.5 | 59.59 | 13.44 | 6.97 | 0.4 | 13.34 | 0.157 |
| 10 | 120 | 1 | 0.5 | 4.5 | 47.36 | 22.77 | 8.67 | 0.29 | 5.19 | 0.163 |
| 11 | 10 | 40 | 0.5 | 4.5 | 59.46 | 9.74 | 10.31 | 0.36 | 6.18 | 0.703 |
| 12 | 120 | 40 | 0.5 | 4.5 | 57.05 | 12.67 | 9.33 | 0.45 | 3.84 | 0.965 |
| 13 | 10 | 1 | 4.5 | 4.5 | 63.88 | 7.50 | 6.18 | 0.42 | 10.38 | 0.461 |
| 14 | 120 | 1 | 4.5 | 4.5 | 51.05 | 12.53 | 5.63 | 0.75 | 4.34 | 0.288 |
| 15 | 10 | 40 | 4.5 | 4.5 | 52.00 | 10.33 | 7.67 | 0.76 | 2.96 | 0.414 |
| 16 | 120 | 40 | 4.5 | 4.5 | 56.40 | 11.59 | 12.00 | 0.85 | 5.42 | 0.345 |
| 17 | 10 | 20.5 | 2.5 | 2.5 | 56.77 | 9.17 | 13.33 | 0.35 | 10.47 | 0.313 |
| 18 | 120 | 20.5 | 2.5 | 2.5 | 60.15 | 8.45 | 9.67 | 0.62 | 5.14 | 0.326 |
| 19 | 65 | 1 | 2.5 | 2.5 | 62.56 | 13.93 | 15.00 | 0.61 | 5.41 | 0.380 |
| 20 | 65 | 40 | 2.5 | 2.5 | 50.16 | 15.99 | 14.41 | 0.6 | 3.12 | 0.276 |
| 21 | 65 | 20.5 | 0.5 | 2.5 | 59.39 | 10.33 | 11.47 | 0.45 | 11.62 | 0.388 |
| 22 | 65 | 20.5 | 4.5 | 2.5 | 57.66 | 11.15 | 9.39 | 0.48 | 8.12 | 0.970 |
| 23 | 65 | 20.5 | 2.5 | 0.5 | 58.24 | 12.60 | 8.00 | 0.48 | 4.63 | 0.465 |
| 24 | 65 | 20.5 | 2.5 | 4.5 | 58.99 | 10.70 | 8.00 | 0.36 | 4.89 | 0.389 |
| 25 | 65 | 20.5 | 2.5 | 2.5 | 55.92 | 12.81 | 8.44 | 0.48 | 6.14 | 0.310 |
| 26 | 65 | 20.5 | 2.5 | 2.5 | 56.71 | 10.65 | 10.67 | 0.49 | 5.64 | 0.336 |
| 27 | 66 | 20.6 | 2.5 | 2.5 | 57.25 | 11.73 | 9.55 | 0.48 | 5.89 | 0.304 |

Carot.T : Caroténoïdes totaux ; **Phyco.** : Phycobilliprotéines ; **Protéines*** déterminées par la méthode Kjeldahl ; **Lipides**** déterminés par la méthode Razenka (2003).

5.2.2.3. L'analyse par composantes principales (ACP) des métabolites intracellulaires et des EPS

Afin de schématiser la variation avérée dans la composition intracellulaire et extracellulaire d'*Arthrospira* sp. en fonction des différentes combinaisons d'intensité de lumière et concentration en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄, une analyse ACP est appliquée. Les réponses expérimentales : lipides, sucres totaux, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et EPS sont alors considérées comme variables, dont les valeurs sont représentées par la combinaison des quatre facteurs expérimentaux donnés par la matrice expérimentale indiquée dans le **tableau 5.12**.

La **figure 5.13** retrace le graphique généré après l'analyse ACP, où trois composantes principales sont obtenues. Leur charge globale représente 80,71% de la variance totale expliquée pour les axes PC1*PC2 et PC1*PC3. Le premier axe PC1 représente 32,46% de la variance, regroupant les sucres totaux et les lipides sur son côté positif. Le deuxième axe PC2 représente à son tour 27,50% de la variance et oppose les caroténoïdes totaux sur son côté positif et les phycobiliprotéines sur son côté négatif. Le troisième axe PC3 (20,75%) regroupe, quant à lui, positivement les EPS.

Les scores de facteurs combinés projetés sur le plan PC1*PC2 (**Figure 5.13a**) montrent trois groupes caractérisés par le même niveau d'intensité de lumière, qui, cependant, diffèrent par leurs niveaux des autres facteurs étudiés. Le premier axe PC1, représenté par les expériences (R2, R4, R6 et R10), regroupe les sucres totaux et les lipides sur son côté positif, suggérant ainsi que les combinaisons de facteurs avec les fortes intensités de lumière (120

μmol photons/m²/s) sont corrélées avec les teneurs élevées en sucres totaux et en lipides, particulièrement lorsque les concentrations en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄ varient entre 1 à 40 g/L et entre 0,5 à 4,5 g/L, respectivement.

Le second axe PC2, représenté par les expériences (R14, R15, R16 et R18), regroupe les caroténoïdes totaux (côté positif) et les phycobiliprotéines (côté négatif) (**Figure 5.13a**). Les combinaisons de facteurs avec des intensités de lumière élevées (120 μmol photons/m²/s) ont été regroupées et corrélées avec des teneurs élevées en caroténoïdes totaux, en particulier lorsque les concentrations en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄ varient entre 1 à 40 g/L et entre 2,5 à 4,5 g/L, respectivement. Contrairement aux caroténoïdes totaux, les faibles intensités de lumière (10 μmol photons/m²/s) ont été corrélées avec les teneurs élevées en phycobiliprotéines (**Figure 5.13a**).

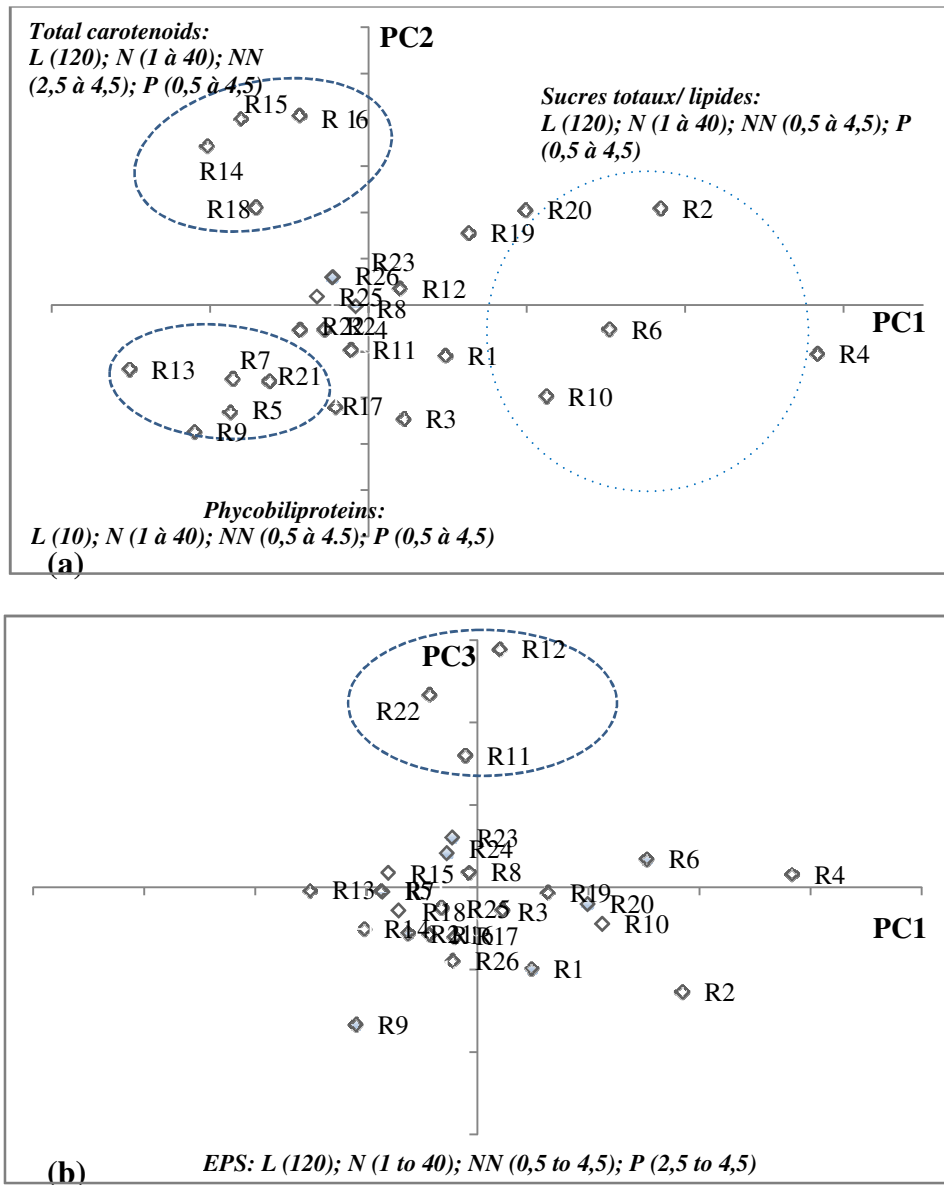


Figure 5.13: Composantes principales de la composition intracellulaire et extracellulaire d'*Arthrospira* sp., exposées à différentes combinaisons d'intensités de lumière et de concentrations. Coefficients et scores pour PC1*PC2 (a) et PC1*PC3(b).

L'effet de l'intensité de la lumière sur les teneurs en métabolites intracellulaires ou extracellulaires des microalgues en général est régulé par le procédé photo-acclimatation, où des changements dynamiques dans les voies métaboliques sont produits, pour augmenter la survie des cellules [2]. L'augmentation des sucres totaux sous l'effet des fortes intensités de lumière est considérée comme un moyen pour contrôler les réserves de carbone et le stockage de l'énergie pour ajuster leur croissance dans des conditions environnementales qui se trouvent en fluctuation [174].

En accord avec les résultats obtenus dans le présent travail de recherche, De Philippis *et al.* [9] ont signalé une augmentation des sucres totaux de 7 à 34% chez *Arthrospira maxima* après son exposition à une forte intensité de lumière.

De même, l'induction de l'accumulation des caroténoïdes totaux traduit une stratégie de prévention de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse [175, 176]. L'accumulation de caroténoïdes, sous de fortes intensités de lumière a été enregistrée aussi bien chez les cyanobactéries [177], que chez des espèces de microalgues vertes telles que *Dunaliella salina* [178] ou encore *Chlorella zofingiensis* [179].

À l'inverse, sous de faibles intensités de lumière, l'induction de la synthèse des phycobiliprotéines permet une meilleure absorption de l'énergie lumineuse, en raison de leur faible maintien des taux d'énergie spécifiques [180] et leur capacité à étendre la totalité de la bande d'absorption de la lumière de façon à maintenir l'équilibre de distribution entre les deux photosystèmes PSI et PSII [172]. Cette tendance a été également observée chez plusieurs souches de cyanobactéries telles qu'*Arthrospira platensis* [67], *Nostoc* sp. [181] et chez *Osillatoria agardhii* [182].

D'un autre côté, les scores des différentes combinaisons de facteurs tracés le long du plan PC1*PC3 (**Figure 5.13b**) montrent un groupe d'expériences (R3, R11, R12, R22) en corrélation avec le côté positif de l'axe PC3 et associées à une production élevée d'EPS. Cependant, aucun niveau typique ou spécifique d'intensité lumineuse n'a été observé. De nombreuses études ont décrit que l'induction de la production d'EPS est obtenue à des intensités de lumière élevées [92,95], tandis que Trabelsi *et al.* [13] ont précisé que l'intensité de lumière n'est pas le facteur déterminant pour la maximisation de la production d'EPS.

Par ailleurs, cette tendance n'est pas exhaustive dans la mesure où plusieurs travaux investiguant l'effet de l'intensité lumineuse sur la synthèse de métabolites secondaires montrent des tendances différentes. En effet, Markou *et al.* [8] ont indiqué que l'intensité de la lumière n'a pas affecté la teneur en sucres totaux chez *Spirulina platensis*, en raison d'un effet d'ombrage plus élevé des cellules lorsque la concentration cellulaire augmente. De plus, Guedes *et al.* [183] ont rapporté qu'une augmentation de l'intensité de lumière supportait

l'hypothèse d'un besoin d'une forte activité chloroplasmique déclenchant ainsi la réduction de la teneur en lipides.

Chriomadha *et* Borowitzka [184] quant à eux ont conclu que la corrélation entre l'intensité de la lumière et la teneur en lipides est habituellement spécifique à l'espèce. De manière consolidatrice, dans le présent travail, certaines expériences n'ont pas révélé une corrélation entre l'intensité lumineuse et les réponses étudiées, mettant en évidence l'éventuel effet d'interaction avec les autres facteurs étudiés.

5.1.2.4. Plan d'expérience

•Paramètre des modèles

Pour une étude plus approfondie des éventuels effets combinés des facteurs étudiés sur la composition intracellulaire de la biomasse et la production d'EPS, une modélisation mathématique est réalisée à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM) sur chaque réponse (sucre totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et EPS) suite à l'application d'un plan central complet.

Le **tableau 5.13** présente les paramètres statistiques de chaque modèle obtenu. Pour le modèle des lipides et des caroténoïdes totaux, un coefficient de détermination satisfaisant a été obtenu ($R^2 > 0,7$) avec absence de manque d'ajustement (*Lack of fit*, $p > 0,1$) donnant des modèles valides ($> 0,25$) et reproductibles ($> 0,5$). Ces modèles correspondent donc exactement aux données expérimentales. En revanche, pour les modèles relatifs aux sucres totaux, aux phycobiliprotéines et aux EPS, l'analyse mathématique de Box-Cox a suggéré des transformations mathématiques de type Puissance ($E^{-0,5}$ et $E^{0,25}$) et logarithmiques (Log) pour les sucres totaux/EPS et phycobiliprotéines, respectivement, afin de réajuster les modèles. Ainsi, après la transformation mathématique, les modèles sont reproductibles ($> 0,5$), valides dont la valeur de R^2 est satisfaisante ($R^2 > 0,7$), et ne présentent aucun manque d'ajustement ($p > 0,1$). Les graphiques résumant leurs paramètres générés par le MODDE 6.0 sont indiqués dans l'**annexe 2**.

Tableau 5.13: Paramètres statistiques des modèles obtenus pour chaque réponse

| | Sucres totaux | Lipides | Carotenoids totaux | Phycobiliprotéines | EPS |
|-------------------------|---------------|---------|-----------------------|--------------------|------|
| R² | 0,74 | 0,7 | 0,8 | 0,88 | 0,84 |
| Q² | 0,56 | 0,54 | 0,51 | 0,67 | 0,53 |
| Validité | 0,85 | 0,83 | 0,62 | 0,66 | 0,71 |
| Reproductibilité | 0,8 | 0,78 | 0,99 | 0,98 | 0,95 |

• Coefficients de régression des modèles réajustés et analyse des effets

Le **tableau 5.14** présente les coefficients de régression (Coeff.USC) de chaque modèle obtenu (après le réajustement requis : transformation mathématique et élimination des termes non significatifs). Il est ressorti, de ce tableau, que l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄ exercent des effets significatifs de manière linéaire, interactive ou quadratique sur les réponses ciblées ($p < 0,1$).

De plus, l'analyse des effets des facteurs étudiés sous leurs termes linéaires, interactifs et quadratiques consolide les coefficients de régression et indique que la nature de ces effets est négative ou positive sur les sucres totaux, les lipides, les caroténoïdes totaux, les phycobiliprotéines et la production en EPS. Les différents effets sont schématisés sous forme d'un tracé d'effets, généré par le Logiciel MODDE 6.0.

Tableau 5.14 : Coefficients de régression des modèles réajustés liant les sucres totaux, les lipides, les caroténoïdes totaux, les phycobiliprotéines et la production des EPS chez *Arthrospira* sp., et la variation de l'intensité de la lumière et des concentration de NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄.

| | <i>(Sucres totaux)^{-0.5}</i> | | <i>Lipides</i> | | <i>Caroténoïdes totaux</i> | | <i>Log^(Phycobiliprotéines)</i> | | <i>(EPS)^{-0.25}</i> | | |
|---------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------------|----------------|---|----------------|------------------------------|----------------|-----------|
| | <i>R²</i> | <i>M.Ajust</i> | <i>R²</i> | <i>M.Ajust</i> | <i>R²</i> | <i>M.Ajust</i> | <i>R²</i> | <i>M.Ajust</i> | <i>R²</i> | <i>M.Ajust</i> | |
| | 0.74 | 0.53 | 0.70 | 0.57 | 0.80 | 0.64 | 0.88 | 0.26 | 0.84 | 0.30 | |
| | <i>Coeff CR</i> | <i>p-value</i> | <i>Coeff CR</i> | <i>p-value</i> | <i>Coeff CR</i> | <i>p-value</i> | <i>Coeff CR</i> | <i>p-value</i> | <i>Coeff CR</i> | <i>p-value</i> | |
| Constant | 0.2354 | 3.92E-019 | 14.017 | 2.33E-011 | 0.5142 | 7.00E-016 | 1.0777 | 1.903E-014 | 1.7953 | 7.02E-017 | |
| Termes Linéaire | L | -0.0005 | 0.0003 | / | NS | 0.0012 | 0.005 | -0.0065 | 2.73E-007 | -0.0037 | 0.228 |
| | N | 0.0047 | 0.290 | -0.377 | 0.88 | -0.0163 | 0.782 | 0.0153 | 0.012 | -0.0220 | 0.00061 |
| | NN | 0.0089 | 0.0060 | -1.377 | 0.0049 | -0.0523 | 0.008 | -0.2528 | 0.577 | -0.0147 | 0.0014 |
| | P | 0.0114 | 0.0006 | 3.137 | 0.045 | 0.0492 | 0.041 | 0.1383 | 0.348 | -0.0562 | 0.05 |
| Termes Quadratique | L*L | / | NS | / | NS | / | NS | 0.0000 | 0.094 | 0.0000 | 0.085 |
| | N*N | -0.0001 | 0.01 | 0.007 | 0.02 | 0.0002 | 0.072 | -0.0004 | 0.0029 | 0.0002 | 0.096 |
| | NN*NN | / | NS | / | NS | / | NS | 0.0516 | 0.0005 | -0.0242 | 0.083 |
| | P*P | / | NS | -0.999 | 0.0014 | -0.0239 | 0.056 | -0.0259 | 0.045 | / | NS |
| | L*N | / | NS | / | NS | / | NS | / | NS | / | NS |
| Termes Interactifs | L*NN | / | NS | / | NS | / | NS | / | NS | / | NS |
| | N*NN | / | NS | / | NS | 0.0011 | 0.050 | / | NS | 0.0030 | 6.70E-005 |
| | N*P | / | NS | 0.035 | 0.01 | 0.0016 | 0.0084 | / | NS | NS | NS |
| | NN*P | / | NS | 0.259 | 0.046 | 0.0236 | 0.0003 | / | NS | 0.0140 | 0.021 |

L : Lumière ; **N** : NaCl ; **NN** : NaNO₃ ; **P**:K₂HPO₄ ; **Coeff CR** : Coefficient de régression ; **M.Ajust** : Manque d'ajustement.

Les coefficients de régression révèlent que l'intensité de la lumière n'est pas le seul facteur déterminant pour la variation de la teneur en composants intra- ou extracellulaires chez *Arthrospira sp.*, comme révélé plus haut par l'analyse ACP, mettant en évidence l'effet d'interactivité des autres facteurs expérimentés. En effet, contrairement aux sucres totaux, où l'intensité de lumière présente un effet significatif sur leur induction, les lipides ne sont pas affectés ($p > 0,1$). Ce résultat est conforme avec celui obtenu par Ho *et al.* [185], qui ont rapporté qu'il n'y avait pas de variations significatives de la teneur en lipides chez *S. obliquus* CNW-N quant à la variation de l'intensité de lumière.

• **Les sucres totaux et les lipides**

Outre la lumière, la concentration du NaCl exerce un effet quadratique positif sur la teneur en sucres totaux et en lipides, tandis que les concentrations de K_2HPO_4 et $NaNO_3$ ont montré un effet négatif linéaire (**Figure 5.14**). De plus, des interactions synergiques entre $NaNO_3$ et K_2HPO_4 ainsi qu'entre NaCl et K_2HPO_4 sont identifiées et ont exercé un effet significatif sur l'accumulation de lipides.

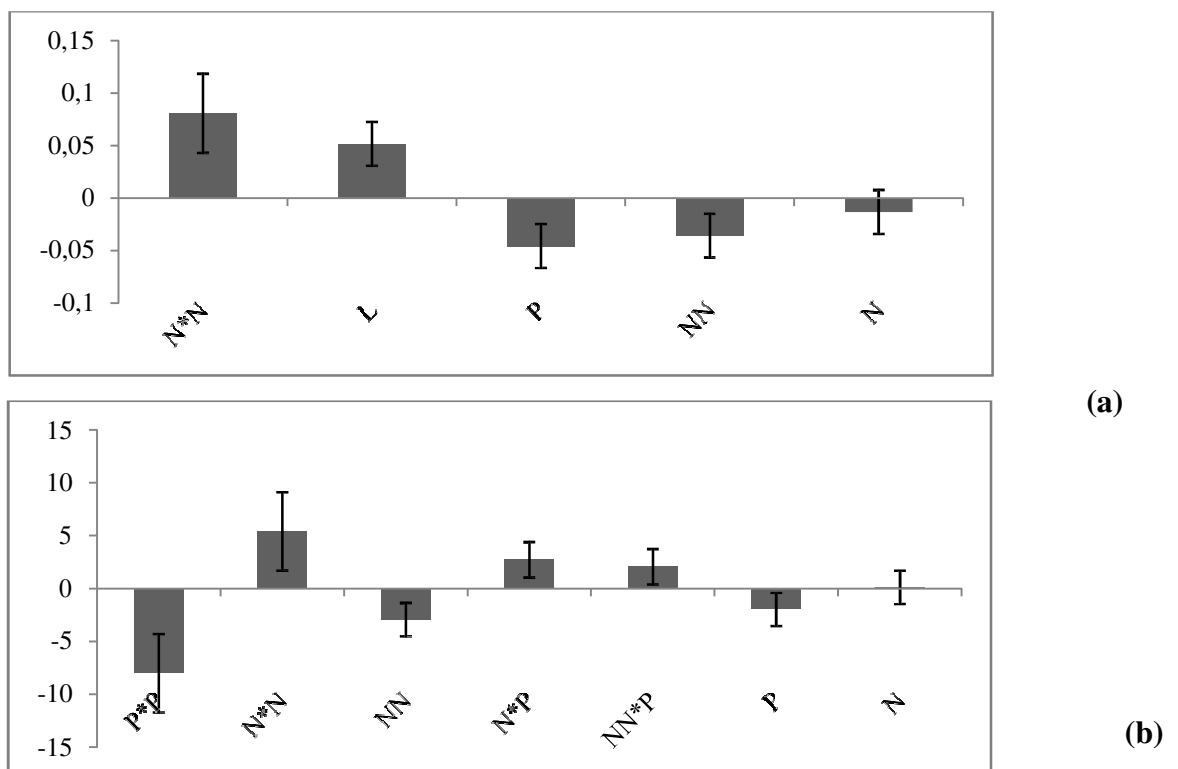


Figure 5.14 : Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la teneur en sucres totaux (a) et lipides (b) (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L : lumière ; N : $NaNO_3$

D'après les courbes des effets interactifs (**Figure 5.15**), la teneur en lipides augmente linéairement lorsque la concentration en azote (NaNO_3) est faible. Quant aux sucres totaux, cet effet est observé de manière linéaire uniquement (**Figure 5.14a**), aucune interaction significative n'est identifiée ($P > 0,1$) (**Tableau 5.14**). Cette tendance a été observée chez *Spirulina platensis*, cultivée sous condition militante en azote, [186; 187, 65], où le flux du carbone alloué à la photosynthèse est détourné de la voie métabolique de la synthèse des protéines vers la synthèse des sucres totaux et/ou des lipides [188].

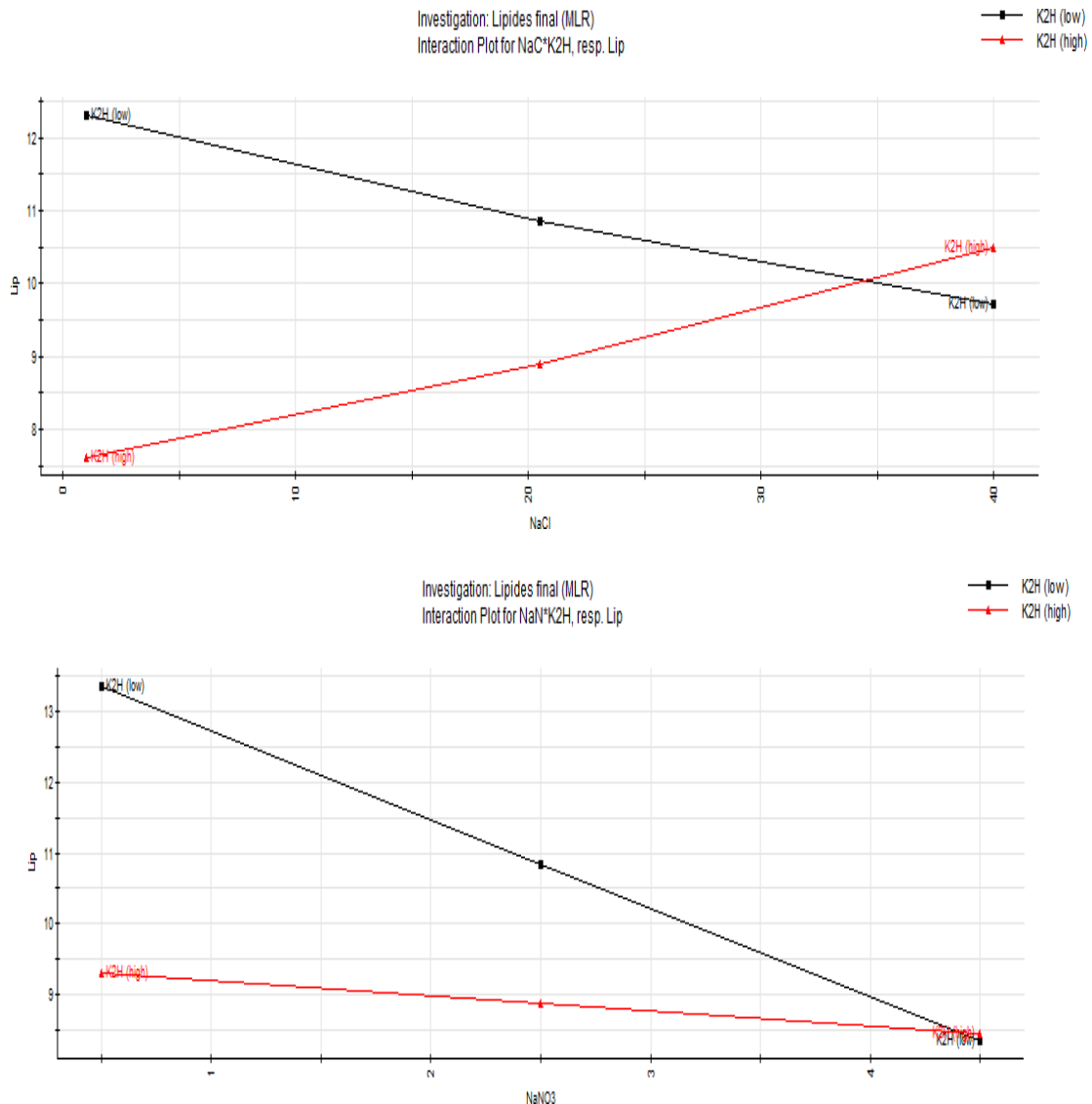


Figure 5.15 : Courbes des effets des interactions $\text{NaNO}_3 \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ et $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaCl}$ identifiées pour la teneur en lipides. K₂H : K_2HPO_4 ; Lip : Lipides. Low : Faible concentration, High : Forte concentration.

De même, une diminution linéaire de la teneur en sucres totaux a été observée avec l'augmentation de la concentration de phosphore (K_2HPO_4), tandis que pour la teneur en lipides, l'effet significatif du terme quadratique $K_2HPO_4 * K_2HPO_4$ indique un optimum atteint dans l'intervalle de l'étude ($p < 0,1$) (**Tableau 5.14**). Markou *et al.* [8] ont précisé qu'à de faibles concentrations en phosphore (10 mg/mL), la teneur en sucres totaux dans la culture d'*A. platensis* s'est significativement améliorée, tandis que la teneur en lipides n'a pas été affectée.

•Les caroténoïdes totaux

À l'inverse des sucres totaux et des lipides, les deux concentrations en K_2HPO_4 et $NaNO_3$ ont exercé un effet positif sur la teneur totale en caroténoïdes ce qui suggère que les deux concentrations de $NaNO_3$ et K_2HPO_4 doivent être élevées (4,50 g/L) pour que la teneur en caroténoïdes totaux augmente significativement (**Figure 5.16**).

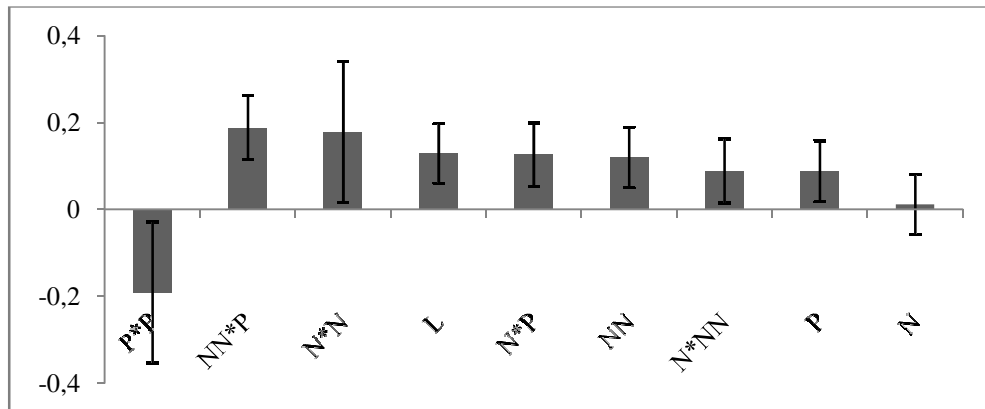


Figure 5.16: Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la teneur en caroténoïdes totaux (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L : lumière ; N : NaCl ; NN : $NaNO_3$; P : K_2HPO_4 ; Intervalle de confiance à 90%.

Ben Amotz *et al.* [189] et Lamers *et al.* [190] ont déclaré que la limitation en azote est une condition qui favorise l'accumulation des caroténoïdes totaux. Cependant, ce constat a été établi selon une méthode qui implique l'étude de l'effet de la variation de l'azote seul et non pas en interaction avec la variation d'un autre facteur. Dans la présente étude, une interaction positive de $NaNO_3$ et K_2HPO_4 est observée, outre une importante interaction de $NaNO_3$ et de K_2HPO_4 avec le NaCl (**Figure 5.17**). Pareillement, Shalaby *et al.* [64] et Borowitzka *et al.* (1990) [191] ont signalé que la production de β -carotène est stimulée par l'augmentation de la concentration de NaCl de 0,02 M à 0,08 M chez la spiruline. De plus, les résultats de la présente étude suggèrent un optimum atteint à une concentration en NaCl de 20,5 g/L à partir de laquelle l'amélioration des caroténoïdes

total est significative, bien que le terme linéaire de NaCl n'ait pas été significatif.

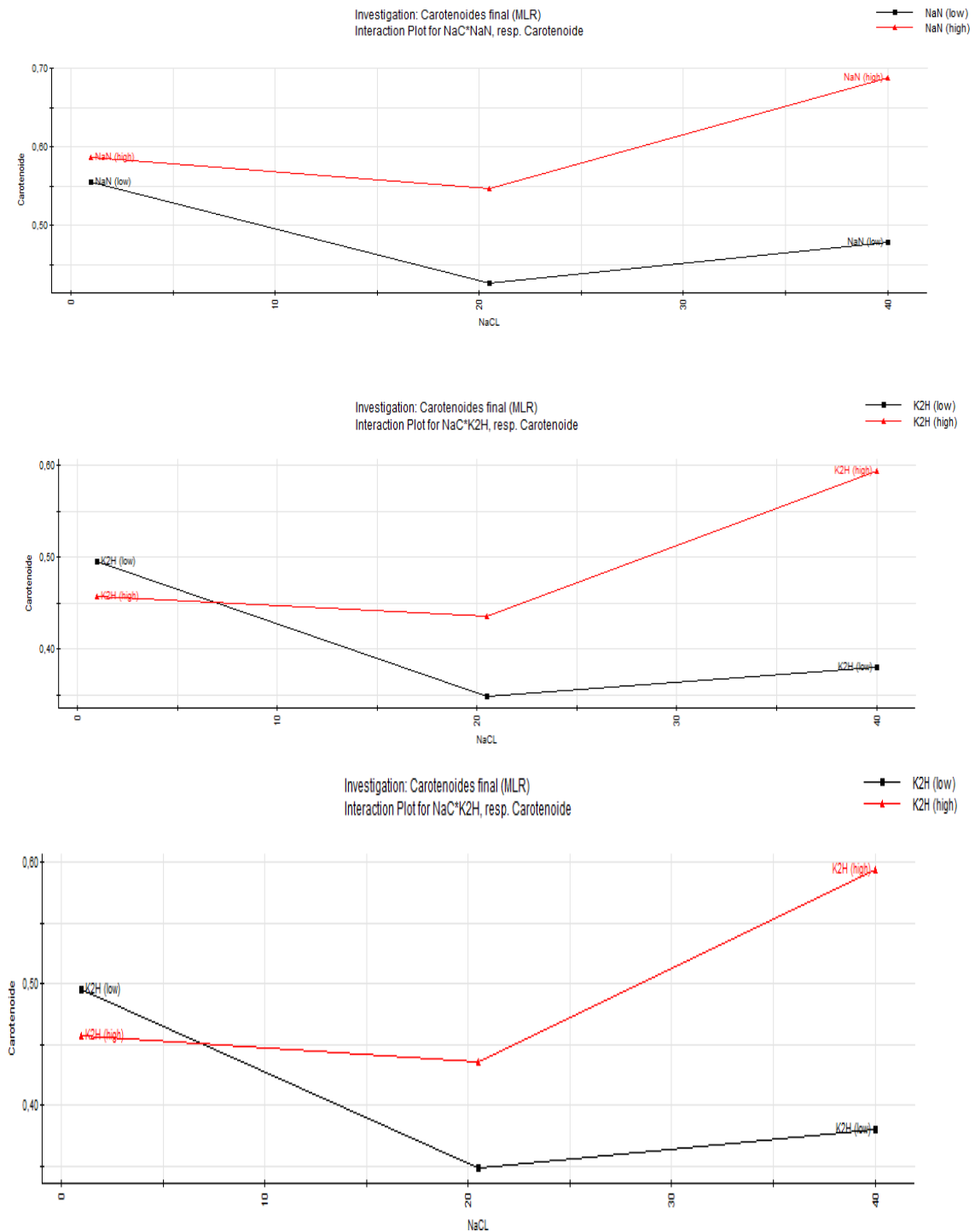


Figure 5.17 : Courbes d'effets des interactions $\text{NaNO}_3 \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaCl}$ et $\text{NaNO}_3 \cdot \text{NaCl}$ identifiées pour la teneur en caroténoïdes totaux. K2H : K_2HPO_4 , Low : faible concentration. High : forte concentration

•Les phycobiliprotéines

D'un autre côté, les résultats résumés dans la **figure 5.18** ont indiqué un effet linéaire négatif de l'intensité de la lumière et du NaCl sur l'amélioration de la teneur en phycobiliprotéines. Les concentrations du NaCl et du K_2HPO_4 affichent des termes quadratiques négatifs, indiquant un optimum atteint situé dans la première partie de l'intervalle de concentrations des facteurs étudiés (faibles concentrations).

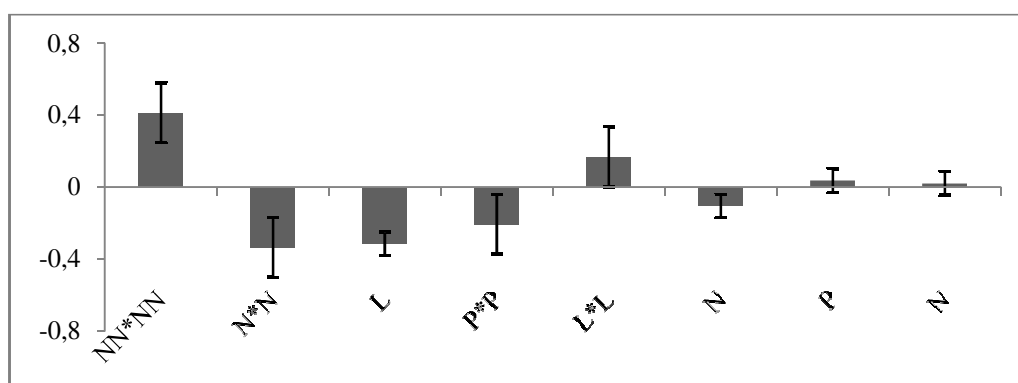


Figure 5.18 : Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la teneur en phycobiliprotéines (termes linéaires, quadratiques). L : lumière ; N : NaCl ; NN : $NaNO_3$; P : K_2HPO_4 . Intervalle de confiance à 90%.

Ce résultat est en accord avec l'hypothèse qui indique qu'une forte accumulation des ions sodium intracellulaire inhibe le transfert d'énergie à partir de phycobiliprotéines à photosystème II (PSII), et de ce fait, le contenu de la phycocyanine diminue [192]. De plus, Hifney *et al.* [193] ont indiqué que la concentration en NaCl affecte la teneur en phycobiliprotéines, et qu'une concentration en NaCl supérieure à 0,9 M réduit considérablement la teneur en phycobiliprotéines. De même, Sharma *et al.* [68] ont signalé que les phycobiliprotéines sont renforcées à 0,4 M de NaCl. La même tendance a été trouvée dans la présente étude, qui a révélé que le maximum de la teneur en phycobiliprotéines est obtenu à 0,33 M.

•Les substances polymériques extracellulaires (EPS)

En ce qui concerne la production des EPS, les résultats indiquent que les concentrations de NaCl, $NaNO_3$ et de K_2HPO_4 exercent un effet linéaire positif (**Figure 5.19**). En se référant à la littérature, il a été rapporté qu'une forte concentration en NaCl

améliore significativement la production d'EPS chez différentes cyanobactéries, en particulier chez *Spirulina platensis* [67]. L'amélioration de la quantité des EPS produite dans les conditions de stress est considérée comme un moyen d'éviter le stress oxydatif dans les cellules et pour protéger les membranes contre la dessiccation [194].

De plus, l'interaction de NaCl avec le NaNO₃ a montré une forte influence antagoniste, consolidant le fait que la concentration doit être élevée en NaCl, combinée à une faible concentration d'azote (NaCl * NaNO₃) pour maximiser la production d'EPS (Figure 5.20).

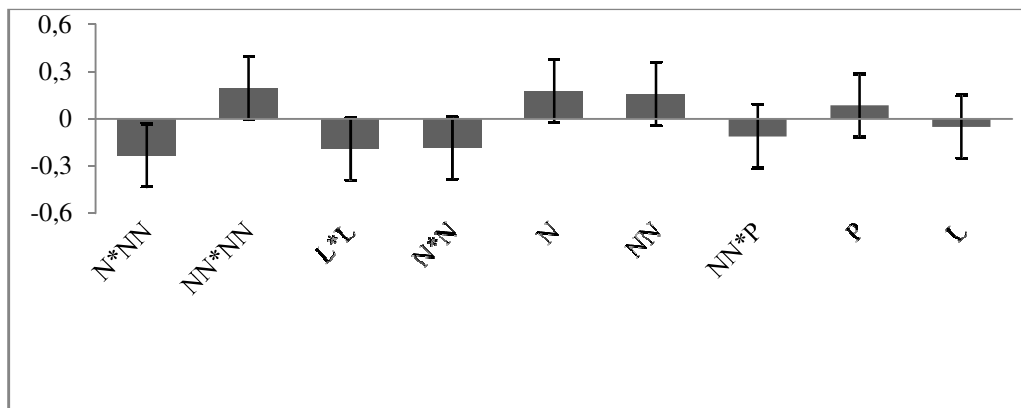


Figure 5.19 : Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur la production d'EPS (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L ; lumière ; N : NaCl ; NN : NaNO₃ ; P : K₂HPO₄. Intervalle de confiance à 90%.

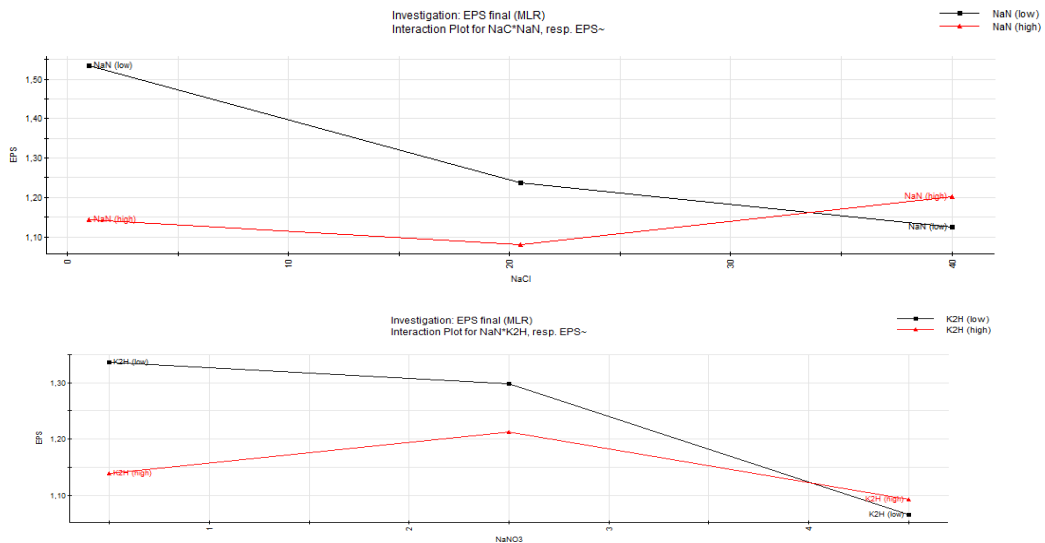


Figure 5.20 : Courbes des effets des interactions NaNO₃*K₂HPO₄ et NaNO₃*NaCl identifiées pour la production d'EPS. K₂H : K₂HPO₄, Low : Faible concentration, High : Forte concentration.

Cependant, différentes tendances de l'effet de la concentration d'azote affectant la production d'EPS ont été rapportées. Certaines souches, y compris *Spirulina* sp., produisent plus d'EPS sous des conditions en limitation d'azote [91]. En effet, la limitation de l'azote contribue à l'augmentation du rapport C/N, et, par conséquent, la promotion de l'incorporation de carbone dans les EPS [87]. Néanmoins, Nicolaus *et al.* [91] ont indiqué que *Synechocystis* et *Phormidium* et certains *Cyanothece* ont besoin d'azote pour produire les EPS.

Par ailleurs, dans la présente étude, il est ressorti qu'une forte concentration de K_2HPO_4 induit la production d'EPS, ce qui est en accord avec ceux rapportés par la littérature. En fait, la limitation du phosphore a réduit la production d'EPS chez *Arthrospira platensis* [7, 195], *Anabaena* sp. et *Phormidium* sp. [196] alors que chez d'autres souches de cyanobactéries, l'utilisation d'une faible concentration en phosphore améliore la production d'EPS [87].

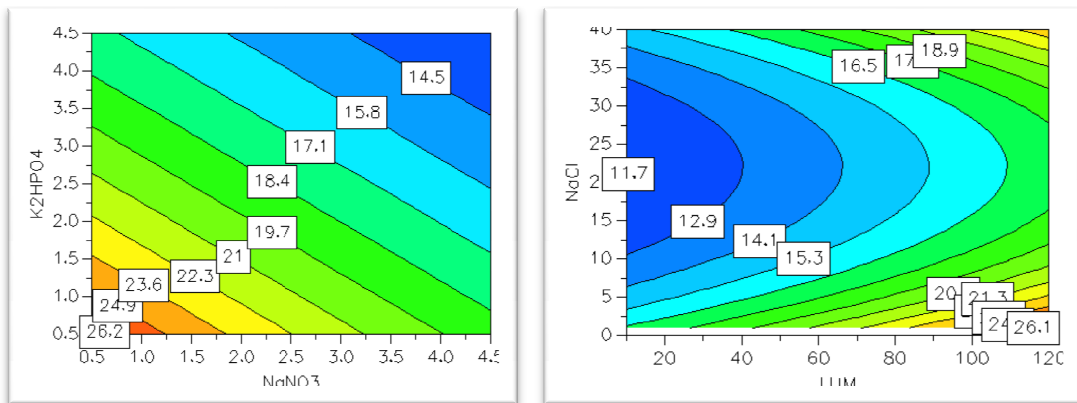
Sur le plan métabolique, il est encore difficile de mettre des hypothèses concernant les voies métaboliques empruntées par les cellules cyanobactérienne, et leurs régulations sous l'effet des stress biotiques et abiotiques. Mais selon Vonshak [51] ces voies métaboliques suivent certainement celles des bactéries et celle des végétaux supérieurs, impliquant le cycle de Kelvin.

5.1.2.5. Combinaison de facteurs et maximisation des métabolites intracellulaires et extracellulaires

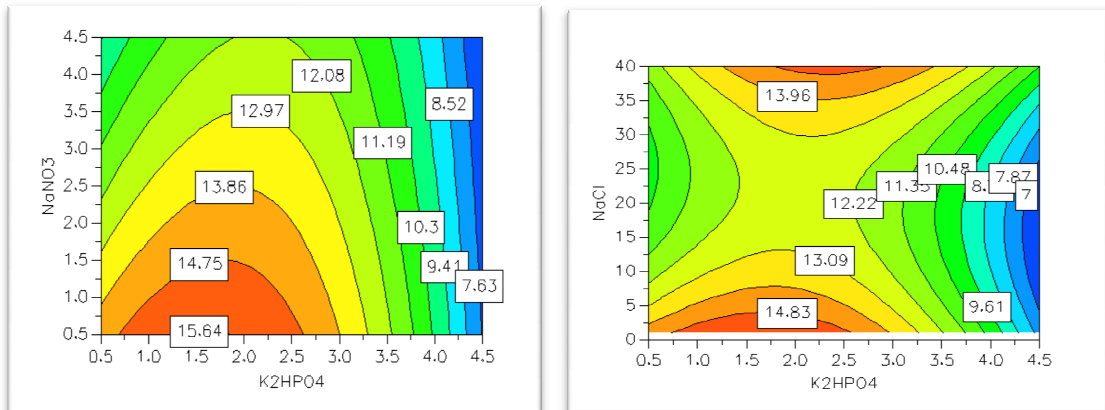
La combinaison de facteurs qui maximisent chaque réponse est évaluée par les équations établies des modèles obtenus. La **figure 5.21** présente les principales courbes des isoréponses relatives aux combinaisons de facteurs significatives qui maximisent chaque réponse étudiée. À l'inverse, de faibles intensités de lumière ($10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) associées à une concentration modérée en NaCl (11,76 g/L) ainsi qu'à une faible concentration en NaNO_3 (0,50 g/L) et modérée en K_2HPO_4 (2,68 g/L) ont permis d'atteindre une teneur maximale en phycobiliprotéines de 16,09% de biomasse sèche. En revanche, des intensités de lumière modérées de $57,2 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ combinées à une concentration élevée en NaCl (40 g/L) et K_2HPO_4 (4,50 g/L) mais faible en NaNO_3 (0,50 g/L) qui ont permis d'atteindre une quantité maximale de 0,902 g/g de biomasse sèche.

De plus, à partir de ces résultats, les facteurs combinant la stimulation de l'EPS et des hydrates de carbone semblent être opposés. En effet, dans des conditions qui maximisent la production d'EPS, la teneur en glucides a diminué de 2,12 fois par rapport à leur teneur dans leurs conditions de maximisation respectives. Néanmoins, la production d'EPS a diminué de 8,57 fois dans les conditions maximisant la teneur en sucres totaux. Les concentrations de NaCl et de K_2HPO_4 pourraient contribuer également à modifier le rapport C/N, affectant ainsi les mécanismes qui contrôlent l'incorporation du carbone dans le métabolisme interne (accumulation des sucres totaux) ou externe (production EPS ou défense).

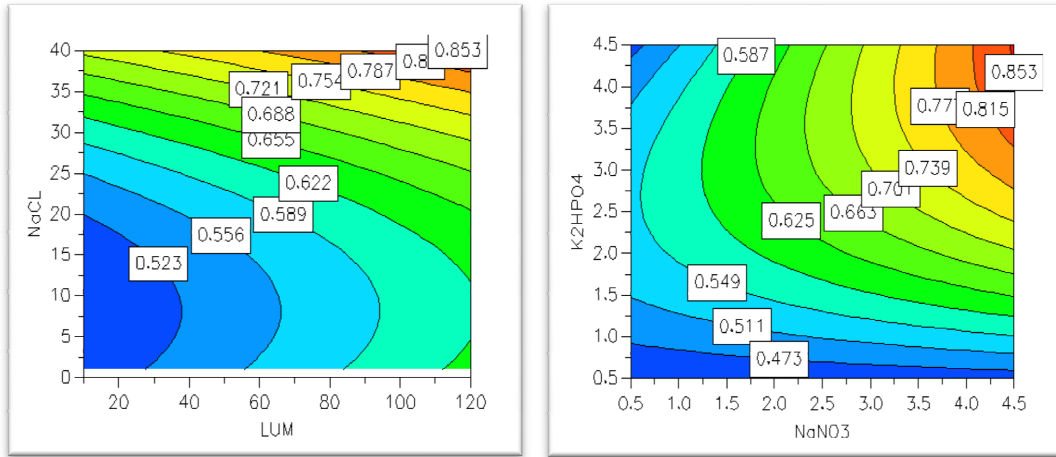
Sucres totaux



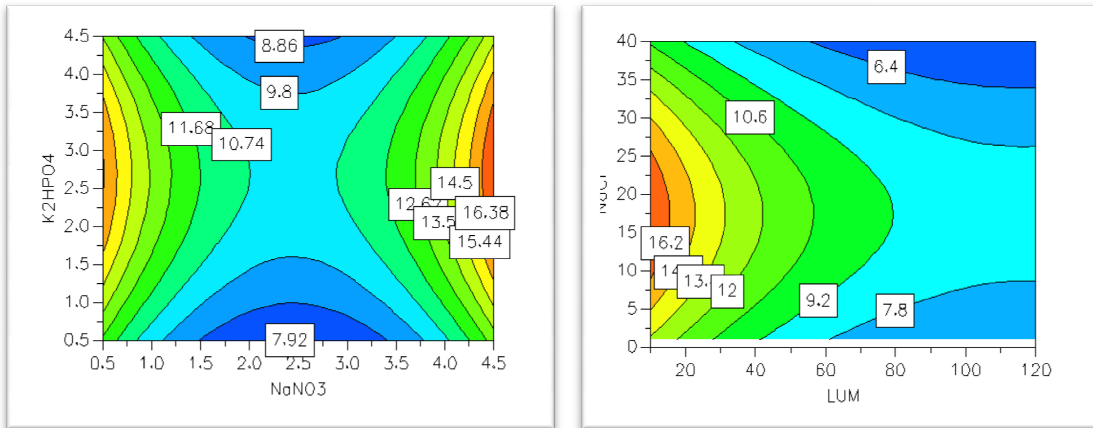
Lipides



Caroténoïdes totaux



Phycobiliprotéines



EPS

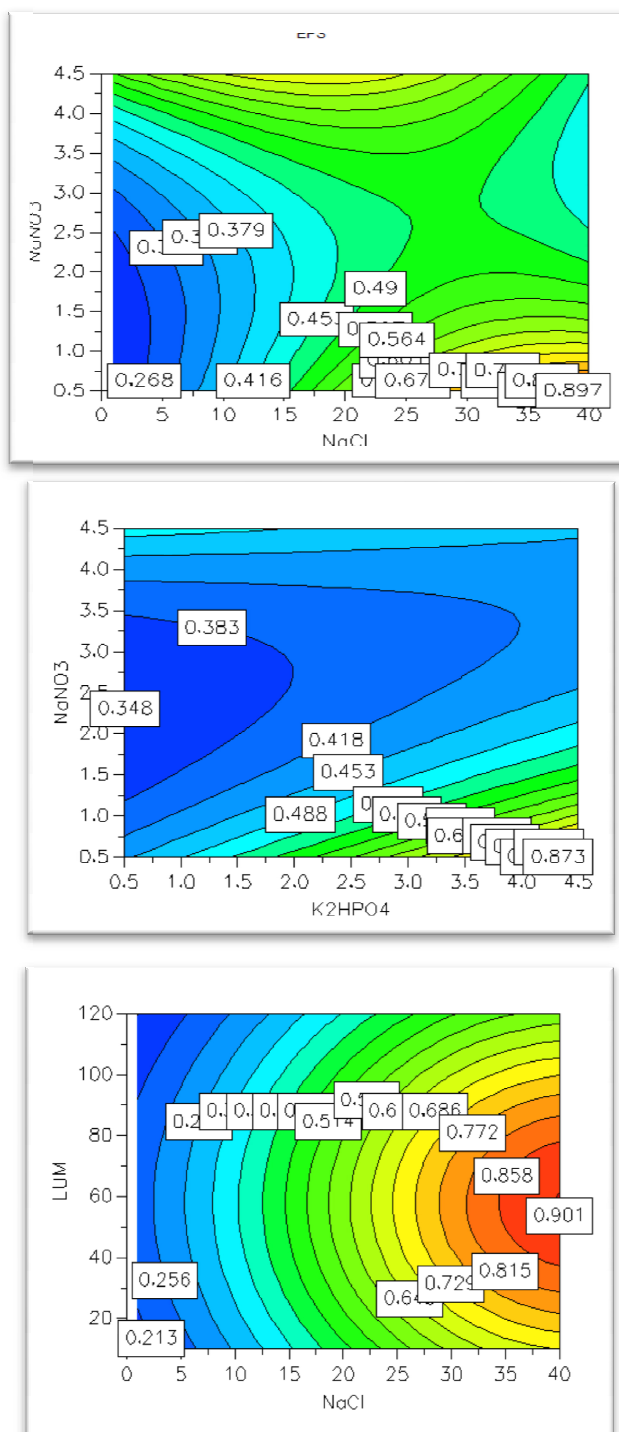


Figure 5.21 : Les contours iso réponses des sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et la production d'EPS chez *Arthrospira* sp. en fonction de l'intensité de la lumière, NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄.

La composition de la biomasse et la synthèse des EPS à leurs teneurs maximales, obtenues dans les conditions de stress (phase II) sont comparées à celles obtenues à la fin de la phase exponentielle de la phase I de culture (Figure 5.22). Les teneurs en sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et en EPS dans la Phase II sont respectivement 3,55, 1,73, 9,55, 2,92 et 1,46-fois supérieures à leurs teneurs obtenues dans les conditions optimales de croissance (Phase I).

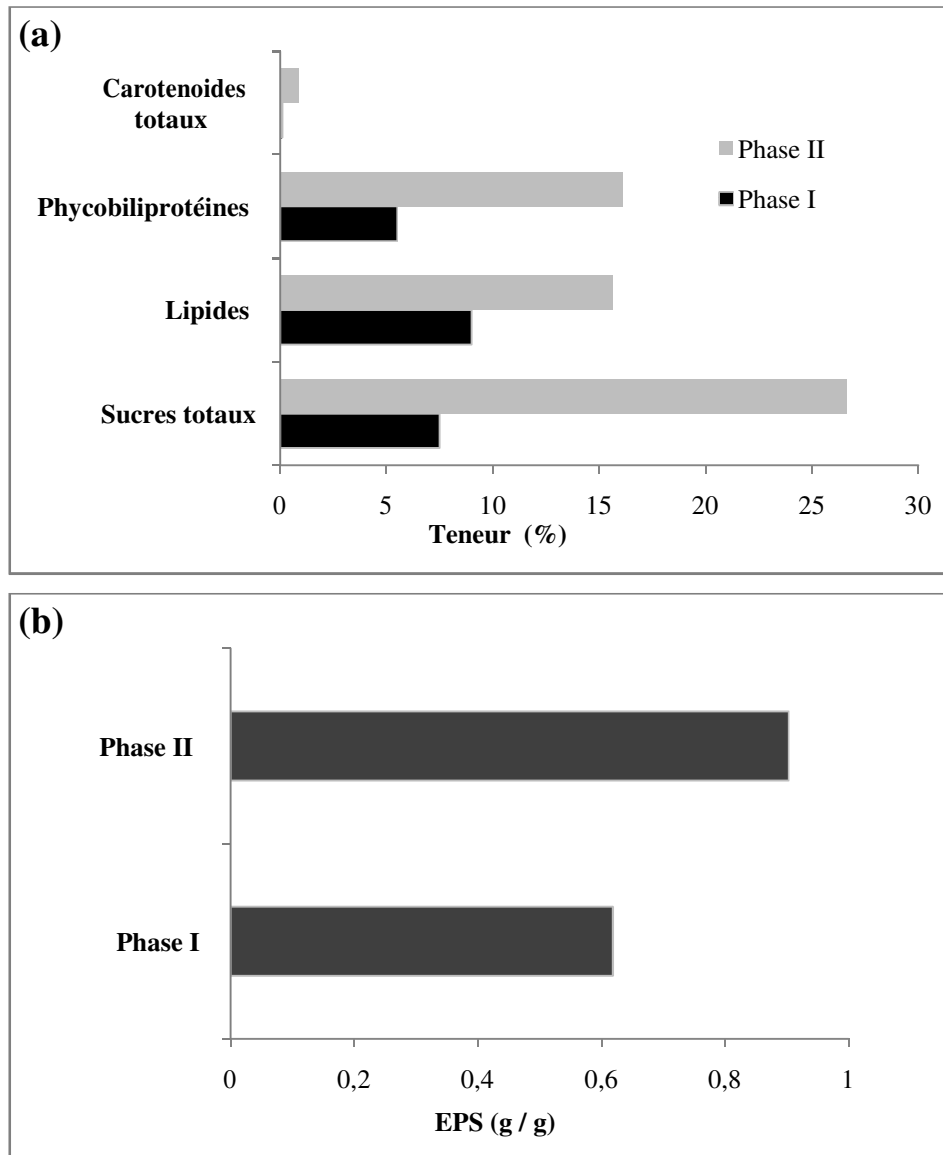


Figure 5.22 : Proportions maximales en sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines (%) (a) et production d'EPS g/g (b) sous les combinaisons optimales d'intensité de lumière et concentrations en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄ (Phase II) contre celles obtenues en phase optimale de croissance

• Validation des modèles

En examinant le tableau 5.15, tenant compte du test ANOVA, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques obtenue pour les teneurs en sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux phycobiliprotéines et EPS ($p < 0,05$).

Tableau 5.15: Comparaison des valeurs expérimentales avec celles prédites par le modèle pour la combinaison d'intensité de lumière et concentration en NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄

| | Valeurs théoriques* (%) | Valeurs expérimentales (%) |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Sucres totaux | 26,40 ^a | 27,16±2,31 ^a |
| Lipides | 15,62 ^a | 14,89±1,48 ^a |
| Carotenoids totaux | 0,856 ^a | 0,802±0,11 ^a |
| Phycobiliprotéines | 16,09 ^a | 13,34±3,22 ^a |
| EPS | 0,902 ^a | 0,892±0,05 ^a |

*Valeurs théoriques générées par chaque modèle. Lettres similaires dans une même ligne n'indiquent pas une différence significative.

Conclusion

La présente étude démontre que le stress à multiples facteurs combinés modifie significativement la composition d'*Arthrospira* sp. de manière dynamique.

Les résultats obtenus ont montré que l'application de différentes combinaisons d'intensité lumineuse, NaCl, NaNO₃ et K₂HPO₄ permettent d'obtenir des rapports de maximisation en termes de sucres totaux, lipides, caroténoïdes totaux, phycobiliprotéines et de production d'EPS très satisfaisants.

La composition de la biomasse et la production d'EPS peuvent être modulées efficacement en un temps court (3 jours) en utilisant le procédé de culture en deux phases tout en évitant toute restriction de la productivité en biomasse. Ce procédé est donc une stratégie prometteuse pour produire différents types de biomasse d'*Arthrospira* sp., enrichis en métabolites souhaitables et peut donc être destiné ou utilisé avec succès dans les domaines de la nutrition, de la pharmacologie ou de l'aquaculture.

5.2. Les EPS chez *Arthrospira* sp. : Culture en vue de l'amélioration leur production, extraction et caractérisation partielle de leur fraction polysaccharidique

Introduction

Les EPS cyanobactériens ont été rarement considérés comme étant des molécules à haute valeur ajoutée par la communauté industrielle ou scientifique, mais plutôt considérés comme des sous-produits de culture de cyanobactéries, en comparaison aux autres métabolites intracellulaires tels que les protéines, les pigments ou les lipides, ayant déjà faisant l'objet de plusieurs études tant du point de vue production que propriétés physicochimiques, biologiques ou encore leur potentielle conversion en énergie.

Par conséquent, seulement quelques d'études se sont intéressées à l'étude des paramètres de culture pouvant maximiser la production en EPS ou au développement de procédés post-culture, pour leur extraction, fractionnement et caractérisation.

Tenant compte de ces considérations, l'objectif de ce chapitre est i) d'étudier l'effet de la combinaison de deux facteurs cruciaux à intérêt industriel et économique, l'intensité de la lumière et la concentration de NaCl, sur l'amélioration de la production d'EPS chez la souche saharienne d'*Arthrospira* sp. et ii) de contribuer dans la proposition d'un procédé spécifique de récupération de ces EPS produits ainsi que l'évaluation de leur éventuelle application industrielle à travers leur caractérisation physico-chimique, structurale, thermique et rhéologique.

5.2.1. Induction des EPS chez *Arthrospira* sp. par combinaison de l'intensité de la lumière avec la concentration en NaCl

Après qu'une culture d'*Arthrospira* sp. soit conduite en deux phases pour améliorer la production en EPS, les résultats obtenus indiquent, dans un premier temps, que durant la phase I $0,62 \pm 0,08$ g/g de biomasse sèche d'EPS sont produits (**Tableau**

5.16). Trabelsi *et al.* [13], qui ont enregistré, chez *Arthrospira platensis* cultivée en batch autotrophie (33 °C, 180 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$), une production d'EPS de 0,433 g/g de biomasse sèche.

La différence conséquente dans la quantité d'EPS produit pourrait être liée aux conditions de culture ou à l'espèce elle-même. En effet, cette importante production en EPS pourrait être attribuée à la souche *Arthrospira sp.*, acquise en réponse à son biotope extrême (désert du Sahara), permettant à cette souche de s'adapter et de développer des mécanismes efficaces de défense, qui se traduisent par la production d'EPS [87,9].

Dans un second temps, durant la phase II de culture, les résultats révèlent une large variation dans la production d'EPS allant de 0,15 à 0,98 g/g de biomasse sèche en fonction des combinaisons d'intensité de lumière et de concentration en NaCl (**Tableau 5.16**).

- Plan d'expériences

Afin d'examiner les éventuels effets combinés des facteurs étudiés responsables de la variation dans la production d'EPS, une modélisation mathématique est réalisée à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM). Les résultats obtenus sont comme ce qui suit :

Tableau 5.16 : Valeurs expérimentales de la production d'EPS en g g^{-1} biomasse sèche en fonction de différentes combinaisons d'intensité de lumière ($\mu\text{mol photons /m}^2/\text{s}$) et de concentration en NaCl (g/L) au cours de la phase I et de la phase II

| Essais | Lumière $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ | NaCl (g/L) | EPS (g/g) |
|-----------------|--|------------|-----------|
| Phase I | 80 | 1 | 0,62±0,08 |
| Phase II | | | |
| 1 | 10 | 1 | 0,152 |
| 2 | 65 | 1 | 0,192 |
| 3 | 120 | 1 | 0,454 |
| 4 | 10 | 20,5 | 0,387 |
| 5 | 65 | 20,5 | 0,313 |
| 6 | 120 | 20,5 | 0,326 |
| 7 | 10 | 40 | 0,985 |
| 8 | 65 | 40 | 0,972 |
| 9 | 120 | 40 | 0,465 |
| 10* | 65 | 20,5 | 0,380 |
| 11* | 65 | 20,5 | 0,336 |
| 12* | 65 | 20,5 | 0,468 |

*points centraux

- Paramètre du modèle

Après ajustement du modèle, impliquant le calcul d'une transformation mathématique en Puissance ($E^{-0.25}$) suggérée par l'analyse Box-Cox, le modèle réajusté obtenu pour les EPS présente ainsi (**Annexe 3**) :

Un coefficient de corrélation (R^2) de 0,92. De ce fait, 92 % de la variation de la production d'*Arthrospira* sp. en EPS est expliquée par la variation de l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl ;

Un coefficient de prédiction (Q^2) de 0,6. Ce modèle permet de prédire 60 % de la production d'*Arthrospira* sp. en dehors de l'intervalle étudié pour chaque facteur ;

Une validité du modèle de 0,70. Le modèle est donc valide ;

Une reproductibilité du modèle de 0,98. Le modèle est alors reproductible

- Analyse du modèle

Les coefficients de régression du modèle réajusté, quant aux EPS, sont indiqués dans le **tableau 5.17** et permettent de définir la nature des effets des termes linéaires, quadratiques et interactifs de la concentration de NaCl et de l'intensité de la lumière sur la production d'EPS.

Tableau 5. 17: Les coefficients de régression du modèle réajusté liant la production des EPS chez *Arthrospira* sp. et la variation de l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl

| | R^2 | Manque d'ajustement |
|---------------------|-----------------|---------------------|
| | 0,92 | 0,26 |
| | <i>Coeff.CR</i> | <i>p-value</i> |
| Constant | 0,777653 | ,98E-10 |
| Lumière | -0,000973 | ,954511 |
| NaCl | 0,117659 | ,0001856 |
| NaCl*NaCl | 0,0424055 | ,111279 |
| Lumière*NaCl | -0,091409 | ,0026852 |

Après analyse du modèle (**Figure 5.23**), les résultats obtenus révèlent que l'intensité de la lumière exerce un effet linéaire non significatif sur la production d'EPS dans l'intervalle expérimental étudié ($p < 0,05$). Quant à la concentration en NaCl, elle présente un effet linéaire synergique significatif, alors que ce n'est pas le cas pour son terme quadratique, indiquant qu'aucune concentration optimale significative n'a été atteinte dans

l'intervalle d'étude et que des concentrations plus élevées en NaCl permettent d'obtenir une production supérieure.

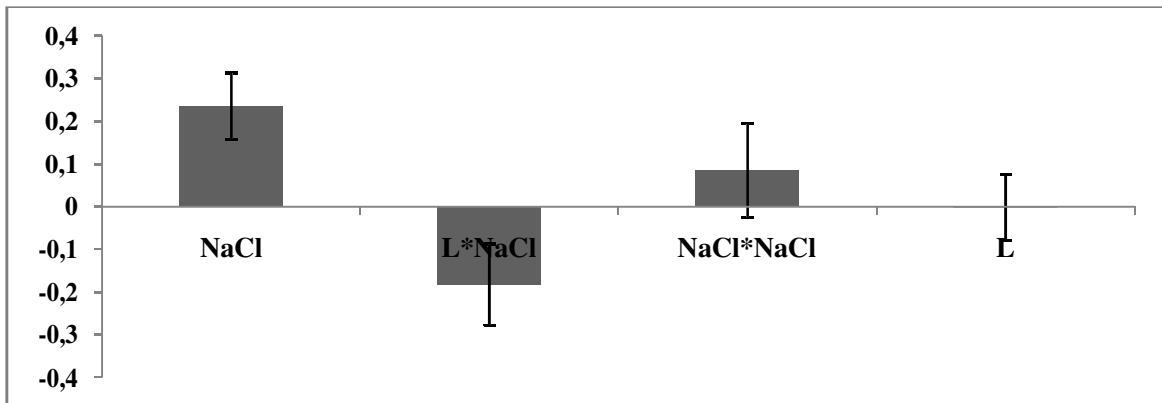


Figure 5.23: Tracé des effets significatifs des facteurs étudiés sur l'amélioration de la production d'EPS (termes linéaires, quadratiques et interactifs). L : lumière ; Intervalle de confiance à 90%.

De plus, et de manière intéressante, les résultats exhibent une interaction antagoniste significative entre l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl ($p < 0,05$), mettant en évidence que l'obtention d'une production maximale en EPS, est soumise à une concentration en NaCl élevée combinée obligatoirement à une intensité de la lumière faible, et ce dans les intervalles expérimentaux étudiés (**Figure 5.24**).

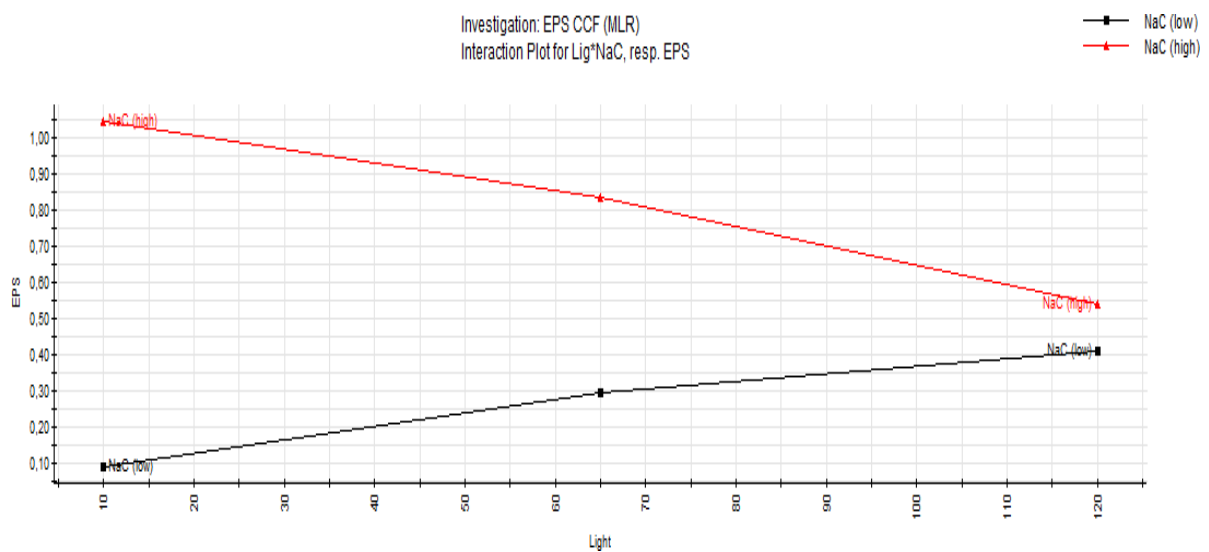


Figure 5.24 : Courbes des effets des interactions lumière*NaCl identifiées pour la production d'EPS. NaC : NaCl ; Light : Lumière. Low : Faible concentration, High : Forte concentration.

Tenant compte de cette interaction et de l'effet linéaire positif de la concentration en NaCl suggérant l'utilisation de concentrations plus élevées afin d'obtenir une production en EPS supérieure, une expérimentation a été réalisée en deux phases de 3 jours sous une intensité de lumière de 10 et 5 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ et en présence de 50 et 60 g/L de NaCl, respectivement. Au bout du 1^{er} jour, les cultures expérimentales ont pris une couleur jaune témoignant d'une absence d'adaptation et d'une lyse cellulaire, menant à leurs morts.

Plusieurs études ont rapporté que l'amélioration de la production en EPS chez les cyanobactéries est obtenue à des intensités lumineuses élevées [92]. L'étude de Trabelsi *et al.* [13], en contrepartie, a démontré que la lumière n'est pas le facteur déterminant pour la maximisation des EPS chez *Arthrospira* sp., mais que cette dernière serait régie par l'interaction significative de la lumière avec la température. En fait, les résultats obtenus dans le présent travail sont en accordance avec cette tendance d'interactivité de facteurs.

L'augmentation concomitante de la production des EPS avec l'augmentation de la concentration de NaCl révélée dans cette étude a été confirmée chez différentes cyanobactéries et microalgues comme *Arthrospira platensis* [6], *Aphanocapsa halophyta* [197], *Microcoleus vaginatus* [198], *Cyanothece* [199] et *Synechocystis* [200]. En effet, sous conditions extrêmes de salinité ou de température, l'augmentation dans la production d'EPS pourrait être considérée comme un moyen pour éviter le stress oxydatif dans les cellules afin de protéger les membranes contre la déshydratation [194]. De plus et en homologie avec les bactéries, la présence d'EPS autour de la cellule pourrait réduire la diffusion rapide et brutale des ions du milieu à travers la surface cellulaire, préviendrait donc la mort cellulaire [201].

- Combinaison de maximisation de la production en EPS

Les conditions de combinaison des facteurs qui maximisent la production d'EPS sont évaluées par les équations du modèle obtenu. La **figure 5.25** présente la courbe de l'isoréponse combinant l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl.

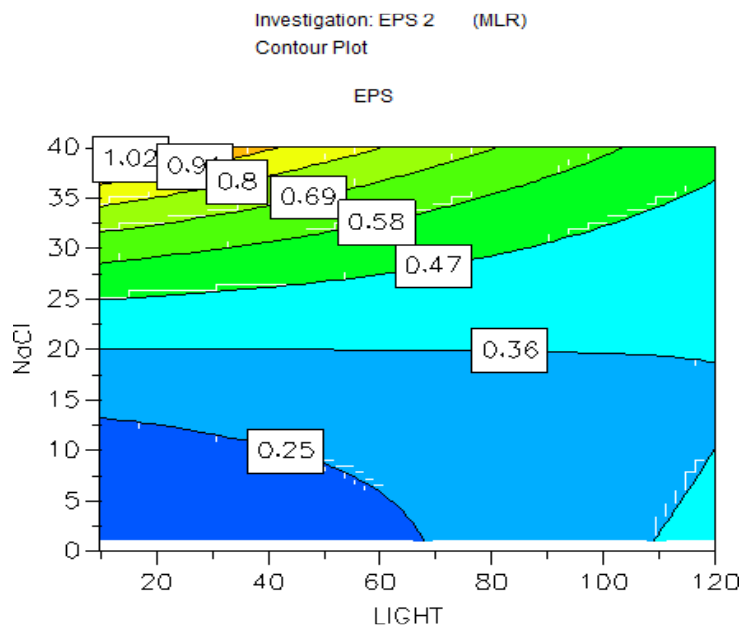


Figure 5.25 : Les contours isoréponses de production d'EPS en fonction de l'intensité de la lumière et de la concentration en NaCl chez *Arthrospira* sp.; LIGHT : Lumière

Une faible intensité de lumière de $10 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ combinée à une concentration élevée en NaCl de 39 g/L permettent d'atteindre une production maximale en EPS de $1,02 \text{ g/g}$ de biomasse sèche. Cette valeur maximale est 1,67 fois supérieure à la production d'EPS à la fin de la phase I (conditions optimales de croissance). De plus, cette combinaison de facteurs permet d'avoir une production en EPS satisfaisante et pratiquement similaire à celle obtenue sous stress multifactoriel impliquant la variation de l'intensité de la lumière et les concentrations en NaCl, NaNO_3 et K_2HPO_4 . Ainsi, la production d'EPS peut être optimisée par d'autres conditions qui s'avèrent être économiques et facilement adaptables en industrie.

• Validation

En examinant le **tableau 5.18** et tenant compte du test ANOVA il est ressorti une absence de différence significative entre les valeurs expérimentales et celles théoriques de la production d'EPS ($p < 0,05$).

Tableau 18 : Comparaison des valeurs expérimentales avec celles prédites par le modèle pour la combinaison d'intensité de lumière et concentration en NaCl

| | Quantité en EPS (g/g de biomasse) |
|----------------------|-----------------------------------|
| Valeur théorique* | 1,02 ^a |
| Valeur expérimentale | 1,09±0,11 ^a |

*Valeur théorique générée par le modèle. Lettres similaires dans une même colonne n'indiquent pas une différence significative.

5.2.2. Extraction des exopolysaccharides (PS) à partir des EPS

Dans le but de récupérer les PS d'*Arthrospira* sp, une culture a été conduite dans un bioréacteur de 10 L contenant 5 L de milieu Zarrouk, selon le procédé de culture en deux phases et sous les conditions indiquées précédemment maximisant la production en EPS, où la concentration en NaCl est de 39 g/L et l'intensité de lumière et de 10 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$. Le milieu de culture, exempt de cellules d'*Arthrospira* sp., est ultrafiltré à travers une membrane dont le seuil de coupure est de 5 kDa, afin de concentrer les EPS. Le retentât est soumis à plusieurs cycles de lavage à l'eau ultra pure afin d'éliminer les sels de culture. La **figure 5.26** montre la variation de conductivité du retentât en fonction des cycles de lavage. Les résultats révèlent que la vitesse de dessalement est importante entre le 1^{er} et le 5^{ème} lavage amenant la conductivité du retentât à une baisse significative allant de 104,63±1,01 mS/cm à 0,514±0,02 mS/cm ($p < 0,05$). Au-delà du 5^{ème} lavage, la conductivité ne montre aucune amélioration significative quant aux lavages restants (8^{ème}) et tend plutôt à se stabiliser aux alentours de 0,4 mS/cm. Ainsi, 5 lavages sont efficaces pour dessaler le retentât d'EPS. Le rendement en EPS après ultrafiltration et dessalement est de 53,4±3,24%. Cette valeur indique la présence d'une population d'EPS dont la masse moléculaire est inférieure à 5 kDa. De plus, la pression appliquée lors de l'ultrafiltration (2 bars) pourrait induire le passage des EPS dans le perméat. Ainsi, une optimisation de la pression appliquée est à tenir en compte afin d'obtenir un meilleur rendement. Par ailleurs, après l'étape de déprotéinisation, qui a pour but de purifier la fraction polysaccharidique, le rendement en PS extrait est de 69,4±2,21%.

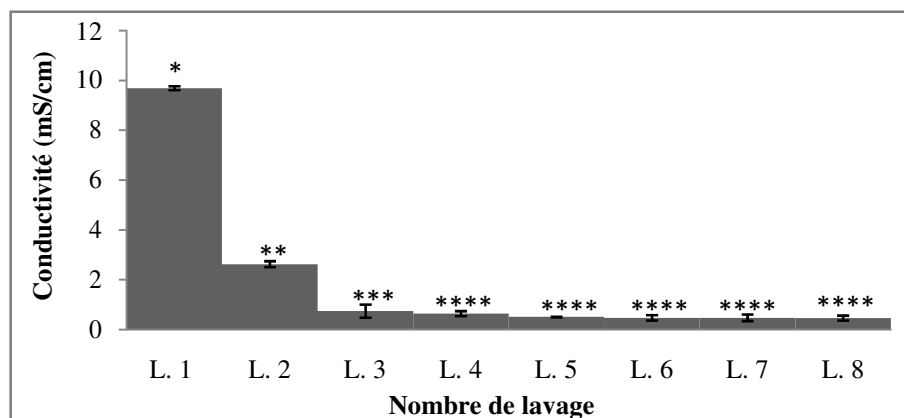


Figure 5.26 : Les valeurs de la conductivité (mS/cm) du retentât d'EPS en fonction du nombre de lavage. L : Lavage.

5.2.3. Caractérisation des EPS et du PS

5.2.3.1. Composition physicochimique

La composition chimique du retentât, des EPS après dessalement, et des exopolysaccharides (PS) extraits est résumée dans le **tableau 5.19**. La teneur totale en cendres a consolidé les résultats de la conductivité, passant ainsi de $90,1 \pm 1,11\%$ dans le retentât à $5,08 \pm 0,66\%$ dans les EPS après dessalement. Une amélioration significative du taux des groupements sulfate a été également révélée, passant de $1,84 \pm 0,02\%$ dans les EPS dessalés à $2,42 \pm 0,12\%$. Toutefois, cette teneur demeure faible par rapport à celle rapportée par Majdoub *et al.* [11].

La teneur en sucres totaux est estimée de $2,1\% \pm 0,052$ dans le retentât. Cette dernière augmente après les étapes de dessalement pour atteindre $60,56 \pm 1,16\%$ puis $67,3\% \pm 1,1$ suite à l'étape de déprotéinisation des EPS. De plus, la déprotéinisation a permis une diminution d'environ 2,16 fois de la teneur en protéines solubles dans les EPS dessalés pour atteindre une teneur finale de $5,14 \pm 0,32\%$ dans le PS.

Ces présents sont distincts de ceux obtenus par Trabelsi *et al.* [13] chez *Arthrospira platensis*, cultivée en batch autotrophie durant 25 jours, où la composition des EPS était dominée par la fraction protéique (55% du poids sec) alors que la teneur en glucides n'était que de 13% (poids sec). Selon la littérature, la fraction protéique dans les EPS cyanobactériens varie de 0,6 à 50,3% (par rapport au poids sec) et dépend principalement de l'espèce et des conditions de culture [87, 8].

Tableau 5.19: Composition physico-chimique des EPS et du PS

| | Retentât | EPS déssalées | PS |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Humidité % | ND | 14,8±1,39 ^a | 12,85± 0,78 ^a |
| Cendre % | 90,1±1,11 ^a | 5,08±0,66 ^b | 5,85±0,71 ^b |
| Sucres totaux % | 2,1±0,052 ^a | 60,56±1,16 ^b | 67,3±1,1 ^c |
| Protéines solubles % | ND | 11,12±0,65 ^a | 5,14±0,32 ^b |
| Sulfate % | ND | 1,84±0,02 ^a | 2,42±0,12 ^b |
| Tg (°C) | ND | 55,6 | 50,1 |
| ΔHg (J/g) | ND | 60,7 | 51,35 |

ND : Non déterminé. Résultats exprimés par rapport au poids humide. Les différentes lettres sur une même ligne indiquent une différence significative.

Les conditions de culture (forte concentration en NaCl) dans lesquelles est cultivée *Arthrospira* sp. pourraient être à l'origine de cette variation dans la composition. En effet, une forte concentration en NaCl peut avoir un effet indirect sur la composition des EPS, en réduisant la disponibilité des nutriments tel que l'azote, ce qui contribue à l'augmentation du rapport C/N, favorisant ainsi l'incorporation du carbone dans la fraction exopolysaccharidique [87]. Cependant, même après des étapes de purification répétées, la plupart des auteurs considèrent que les protéines ne sont pas réductibles en dessous d'un certain seuil allant de 1 à 3% poids sec d'EPS, soulignant ainsi qu'il s'agit d'une véritable composante du polymère [8,87].

5.2.3.2. Propriétés calorimétriques des EPS et PS

Les propriétés calorimétriques en termes de température de transition vitreuse (Tg) et d'enthalpie de transition (ΔH) d'EPS dessalés et de PS sont évaluées et les résultats sont présentés dans le **tableau 5.19**. Le PS présente une valeur de Tg de 50,1°C, alors que la Tg des EPS est de 55,6 °C. Suyatma *et al.* [202] ont rapporté que la Tg est un critère important pour les utilisations des polymères dans les applications industrielles. De plus, les deux échantillons sont entièrement amorphes, vu qu'ils n'ont présenté aucun phénomène de fusion dans la région de température testée. Ce résultat est prévisible, particulièrement pour le PS, dû à la stabilité thermique caractéristique des

polysaccharides. En outre, l'enthalpie de transition associée à ces résultats est liée à l'interaction relative entre les composants dans les échantillons.

Les résultats obtenus indiquent que la déprotéinisation diminue la valeur de l'enthalpie (51,35 J/g), qui est plus élevée pour EPS (60,7 J/g), indiquant que le taux de renaturation est plus élevé que chez les EPS (contenant encore une fraction protéique) par rapport aux exopolysaccharides (**Tableau 5.19**). De ce fait, sur un plan thermique, la déprotéinisation permet d'obtenir un polymère (PS) plus résistant à la température et plus stable que les EPS natifs, rendant leur utilisation plus large.

5.2.3.3. Structure des EPS dessalés et des exopolysaccharides (PS)

La structure des EPS et PS a été étudiée par spectroscopie infrarouge dans une gamme de fréquences allant de 4000 à 500 cm^{-1} , et les profils IR-TF obtenus sont présentés dans la **figure 5.27**. Les résultats confirment la présence de polysaccharides dans les deux polymères [203]. Ainsi, pour les deux échantillons (EPS dessalés et PS), des bandes de transmittance sont observées dans la région de 3200 cm^{-1} et 2900 cm^{-1} , attribuées à l'élongation de C-H et d'O-H, [204], typique pour la fonction alkyle et hydroxyle des polysaccharides, respectivement. Une autre bande est enregistrée pour les EPS et les PS à 1250 cm^{-1} qui correspond à la vibration des groupes ester sulfate S=O [141]. De plus, la présence des unités de pyranose, le groupement C-O-C et les liaisons C-O-S (mettant en évidence des groupes de sulfate) sont en accord avec la bande d'absorption à 1050 cm^{-1} , 950 cm^{-1} et 780 cm^{-1} , respectivement. La déprotéinisation est également confirmée dans les PS. En effet, la bande caractéristique de l'amide I et II dans la région 1500 et 1600 cm^{-1} attribuée aux protéines observée dans le spectre IR-TF des EPS, est considérablement décalée dans les PS [204, 141].

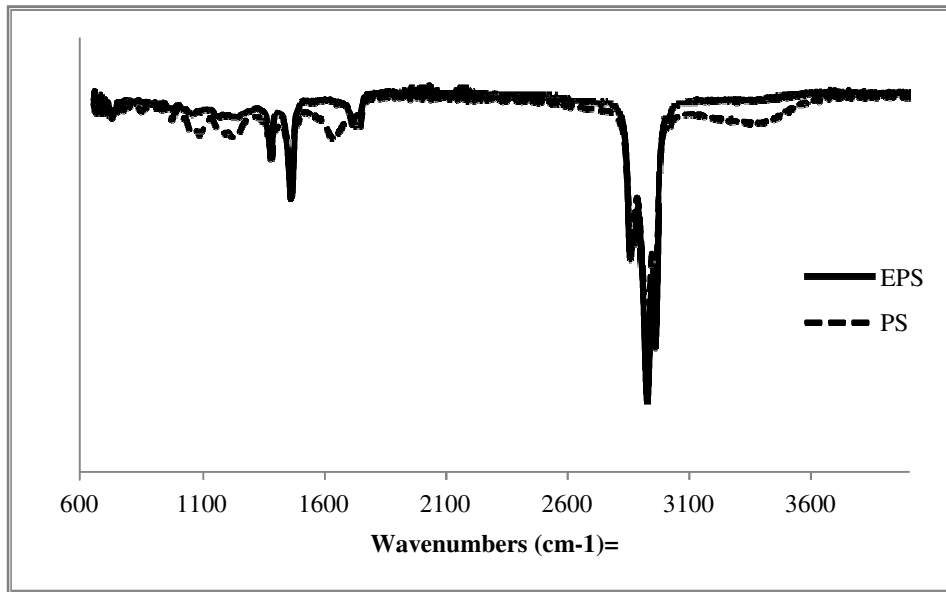


Figure 5.27: Spectres IR-TF des EPS et PS. Transmittance (%)

5.2.3.4. Rhéologie des PS d'*Arthrospira* sp.

Comportement visqueux

La **figure 5.28** montre les courbes d'écoulement des solutions de PS à diverses concentrations (5%, 2,5% et 1%). Ces courbes, exprimées en terme, de la variation de la viscosité apparente, η (Pa.s), en fonction de la vitesse de cisaillement, $\dot{\gamma}$ (s^{-1}), suggèrent que les solutions présentent un comportement rhéologique de type structural constitué de trois régions :

(i) **une première région newtonienne** caractérisée par une viscosité au taux de cisaillement nul, η_0 . Ce comportement «liquide» suppose que les liaisons inter macromoléculaires ne sont pas suffisantes pour former un réseau rigide responsable du comportement d'un gel pour lequel la viscosité tend vers l'infini, néanmoins, sont suffisamment élevées pour rehausser la viscosité, à des valeurs appartenant à la décade des centaines, particulièrement pour 5% d'EPS ;

(ii) Au-delà, d'une certaine valeur de cisaillement associée à un cisaillement critique, $\dot{\gamma}_c$, la viscosité apparente des solutions exhibe une diminution, générant ainsi un **comportement intermédiaire de type rhéofluidifiant**. Ce comportement peut être caractérisé par un paramètre spécifique, P , un exposant du modèle de Carreau qui mesure le degré de l'anomalie newtonienne ou l'écart du comportement newtonien. Lorsque $P = 0$, le fluide est newtonien. Dans cette région intermédiaire, les macromolécules du PS

subissent, sous l'effet des forces de cisaillement, une déstructuration et un déploiement partiels ;

(iii) Lorsque la vitesse de cisaillement est suffisamment élevée, la viscosité apparente semble se stabiliser autour d'une valeur, associée à une viscosité au taux de cisaillement infini, η_∞ . C'est la **deuxième région newtonienne**.

Ce type de comportement rhéologique, sous cisaillement variable, caractérisé par les quatre paramètres cités, η_0 , η_∞ , $\dot{\gamma}_c$ et P , peut être pris en charge soit par le modèle constitutif de Cross ou de Carreau. Dans notre cas, c'est le deuxième modèle qui a donné un meilleur ajustement avec des valeurs du coefficient de détermination proches de 1. Ces résultats sont accord avec ceux obtenus par Fillali Mouhim *et al.* [10]. Le modèle de Carreau a comme équation :

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{\left(1 - \left(\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_c\right)^2\right)^P}$$

Au terme de l'ajustement, les valeurs des quatre paramètres caractéristiques des trois solutions de PS ont été déterminées et regroupées dans le **tableau 5.20** ci-dessous.

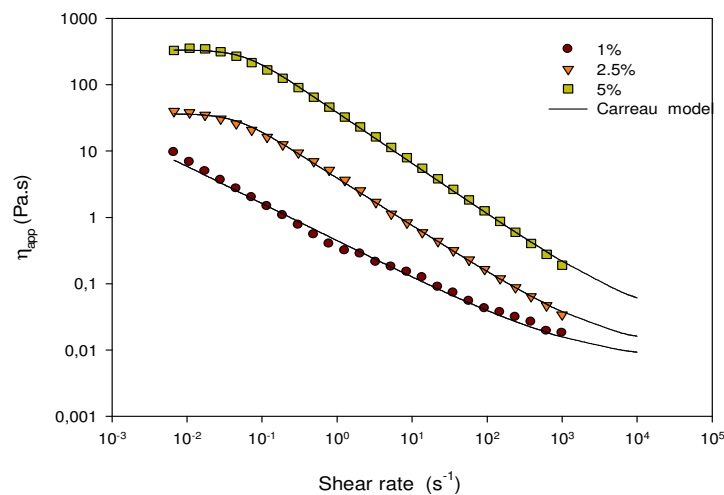


Figure 5.28: Variation de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement du PS en solution à diverses concentrations. $T=20^\circ\text{C}$.

Les paramètres η_0 et η_{ce} semblent augmenter avec la concentration des solutions de PS, ce qui dénote le caractère structural du système colloïdal et sa sensibilité à l'accroissement de la quantité mise en jeu. L'augmentation de η_0 montre qu'en absence de cisaillement (au repos), les interactions intermoléculaires renforcent de plus en plus la structure. L'élévation de η_{ce} explique l'augmentation de la résistance à l'écoulement, sous écoulement extrême, due à l'augmentation du nombre des macromolécules. Toutefois, la valeur de ce paramètre est nettement plus faible à celle de η_0 , du fait qu'en cisaillement infini, les macromolécules sont complètement dispersées et alignées suivant la direction du cisaillement et donc leur résistance à l'écoulement est plus faible. La vitesse de cisaillement critique, $\dot{\gamma}_c$, semble augmenter de même avec la concentration. Ceci explique que les liaisons moléculaires deviennent plus cohésives des cisaillements plus intenses pour les déstructurer.

Tableau 5.20 : Valeurs des paramètres caractéristiques du modèle de Carreau en fonction de la variation de la concentration des PS en solution

| | y_0 (Pa.s) | y_{ce} (Pa.s) | $\dot{\gamma}_c$ (s ⁻¹) | P |
|-------------|--------------|-----------------|-------------------------------------|--------|
| 1% | 9.56 | 0.0181 | 0.0076 | 0,3629 |
| 2.5% | 39.7 | 0.0341 | 0.017 | 0.3548 |
| 5% | 327 | 0.189 | 0.028 | 0.3816 |

Le dernier paramètre caractéristique de l'écoulement, à savoir, l'exposant de Carreau, P est insensible à la concentration, sa valeur oscille autour de 0,37, ce qui n'est pas très loin de la valeur 0, renforçant ainsi l'hypothèse du comportement Newtonien des solutions d'EPS aux très faibles cisaillements. En outre, la chute relative de la viscosité apparente, sous l'effet de l'écoulement (l'anomalie Newtonienne), ne dépend pas de la concentration. Toutes ces observations du comportement de cisaillement-éclaircissement ont conduit à conclure que le polysaccharide extracellulaire (PS) d'*Arthrospira* sp. exhibe un comportement non Newtonien ainsi qu'une caractéristique pseudoplastique extrêmement forte, en fonction des différentes concentrations étudiées, probablement due à leur propriété poly-électrolytique. Ces constatations quant à l'écoulement sont en accord avec ceux trouvés pour les EPS chez *Arthrospira platensis* [10], et chez différents polysaccharides bactériens extracellulaires tels que *Pseudomonas stutzeri* AS22 [205], *Rhizobium radiobacter* [106, 107] et pour les polysaccharides extraits de *Lepidium sativum* [208], où l'écoulement sous cisaillement était directement proportionnel à la concentration du polymère.

Par conséquent, cette propriété rhéologique d'écoulement sous cisaillement des PS chez *Arthrospira* sp. suggère plusieurs applications industrielles en tant qu'agent épaississant ou réducteur de viscosité, qui sont impliquées dans les processus alimentaires à différents taux de cisaillement comme le mélange, le coulage ou le pompage [209].

Comportement viscoélastique

Ce test décrit la variation des deux modules rhéologiques : le module de stockage (G') et le module de perte (G''). Les valeurs de G' fournissent des informations sur l'énergie stockée dans le biopolymère pendant la contrainte de déformation, tandis que G'' décrit son caractère visqueux. Avec l'augmentation de la contrainte, deux régions différentes ont été distinguées, à savoir la région viscoélastique linéaire (LVE) où G' et G'' sont presque constants, et la région non linéaire (NVE) dans laquelle G' et G'' tendent à diminuer.

Les propriétés viscoélastiques des PS ont été évaluées et les données sont présentées sur la **figure 5.29**. Les résultats démontrent la présence de la région viscoélastique linéaire (LVE), dans laquelle les deux modules étaient constants et le module de stockage G' est supérieur au module de perte G'' pour différentes concentrations de solutions de PS ($G' > G''$). Ainsi, les trois solutions présentent un comportement semblable à un gel viscoélastique, ce qui est cohérent avec le comportement liquide en régime continu. Ce comportement de type gel des PS augmente avec l'augmentation de sa concentration de 1% à 5% ; le gel devient plus rigide. De plus, et de manière intéressante, à forte concentration de PS, les deux modules deviennent parallèlement plus espacés. En effet, une augmentation de la concentration de PS permet de rigidifier le réseau de polymères grâce à un contact moléculaire amélioré, le rendant ainsi plus résistant à la déformation et à l'écoulement [210]. En outre, en oscillation, le temps de la sonde, qui est l'inverse de la fréquence, est relativement faible par rapport au temps de relaxation du fluide, indiquant que les PS d'*Arthrospira* sp. se comporte plus comme solide, vu son caractère élastique. Ce comportement est conforme avec ceux trouvés pour d'autres colloïdes tels que la gomme de la graine *Lepidium perfoliatum* [211] et le polysaccharide de *Auricularia auricular-judae* [112].

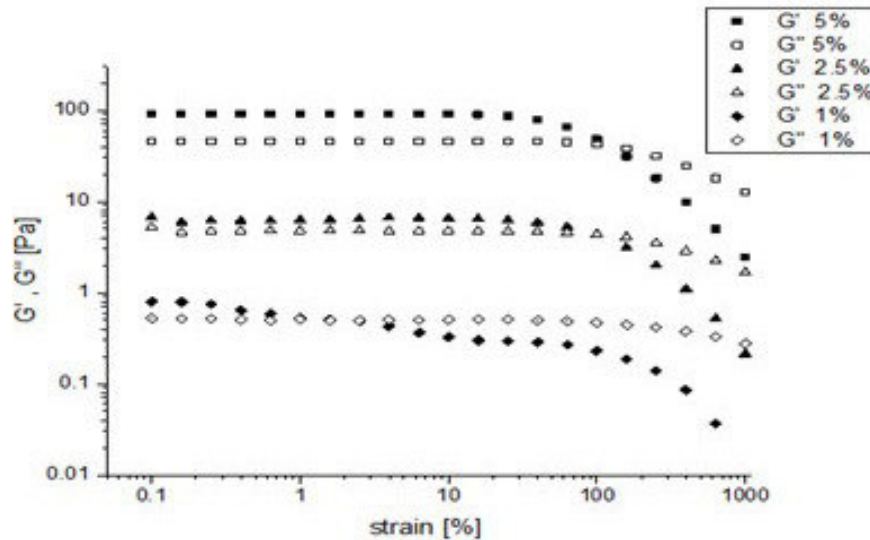


Figure 5.29: Variation des deux modules de conservation G' et de perte G'' du PS en solution en fonction de la déformation de cisaillement. $f=1$ Hz ; $T=20^{\circ}\text{C}$

Au-delà de la LVE, G' a commencé à décroître et a intercepté la courbe G'' au point de gel ($G' = G''$). Ce point a marqué la transition du solide viscoélastique au comportement liquide viscoélastique. Cependant, le point de transition était différent dans les échantillons testés et dépendait de la concentration des PS. À la plus haute concentration de PS (5%), ce point de transition a atteint une valeur de la déformation (γ) supérieure à 100%, alors qu'elle est atteinte à une contrainte beaucoup plus faible ($<1\%$) pour 1% PS. En effet, la nature hydrophile du PS d'*Arthrospira* sp. permet l'absorption de l'eau à travers les liaisons hydrogène formant une ceinture entre les molécules d'eau et les groupes carboxyle du polymère. Ainsi, à la plus faible concentration de PS (1%), la plus grande sensibilité de la solution à la contrainte imposée pourrait être probablement liée à une densité plus faible des zones de jonction dans le réseau de polymère, ayant une structure faible conduisant à sa décomposition facile par l'action de la tension. Inversement, à une forte concentration de PS (2,5 et 5%), plus de liaisons hydrogène sont formées entre les groupes carboxyliques libres du PS et les molécules d'eau.

Par conséquent, le réseau de polymère devient beaucoup plus fort avec des propriétés plus élastiques en raison de la densité de réticulation plus élevée [213]. Néanmoins, le comportement rhéologique de PS pourrait être également dû aux répulsions électrostatiques provoquées par les groupes chargés sur le squelette du polymère, conduisant à une structure très étendue. Ces molécules peuvent être alignées et associées par liaison hydrogène pour former un matériau faiblement structuré [214].

D'autre part, le point de transition est associé à un paramètre caractéristique appelé «seuil de stress τ_0 (Pa)» (**Tableau 5.21**). Lorsque la contrainte appliquée est inférieure à τ_0 , la solution se comporte comme un gel viscoélastique, tandis que les valeurs élevées de τ_0 (Pa) améliorent le son comportement pour passer à un liquide viscoélastique. Les valeurs de G' , G'' et τ_0 pour les trois concentrations de la solution PS sont indiquées dans le **tableau 5.21**. Il est clairement démontré que les trois paramètres enregistrent une forte augmentation, variant par décade, tandis que la concentration varie linéairement.

Tableau 5.21: Valeurs des modules de conservation G' et de perte G'' ainsi que de la contrainte seuil τ_0 , en fonction de la variation de la concentration du PS en solution

| Concentration | G' (Pa) | G'' (Pa) | τ_0 (Pa) |
|---------------|-----------|------------|---------------|
| 1% | 0,7 | 0,51 | 0,02 |
| 2,5% | 6,2 | 4,34 | 6,10 |
| 5% | 91,5 | 40,9 | 69,19 |

En accord avec l'étude de Miao *et al.* [215], ce comportement indique l'utilisation potentielle de PS comme agent texturant, affectant à la fois les systèmes à très faible consistance, tels que les produits laitiers ou liquides, et les produits à consistance très épaisse, tels que les produits pâteux et semi-solides.

Propriétés thermo-viscoélastiques

La **figure 5.30** montre la dépendance de G' et G'' à différentes concentrations de PS (1%, 2,5% et 5%) par un test de rampe de température pendant l'étape de chauffage et de refroidissement. Pour les concentrations étudiées, le module de stockage G' reste toujours plus élevé que le module de perte G'' , même si les solutions ont été soumises à des températures supérieures à 80 °C, suggérant que l'augmentation du mouvement brownien des macromolécules (agitation thermique), en raison de la température, n'affectent pas la structure du PS, préservant par conséquent le caractère de gel viscoélastique du PS.

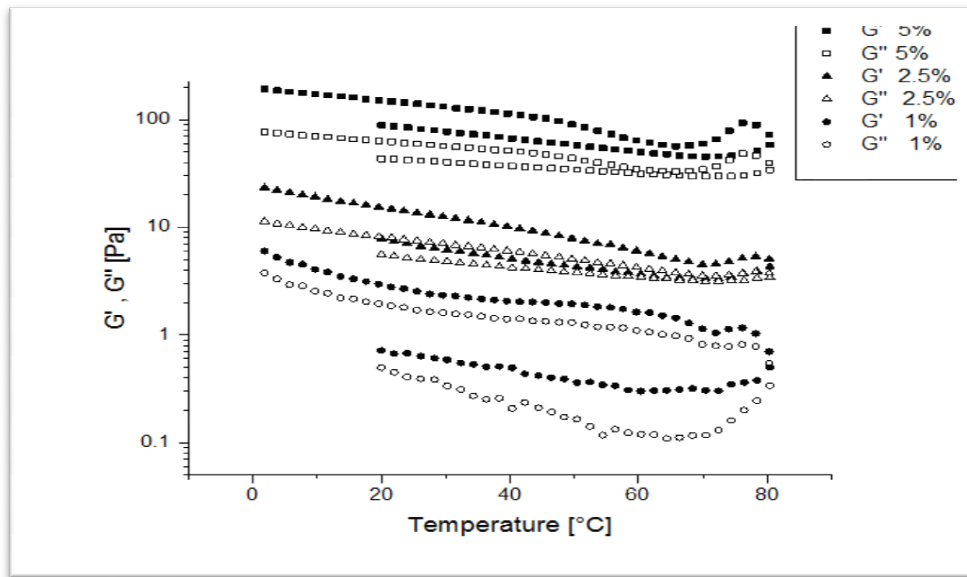


Figure 5.30: Dépendance à la température des deux modules de conservation G' et de perte G'' des solutions d'EPS. $f=1$ Hz ; $\gamma=1\%$.

De plus, les deux modules G' et G'' diminuent pendant le chauffage, alors qu'ils augmentent pendant le refroidissement ultérieur. Cette variation semble être plus importante pour la concentration de PS de 1%, qui a enregistré un gain d'une décade après le retour à température ambiante (chauffage $G'_{20\text{ °C}} = 0,5$ Pa et refroidissement $G'_{20\text{ °C}} = 2$ Pa). Cette observation peut suggérer que les macromolécules ont subi, après refroidissement, une nouvelle réorganisation ou agrégation des chaînes, générant une structure plus compacte en particulier pour les faibles concentrations de PS [216]. Ce comportement de PS est conforme à celui observé pour les exopolysaccharides bactériens EPSA22 [205]. Cependant, d'autres études ont rapporté que le traitement de la température n'a pas affecté la structure de polysaccharide extrait de *Rhizobium radiobacter* CAS [206], *Pseudomonas oleovorans* [217] et *Lepidium sativum* [207].

5.2.3.5. Activité antioxydante du PS d'*Arthrospira* sp.

L'activité antioxydante du PS a été évaluée selon deux tests, l'activité antiradicalaire (DPPH) et l'effet chélateur de fer. D'après la **figure 5.31**, il est ressorti que le PS possède une activité antioxydante dose dépendante. En effet, pour une concentration de PS allant de

150 à 1500 $\mu\text{g/mL}$, l'activité antiradicalaire et l'effet chélateur sont de $35,22 \pm 0,48\%$ à $85,69 \pm 0,89\%$ et de $10,01 \pm 0,4\%$ à $80,86 \pm 0,12\%$, respectivement.

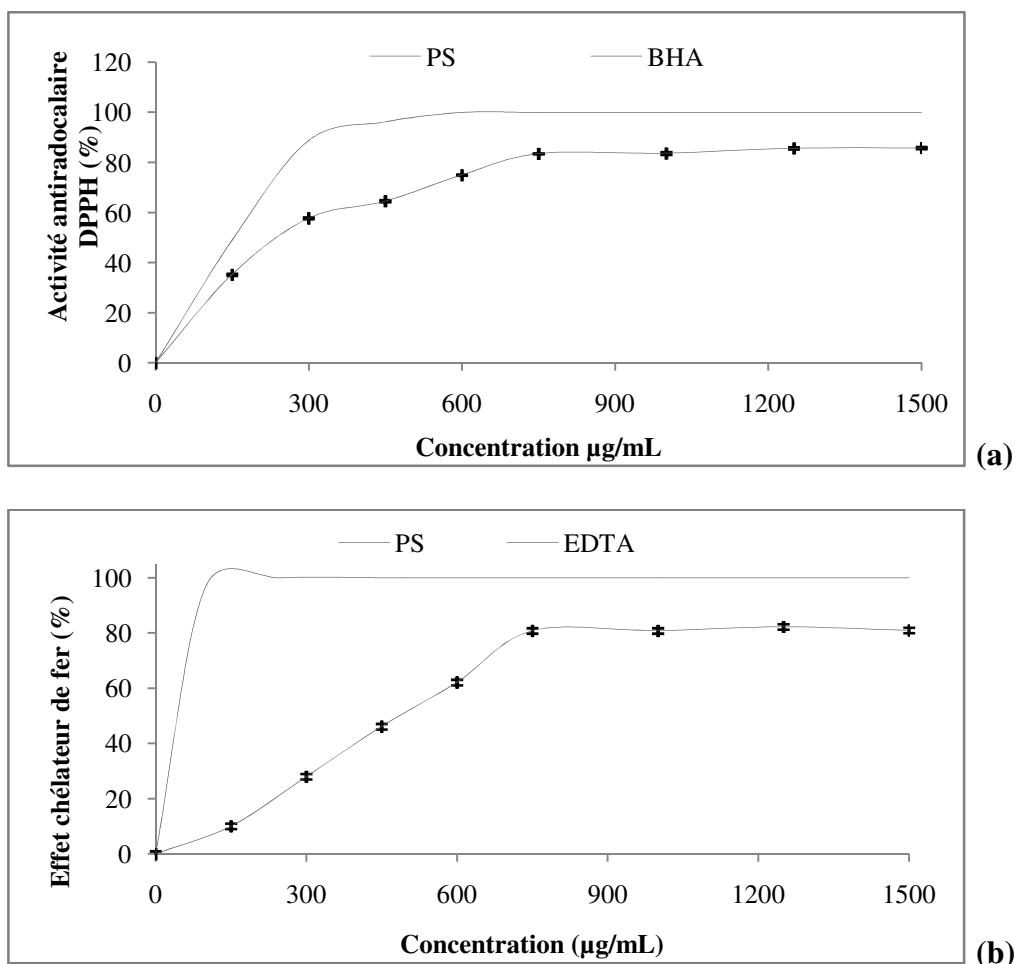


Figure 5.31: Activité antioxydante des PS. Activité antiradicalaire DPPH (a) ; Effet chélateur (b).

De plus, la concentration CI_{50} , permettant 50% d'activité, des deux tests a été déterminée et est estimée de 264 et 342 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Les faibles valeurs de la CI_{50} indiquent une activité importante. Néanmoins, le PS présente des activités antioxydantes inférieures à celles de du BHA et de l'EDTA. En accord avec ces résultats, l'activité antioxydante chez les exopolysaccharides a déjà été rapportée chez plusieurs espèces cyanobactérienne, notamment *Arthrospira* (Challouf *et al.*, 2011) [12], *Nostoc* [218] et *Grasiealla* [219].

Conclusion

Le présent travail démontre que la production d'EPS chez *Arthrospira* sp., cultivée selon le procédé de culture en deux phases, est satisfaisante. La supplémentation du milieu Zarrouk de référence uniquement en de fortes concentrations en NaCl, permet d'obtenir une production importante en EPS, rendant ainsi ce plan de culture d'intérêt économique. Sous ces conditions de culture, *Arthrospira* sp. produit des EPS riches en polysaccharide contenant une fraction protéique modérée et substituée par un faible taux de sulfate. Après déprotéinisation, l'extrait exopolysaccharidique (PS) possède une bonne stabilité thermique comparativement à son état natif (EPS). L'étude rhéologique a montré que le PS présente i) un comportement pseudoplastique et rhéofluidifiant sous cisaillement, ii) un comportement semblable à un gel, et iii) une résistance thermique intéressante du gel formé. Les résultats de cette étude suggèrent ainsi, le potentiel d'utilisation des PS comme agent texturant dans plusieurs applications alimentaires et nutritionnelles.

5.3. Performances de la phycocyanine d'*Arthrospira* sp. : Préparation, stabilité, bio-fonctionnalité et bio-activité.

Introduction

Les phycobiliprotéines sont parmi les métabolites à haute valeur ajoutée chez le genre *Arthrospira*. Ces dernières sont des polypeptides hydrosolubles porteurs de chromophores, facilement extraites de l'eau, à partir d'une biomasse fraîche ou humide, en tant que complexe protéine-pigment. La phycocyanine (PC) est la phycobiliprotéine majeure chez le genre *Arthrospira* qui, sous forme purifiée, a attiré l'intérêt en tant que pigment fluorescent pouvant être utilisé dans le domaine médicale et de l'imagerie. Sous sa forme brute, la phycocyanine est utilisée dans le domaine alimentaire ou cosmétique comme agent colorant. Bien que de nombreuses études aient été réalisées sur la forme pure de phycocyanine, peu d'études se sont intéressées à la phycocyanine brute, dite de grade alimentaire et dans une certaine mesure, de grade réactif. Considérant que la phycocyanine non purifiée est obtenue moyennant une technologie simple et surtout à faible coût, il est donc particulièrement intéressant d'évaluer son potentiel concret d'incorporation en industrie. Cependant, l'utilisation de l'extrait de phycocyanine en industrie risque d'être limitée, de par sa sensibilité aux traitements industriels, tels que la température, le pH ou l'utilisation d'agent oxydant, entraînant sa dénaturation et du coup la perte de toute valeur ajoutée dans le produit formulé. Bien que l'intérêt porté sur la thermostabilisation de la phycocyanine, par ajout de stabilisant tels que les polyols, les sucres, NaCl, ait fait l'objet de nombreuses études [220,221, 222], les mécanismes impliqués dans la dénaturation et la thermostabilisation ne sont pas encore bien compris et sont généralement abordés de manière empirique. C'est dans cette optique qu'évolue le présent chapitre, visant à étudier en détails la préparation d'extrait de phycocyanine (PC-E) à partir de la souche saharienne *Arthrospira* sp., ainsi qu'à mieux comprendre, les effets du pH, de la température, de la concentration initiale de l'extrait PC-E et des agents stabilisants sur la thermostabilité de la phycocyanine. De plus, les propriétés fonctionnelles et biologiques de l'extrait de phycocyanine ont été investiguées.

5.3.1. Extraction de la phycocyanine brute

Les rendements d'extraction de la phycocyanine en fonction de différents ratios de biomasse-tampon (m/v) selon la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium (65%) sont indiqués dans la **figure 5.32**. Les résultats révèlent que le ratio 1/30 (m/v) permet d'obtenir le rendement d'extraction maximal avoisinant les 16% par rapport au poids sec de biomasse.

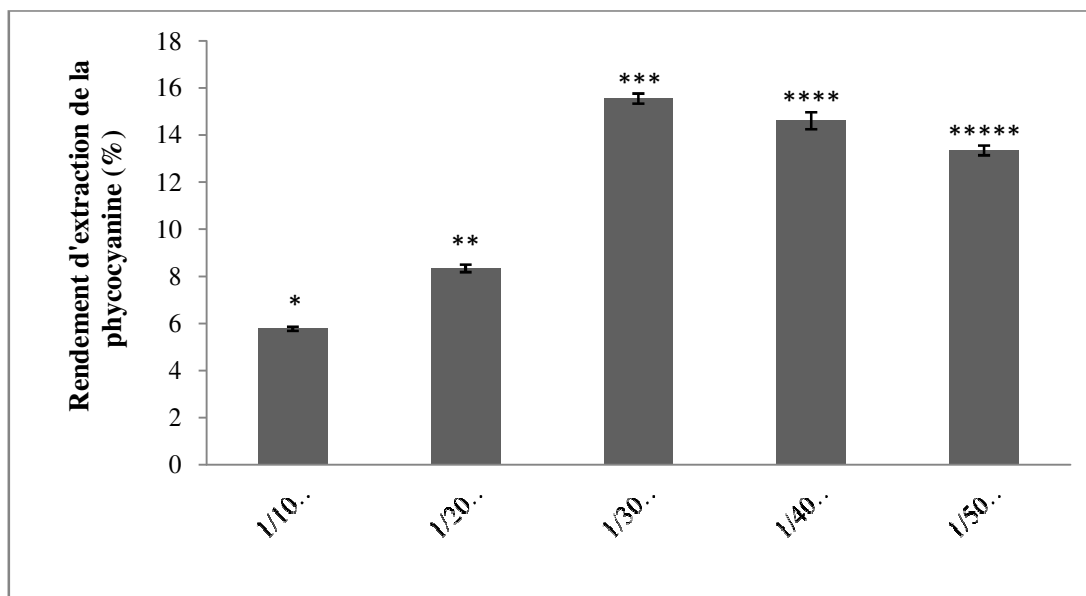


Figure 5.32 : Rendement d'extraction de la phycocyanine à différents ratios solide- liquide (m/v)

5.3.2. Caractérisation de l'extrait de phycocyanine

5.3.2.1. Composition biochimique

La biomasse d'*Arthrospira* sp., cultivée sous les conditions qui maximisent la production en phycobiliprotéines, ainsi que l'extrait de phycocyanine (PC-E) ont été caractérisés. Les résultats du **tableau 5.22** indiquent que la biomasse contient une teneur élevée en protéines et en phycocyanine (PC), estimée à $56,52 \pm 1,04\%$ et $14,84 \pm 0,68\%$ (par rapport à la biomasse sèche), respectivement. La teneur en cendres est de $15,34 \pm 0,86\%$ (biomasse sèche), tandis que les teneurs en sucres totaux et en lipides sont estimées à $9,85 \pm 1,44\%$ et $10,21 \pm 0,92\%$ (par rapport à la biomasse sèche), respectivement. Le PC-E comprend également une teneur élevée en

protéines égale à $79,7\pm 3,04\%$ (biomasse sèche) avec une faible teneur en cendres de $4,44\pm 1,131\%$, ce qui témoigne de l'efficacité de l'étape de dialyse.

La teneur en PC est de $23,61\pm 2,23\%$ du poids sec de l'extrait PC-E, et possède une pureté intéressante, de 1,24, comprise dans l'intervalle de pureté pour le grade réactif de la phycocyanine allant de 0,7 à 3,9 [223].

L'extrait de phycocyanine obtenu exhibe des teneurs en protéines et en phycocyanine relativement supérieures à celles rapportées par Martinez-palma *et al.* [224] où ces dernières sont de 69,2 et de 15% (Poids sec), respectivement.

Tableau 22: Composition physico-chimique d'Arthrospirasp.et de PC-E

| | <i>Arthrospira sp.*</i> | PC-E |
|---|-------------------------|------------|
| Humidité (%) | 8,0±1,43 | 12,9±1,15 |
| Cendres (%) | 15,34±0,86 | 4,44±1,131 |
| Protéines (%) | 56,52±1,04 | 79,7±3,04 |
| Sucre totaux (%) | 9,85±1,44 | 2,42±0,77 |
| Lipides (%) | 10,21±0,92 | 0,54± 0,06 |
| Phycocyanine (%) | 14,84±0,68 | 23,61±2,23 |
| Pureté (DO₆₂₀/DO₂₈₀) | - | 1,24 |

*biomasse cultivée sous les conditions qui maximisent la teneur en phycocyanine. Résultats exprimés par rapport à la matière fraîche.

5.3.2.2. Profile électrophorétique

Afin de déterminer l'entière distribution des protéines de PC-E, une électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium à deux concentrations, 7,5% et 12%, a été réalisée. La **figure 5.33** retrace le profil électrophorétique de PC-E.

Dans le premier gel à 7,5%, le profil électrophorétique indique une bande très intense entre 14-20 kDa (L3), correspondant probablement aux sous-unités α et β de la phycocyanine [162].

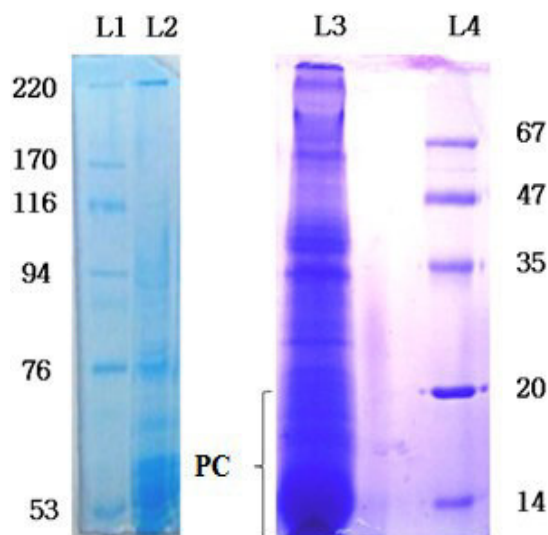


Figure 5.33: Profil électrophorétique de PC-E. (a) : Gel 12%. (b) : Gel 7,5%. L1 et L4 : Migration des marqueurs de taille (kDa). L2 et L3 : Migration de PC-E.

Outre la bande caractéristique des biliprotéines, d'autres bandes ont pu être observées (L2) sur le gel 12%, pouvant correspondre à des protéines intracellulaires ou celles de liaisons, responsables de l'assemblage et du maintien de la structure du phycobilisome [225]. L'intervalle de masse moléculaire de ces protéines est très large, et est réparti sur la totalité des gels. De plus, la présence de bandes inférieures à 220 kDa, notamment à 170 et 116 kDa, pourrait correspondre à l'arrangement hexamérique de la phycocyanine, formé probablement en raison des effets d'agrégation et/ou de dissociation subies au cours de l'extraction ou encore lors de la préparation de l'échantillon avant l'électrophorèse [145].

Le profil obtenu dans la présente étude corrobore avec celui obtenu pour la phycocyanine brute de *Spirulina platensis* [224].

5.3.2.3. Solubilité de PC-E d'*Arthrospira* sp.

Compte tenu de sa nature protéique, l'étude du comportement de solubilité de PC-E est d'une grande importance, en particulier dans les incorporations à caractère technofonctionnel (agent moussant, émulsifiant, etc.) et/ou biologiques. La **figure 5.34** montre le comportement de solubilité de PC-E dans une large gamme de valeurs de pH allant de 3,0 à 11,0. D'après les résultats, PC-E présente des valeurs de solubilité importantes (supérieures à 95%) à des pH supérieurs ou égaux à 6,0.

En effet, au pH neutre à alcalin, les charges sur la surface des protéines sont généralement arrangées de sorte qu'il y a des interactions plus attractives que répulsives entre les chaînes. Ces interactions potentiellement électrostatiques contribueront favorablement à la stabilité des protéines et donc à leur solubilité [226].

À l'inverse, il est prouvé que la solubilité minimale des protéines est souvent proche de leur pHi [227]. En effet, le point isoélectrique de la phycocyanine est compris entre 3,9 et 5,5 [162], ce qui pourrait expliquer la diminution significative de la solubilité de PC-E à pH 4,0 et 5,0 (entre environ 57 et 80%, respectivement). De plus, la solubilité du PC-E est réduite de manière continue à pH<4,0, atteignant une solubilité minimale de $37,81 \pm 2,33\%$ à pH 3,0. Ceci est probablement dû à la précipitation des autres chaînes polypeptidiques qui composent l'extrait.

Ce résultat converge avec celui rapporté par Vonshak [51], indiquant que les protéines chez le genre *Arthrospira* présentent une solubilité élevée dans l'eau à des valeurs de pH allant de 5,0 à pH 7,0. Ainsi, pour assurer la solubilité de PC-E, il convient de travailler à des valeurs de pH supérieures ou égales à 6,0.

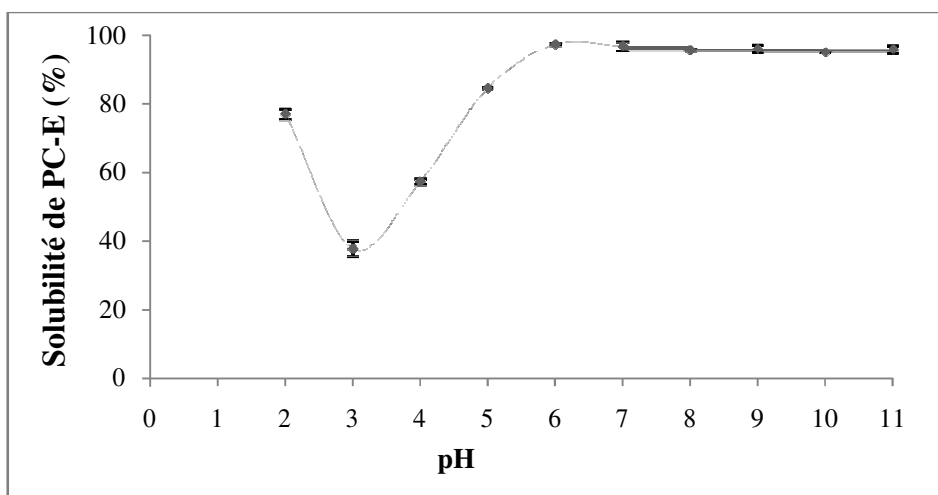


Figure 5.34 : Solubilité de PC-E en fonction du pH

5.3.2.4. Propriétés spectrales UV-visible de la phycocyanine PC en fonction du pH

Afin de consolider les résultats précédents quant à la solubilité de PC-E en fonction du pH, les propriétés spectrales dans le domaine de l'UV-visible (200 à 800 nm) de la fraction phycocyanine contenue dans PC-E est étudiée à des valeurs ponctuelles de pH (3,0, 5,0, 6,0, et 7,0 et 9,0). La **figure 5.35** montre qu'une absorption maximale est enregistrée à 620 nm, attribuée à la phycocyanine [162]. À cette longueur d'onde, l'absorbance de la phycocyanine est élevée pour des valeurs de pH de 5,0 à 7,0, avec un maximum à pH 6,0. Ce résultat pourrait être expliqué par la prédominance de la forme hexamérique de la phycocyanine à pH 6,0, responsable de son absorption spectrale maximale et la qualifiant ainsi de stable [145].

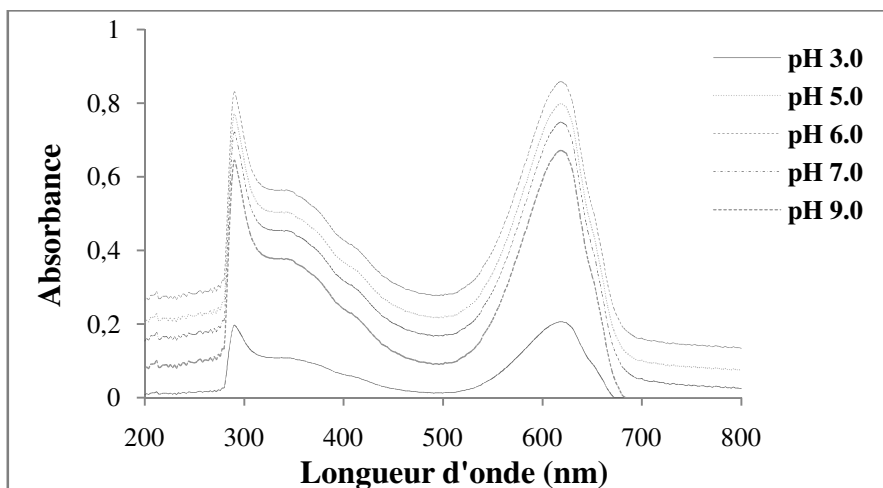


Figure 5.35 : Spectres d'absorption UV-visible de PC-E à différentes valeurs de pH de 3,0, 5,0, 6,0, 7,0 et 9,0.

Rastogi *et al.* [228] ont décrit que les extraits de PBPs de *Phormidium rubidium* A09DM sont au maximum de leur stabilité à pH compris entre 6,0 et 7,0. À l'inverse, les propriétés spectrales de la phycocyanine ont été significativement affectées sous des conditions d'acidité (pH 3,0) et d'alcalinité (pH 9,0) fortes. La diminution de son absorbance à 620 nm à pH acide pourrait être due à la faible solubilité de PC-E, comme précédemment indiqué. Cependant, dans des conditions alcalines, cette réduction pourrait être attribuée à l'état électronique du chromophore et de l'apoprotéine qui affecte directement la conformation de la phycocyanine conduisant à son agrégation [229].

5.3.2.5. Propriétés fonctionnelles de PC-E

- **Propriétés émulsifiantes**

Les protéines sont connues pour être des agents émulsifiants efficaces et sont couramment utilisées dans les émulsions alimentaires commerciales. La formation et la stabilité des émulsions à base de protéines sont principalement liées à l'activité de surface des protéines aux interfaces fluide/fluide [230].

L'IAE et l'ISE de PC-E en fonction de sa concentration ont été étudiées et les résultats sont présentés dans le **tableau 5.23**. En effet, les valeurs de IAE et ISE de PC-E augmentent significativement lorsque la concentration augmente, atteignant des valeurs maximales de $19,25 \pm 0,48$ m²/g et $60,4 \pm 4,1$ min, respectivement, à 1% de PC-E. Cependant, IAE et ISE diminuent de manière significative à une concentration de PC-E de 1,5% ($p < 0,05$).

Ces résultats sont probablement dus au fait qu'à des concentrations en protéines inférieures à 1,5%, l'adsorption de PC-E à l'interface huile/eau serait contrôlée par diffusion. L'interaction protéine*protéine est ainsi optimale, entraînant une concentration protéique plus élevée à l'interface et des coefficients de diffusion de protéines plus importants dans la phase aqueuse [231], ce qui conduit à la formation de nouvelles gouttelettes d'huile stabilisées par des protéines en multicouches autour d'elles [232,233].

En revanche, à des concentrations en protéines plus élevées ($> 1\%$), la barrière d'énergie d'activation bloque l'adsorption ou la migration des protéines d'une manière dépendante de la diffusion. Ces constatations concernant IAE et ISE sont en accord avec ceux révélés pour des protéines de pomme de terre et de gélatine où les valeurs d'IAE et ISE chutent à une certaine concentration de protéines [234,235].

De plus, les valeurs d'IAE et d'ISE de PC-E se sont révélées plus élevées que celles rapportées pour les phycobiliprotéines de grade alimentaire extraites à partir de la macroalgue *Porphyra haitanensis* à pH 6,0 [220].

Tableau 5.23: Propriétés émulsifiantes et moussantes de PC-E à différentes concentrations.

| % | IAE ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) | ISE _{10min} (min) | CM (%) | SM _{30 min} (%) | SM _{60 min} (%) |
|--------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0,025 | 2,34±0,31 ^a | 2,61±0,57 ^a | 39,5±0,24 ^a | 20,22±0,58 ^a | 20±0,47 ^a |
| 0,05 | 2,36±0,24 ^a | 3,12±1,12 ^a | 54±0,78 ^b | 40,3±0,42 ^b | 38,15±0,36 ^b |
| 0,5 | 4,01±0,22 ^b | 3,31±0,1 ^a | 102±2,32 ^c | 100±2,56 ^c | 78,3±1,22 ^c |
| 0,75 | 10,47±0,3 ^c | 17,49±0,76 ^b | 107±1,6 ^d | 105,2±0,9 ^d | 80,4±2,33 ^{cd} |
| 1 | 19,25±0,48 ^d | 60±4,02 ^d | 124±3,21 ^e | 120,3±2,11 ^e | 83,25±1,98 ^d |
| 1,5 | 15,01±0,39 ^e | 50,51±4,58 ^c | 158,2±4,36 ^f | 118±1,31 ^e | 101±3,23 ^e |

IAE : Indice d'activité émulsifiante ; ISE : indice de stabilité émulsifiante ; CM : Capacité moussante ; SM : stabilité moussante. Différentes lettres dans la même colonne indiquent une différence significative.

- **Propriétés moussantes**

La capacité moussante d'une protéine est définie comme étant la quantité de surface interfaciale pouvant être créée par la protéine pendant l'action de création de mousse, tandis que la stabilité de la mousse est la capacité de la protéine à stabiliser les bulles d'air contre le stress gravitationnel. Comme indiqué dans le **tableau 5.23**, PC-E montre des valeurs de CM et SM très intéressantes qui augmentent significativement avec l'augmentation de sa concentration (0,025 à 1,5%). En fait, CM atteint une valeur de 158,2±4,36% et SM de 118±1,31% et 101±3,23% après 30 et 60 min, respectivement, à une concentration de 1.5% de PC-E. De ce fait, PC-E est capable de diffuser rapidement vers l'interface air-eau pour encapsuler les bulles d'air, améliorant ainsi la formation de mousse et constituant des films cohésifs air/eau avec des propriétés mécaniques satisfaisantes pour stabiliser la mousse formée [236].

Cette propriété moussante pourrait être attribuée à la plus grande teneur en molécules de haute masse moléculaire de PC-E. Ces résultats sont en accord avec la CM de la poudre de cyanophycées [237] et le concentré de protéines d'*Arthrospira platensis* [238], possédant une haute capacité moussante.

5.3.2.6. Activités biologiques de PC-E

5.3.2.6.1. Activité antioxydante in vitro

L'activité antioxydante d'une molécule dépend de multiples mécanismes, en fonction du système réactionnel. Ainsi, différentes méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de PC-E et les résultats sont indiqués sur la **figure 5.36**.

• ***Inhibition du blanchiment de β -carotène***

L'évaluation de l'activité antioxydante de PC-E par le test de l'inhibition du blanchiment de β -carotène est couramment utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Dans le système à base d'émulsion huile-eau, le β -carotène subit un blanchiment rapide, générant des radicaux peroxy libres. Ainsi, en présence d'un agent potentiellement antioxydant, il y a ralentissement du degré de blanchiment du β -carotène en neutralisant les radicaux libres du linoléate ainsi que d'autres radicaux libres formés au cours de la réaction [239]. D'après les résultats de la **figure 5.36a**, PC-E présente une capacité modérée à inhiber l'oxydation du β -carotène de 63% à une concentration de 5 mg/mL, suggérant que PC-E peut être utilisé comme potentiel piègeur de radicaux libres dans les systèmes de type émulsion. Toutefois, cette valeur demeure inférieure à celle du BHA à la même concentration (98%).

• ***Pouvoir réducteur***

Le pouvoir réducteur d'une molécule est souvent utilisé pour évaluer le potentiel des antioxydants naturels à donner des électrons [151]. Dans ce test, la réduction de Fe^{3+} (complexe de cyanure ferrique) en forme ferreuse Fe^{2+} indique la présence de capacités réductrices dans les échantillons testés. Il en ressort que le pouvoir réducteur de PC-E est dépendant de la dose (**Figure 5.36b**), avec une absorbance de $1,46 \pm 0,05$ (DO_{700}) à 5 mg/mL. Bien que cette valeur du pouvoir réducteur demeure inférieure à celle du BHA à la même concentration ($\text{DO}_{700}=3$), PC-E peut être considéré comme un bon donneur d'électrons. De même, Zhou *et al.*, [240] ont prouvé que les phycobiliprotéines possèdent la capacité d'offrir des électrons pour former une paire d'électrons et ainsi réduire le Fe^{3+} . De plus, Madhyastha *et al.* [241] ont rapporté que la phycocyanine purifiée à partir de la biomasse de *Spirulina fusiformis* cultivée sous une lumière bleue est dotée d'un pouvoir réducteur intéressant ($\text{DO}_{700}=0,38$) à une concentration de 50 μM .

- **Effet chélateur de fer**

Il est largement connu que les fers métalliques sont des promoteurs radicalaires, et leur chélation peut efficacement arrêter les réactions d'oxydation. Les résultats illustrés sur la **figure 5.36c** montrent clairement une corrélation entre l'effet chélateur de fer et les concentrations de PC-E. À 5mg/mL, l'effet chélateur atteint une valeur de $78 \pm 1,2\%$, ce qui est en accord avec les résultats quant aux phycobiliprotéines de l'algue *Porphyra haitanensis* présentant un effet chélateur de fer de 80% à une concentration de 1mg/mL [220].

- **Activité antiradicalaire**

La **figure 5.36d** montre que le PC-E possède la capacité de piéger le radical DPPH d'une manière dose dépendante. En effet, à une concentration de 4 mg/mL, une activité de 100% est atteinte. Ce résultat est en accord avec l'activité de piégeage des radicaux DPPH obtenue à partir de phycobiliprotéines extraites de *Porphyra haitanensis* [220]. Les groupes amines présents dans les biliprotéines réagissent avec les radicaux libres pour les convertir en molécules plus stables, et par la suite, terminer la réaction en chaîne radicalaire en faisant don de protons [242].

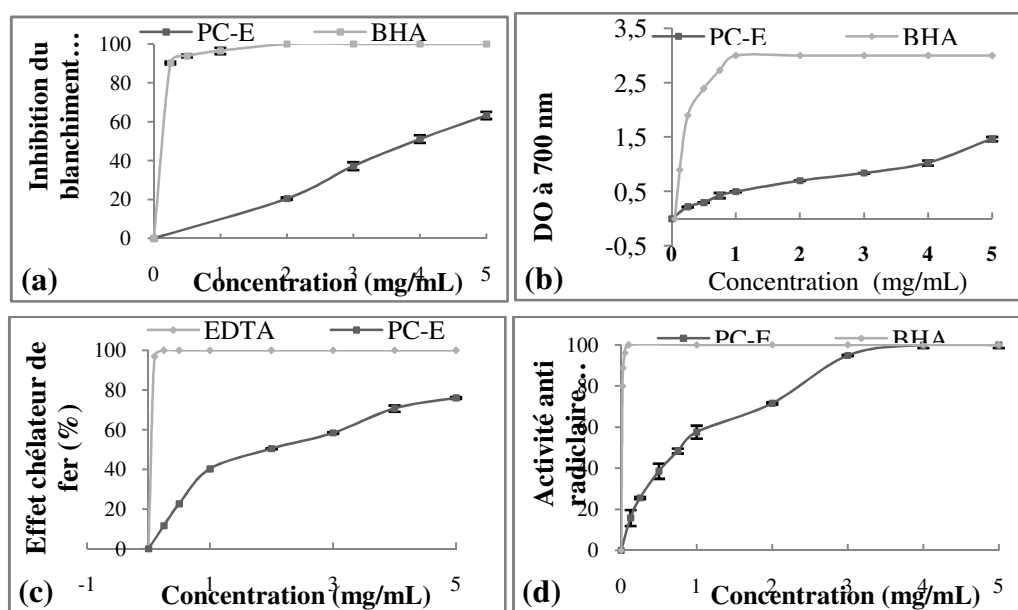


Figure 5.36: Activités antioxydantes de PC-E en fonction de sa concentration.

5.5.2.6.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de PC-E a été évaluée contre des bactéries à Gram (+) et à Gram (-) en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, selon la méthode des puits. Le **tableau 5.24** présente les diamètres des zones d'inhibition de PC-E à 5 et 10 mg/mL. Les résultats révèlent que PC-E est efficace contre presque toutes les souches bactériennes testées.

Les diamètres des zones d'inhibition, dans la plage moyenne de 8,0 à 32,5 mm et de 8,0 à 41 mm, sont atteints à 5 et 10 mg/mL de PC-E, respectivement. L'activité la plus élevée de PC-E à 10 mg/mL est détectée contre *M. luteus* (41±0,6 mm) suivie par *E. coli* (22,75±0,7 mm) et *S. aureus* (15,75±0,4 mm). Néanmoins, une faible activité antibactérienne a été détectée contre *L. monocytogenes* et *S. typhimurium* avec une zone d'inhibition d'environ 8,75±0,7 et 9,75±0,4 mm, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sarada *et al* [243] qui ont montré que la PC purifiée à partir de *Spirulina platensis* présentait une activité antibactérienne élevée contre *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Tableau 5.24: Activité antibactérienne de PC-E a 5 et 10 mg/mL

| | 5 mg/mL | 10 mg/mL |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>S. typhimurium</i> | 8,75±0,70 ^a | 9,75±0,40 ^a |
| <i>L. monocytogenes</i> | 8,00±0,60 ^a | 8,00±0,50 ^a |
| <i>S. aureus</i> | 15,75±0,40 ^a | 17,50±0,70 ^b |
| <i>M. luteus</i> | 32,50±0,70 ^a | 41,00±0,60 ^b |
| <i>E. coli</i> | 20,50±0,70 ^a | 22,75±0,70 ^b |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 11,75±0,40 ^a | 14,50±0,70 ^b |

Différentes lettres dans une même ligne indiquent une différence significative.

5.3.3. Thermostabilité de la phycocyanine (PC) d'*Arthrospira* sp.

5.3.3.1. Effet de la température et du temps d'incubation

La thermostabilité de la phycocyanine est examinée par incubation de solutions de PC-E à différentes concentrations de 0,5, 2,75 et 5 mg/mL pendant 75 min à différentes températures allant de 30 à 90 °C. La **figure 5.37** présente la thermostabilité de PC exprimée en concentration relative (CR) restante en fonction de la température. Les résultats obtenus révèlent que la phycocyanine (PC) est hautement stable à des températures comprises entre 30 et 50 °C. À 50 °C, les valeurs de CR_{PC} des solutions de PC-E à 0,5, 2,75 et 5 mg/mL sont de $93,88 \pm 1,15\%$, $97,25 \pm 0,91\%$ et $98,09 \pm 1,07\%$, respectivement. Cependant, au-dessus de 50 °C, la CR_{PC} a diminué de façon drastique ($p < 0,05$). En effet, à 60 °C, les valeurs CR_{PC} ont diminué d'environ 50% pour des concentrations initiales de PC-E de 0,5 et 2,75 mg/mL et atteignent des valeurs de $6,23 \pm 1,51\%$ et $10,08 \pm 1,73\%$, respectivement, à 90 °C. En revanche, à 5 mg/mL, CR_{PC} atteint la valeur de 50% à 70 °C et une valeur de $22,11 \pm 1,85\%$ à 90 °C. Ce gain de 10 °C dans la température critique, réduisant 50% de PC quand l'extrait est utilisé à raison de 5 mg/mL, pourrait être dû au renforcement des interactions protéine-protéine dans la solution, responsable de la stabilité thermique cette biliprotéine [244]

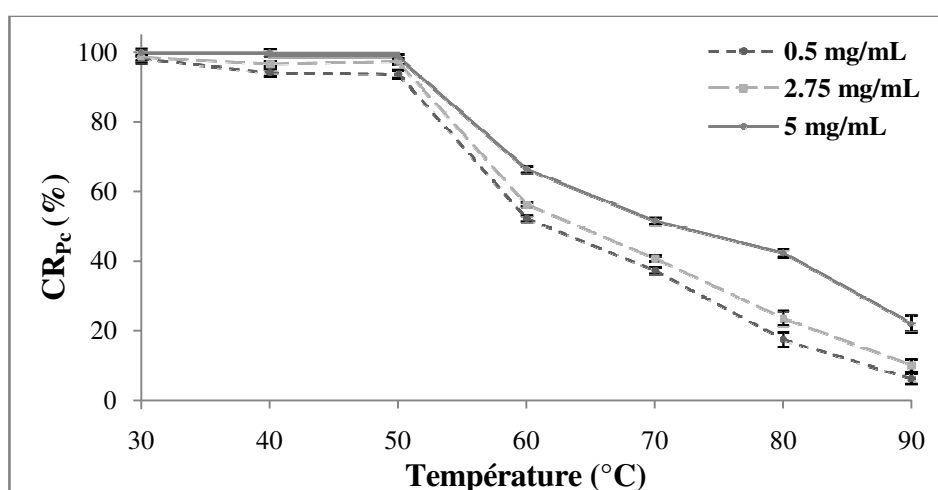


Figure 5.37: Thermostabilité de la phycocyanine contenue dans le PC-E incubée à différentes températures pendant 75 min.

Dans une seconde expérience, l'effet du temps d'incubation de PC-E (0,5, 2,75 et 5 mg/mL, pH 6,0) à 60 °C sur la phycocyanine a été examinée (**figure 5.38**). Les résultats révèlent qu'après un chauffage à 60 °C pendant 30 min, les valeurs de CR_{PC} ont diminué de façon accrue allant de 100% (T=0) à $62,25\pm 0,88$ ($p < 0,05$) et à $69,14\pm 0,91$ pour des concentrations initiales en PC-E de 0,5 et 2,75 mg/mL, respectivement. Ces valeurs de RC_{PC} atteignent 50% après 75 min de traitement. En revanche, à 5 mg mL⁻¹ de PC-E, la valeur de RC_{PC} est estimée à $75,08\pm 0,67\%$ après 30 min ($p < 0,05$) et atteint une valeur de $63,81\pm 0,72$ après 120 min de chauffage ($p < 0,05$).

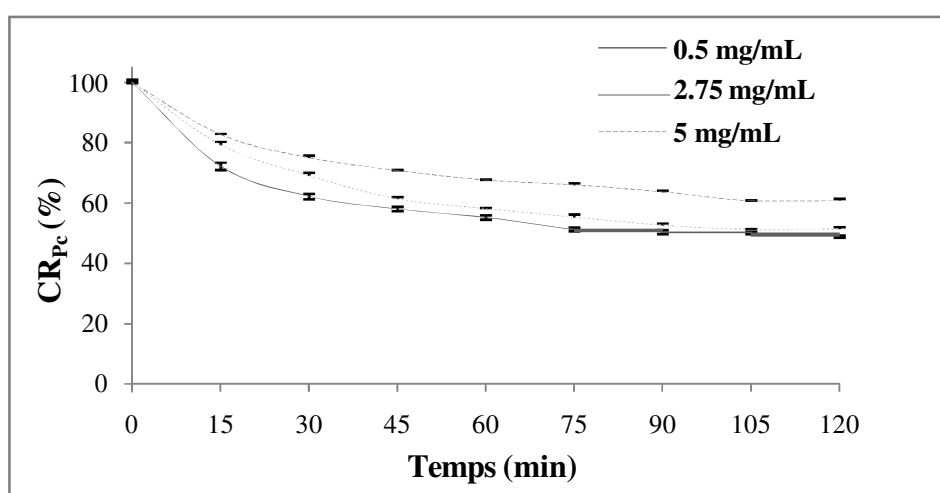


Figure 5.38: Thermostabilité de la phycocyanine contenue dans le PC-E, incubée pendant 120 min à 60 °C

De nombreuses études, effectuées sur la phycocyanine brute à différentes concentrations initiales allant de 0,4 et 1 mg/mL, ont rapporté que la phycocyanine subit une décoloration rapide entre 60 à 65 °C pendant 60 et 30 min, respectivement [245, 145]. En effet, la différence détectée par rapport aux résultats du présent travail pourrait s'expliquer par le biotope, les conditions de culture de la souche, les techniques d'extraction de la phycocyanine ainsi que les conditions expérimentales adoptées incluant la concentration initiale en extrait brut pouvant moduler significativement le comportement de thermostabilité des biliprotéines [228, 246].

5.3.3.2. Effets des stabilisants sur la thermostabilité de la phycocyanine

Plusieurs travaux ont rapporté que la thermostabilisation de la phycocyanine pourrait être améliorée par la modification de son environnement chimique en ajoutant divers additif [221]. Dans cette étude, l'influence de trois agents stabilisants ajoutés avec un rapport de 1:4 (m/m) sur la sensibilité thermique de la phycocyanine contenue dans PC-E a été examinée après une incubation de 75 min à 60 °C. La **figure 5.39** affiche la thermostabilité de PC exprimée en concentration relative (CR) restante en fonction du type de l'agent stabilisant.

Dans un premier temps, les résultats montrent que les trois stabilisants testés, et en particulier le sorbitol et le PEG-400, améliorent significativement la stabilité de la phycocyanine lorsque PC-E est utilisée à raison de 0,5 mg/mL. Les valeurs de CR_{PC} en présence du PEG-4000, sorbitol et de sucrose sont respectivement de $76,17 \pm 0,9\%$, $85,71 \pm 0,84\%$, et $57,14 \pm 0,71$ ($p < 0,05$), alors qu'en absence d'additifs, la valeur CR_{PC} est d'environ $52,27 \pm 0,87\%$ ($p < 0,05$). Ces effets protecteurs pourraient s'expliquer par le renforcement des interactions hydrophobes à l'intérieur des molécules et par l'action indirecte des polyols sur la structure de l'eau.

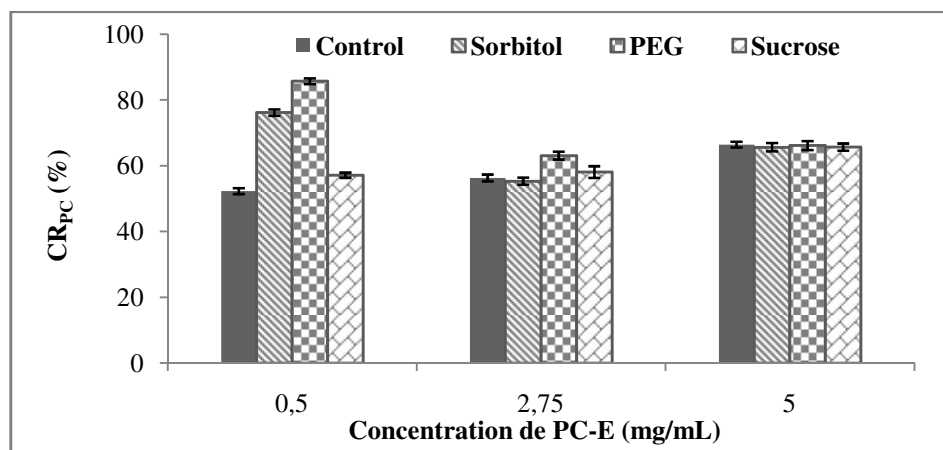


Figure 5.39: Effets du sorbitol, du PEG-4000 et du sucrose (1: 4 m/m) sur la thermostabilité de la phycocyanine à différentes concentrations initiales de PC-E incubé pendant 75 min à 60 °C.

Dans un second temps, à une concentration 2,75mg/mL de PC-E, seul le PEG- 4000 s'avère efficace pour améliorer significativement la thermostabilisation de la phycocyanine ($p < 0,05$). Toutefois, cette amélioration demeure modeste avec une valeur de CR_{PC} de $63,11 \pm 1,21\%$ contre une CR_{PC} du témoin de $56,31 \pm 1,03\%$. À 5 mg/mL de PC-E, aucune

amélioration de la thermostabilité de la phycocyanine n'est observée après l'ajout de stabilisants ($p > 0,05$). Ainsi, étant donnée la thermostabilité de la phycocyanine s'avérant efficace en présence de PEG-4000 et du sorbitol, l'influence des concentrations croissantes du PEG-4000 et du sorbitol a été examinée (**Figure 5.40 et 5.41**). Les résultats montrent que les valeurs CR_{PC} augmentent avec l'augmentation de la concentration de PEG-4000 (**Figure 5.40**), atteignent un maximum puis tendent à chuter. Les valeurs CR_{PC} les plus élevées atteintes sont de $85,7 \pm 0,8\%$, $86,73 \pm 1,6\%$ et $84,01 \pm 0,73\%$, pour des ratios respectifs de 1:4, 1:18, et 1:36 (m/m) lorsque PC-E est utilisé à raison de 0,5, 2,75, et 5 mg/mL, respectivement.

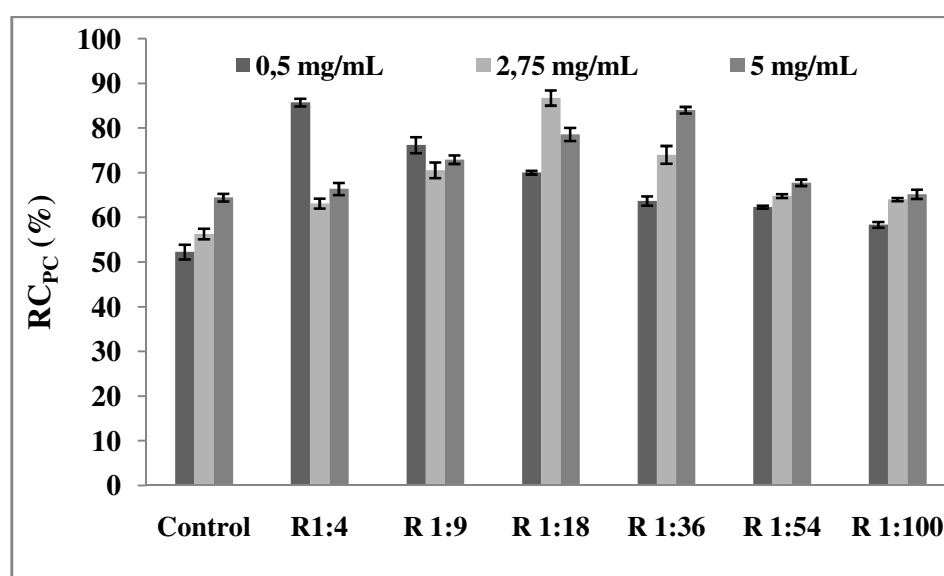


Figure 5.40 : Effets de la concentration du PEG-4000 sur la thermostabilité de la phycocyanine à différentes concentrations initiales de PC-E incubée à 60 °C pendant 75 min.

De même, l'effet du sorbitol à diverses concentrations sur la thermostabilité de la phycocyanine lorsque PC-E est à une concentration de 2,75 mg/mL est investiguée. Les résultats de la **figure 5.41** montrent que la stabilité de la phycocyanine dépend de la concentration de sorbitol et que la valeur CR_{PC} maximale de $87,24 \pm 0,94\%$ est obtenue pour un ratio de 1:54 (m/m). Il est admis que des concentrations faibles de stabilisant et de polyols particulièrement, peuvent ne pas avoir d'effet significatif sur la thermostabilité des protéines, et une concentration de 0,3 M a été suggérée comme étant minimale pour obtenir une stabilisation significative [247]. En effet, pour certaines protéines, des rapports d'environ 360 à 500 moles de stabilisant pour 1 mole de protéines confèrent la meilleure

thermostabilité [248]. En accord avec le présent travail, plusieurs études ont rapporté l'effet de certains stabilisants sur la phycocyanine. Dans leur travail, Antelo *et al.*, [144] ont indiqué que l'addition de sorbitol dans la gamme de 10-50% (m/v), pour un traitement à 60 °C pendant 30 min, augmente les valeurs de demi-vie de l'extrait de phycocyanine brut de *Spirulina platensis*. De plus, le fructose ajouté à de forte concentration (62% m/v) augmente la stabilité de la phycocyanine extraite à partir de *Spirulina platensis* [249]. Dans une autre étude, Chaiklahan *et al.* [145] ont rapporté une valeur de concentration relative de phycocyanine d'environ 47% après chauffage pendant 15 min à 60 °C ; l'ajout de glucose ou de saccharose de 20-40% a permis d'augmenté ces valeurs de 62- 70%, respectivement. En se référant à la littérature, lorsqu'un stabilisant est ajouté à un ratio approprié aux protéines, son action passe à travers plusieurs mécanismes, notamment, l'augmentation de la tension superficielle de l'eau, formation de nouvelles liaisons hydrogène ou promotion de mécanismes dynamiques vitreux dans le système protéines-stabilisant, responsables de la stabilisation des protéines [250].

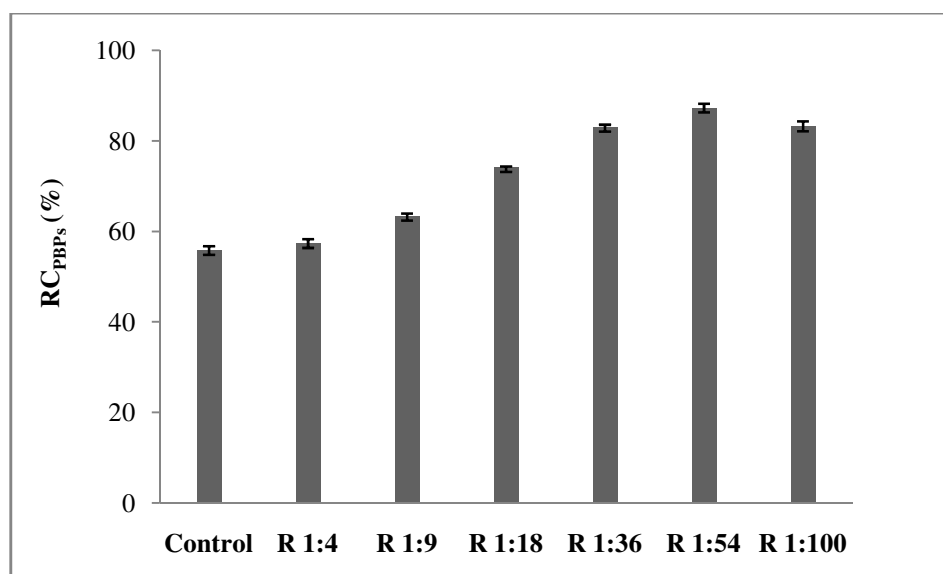


Figure 5.41 : Effet du sorbitol à différents rapports sur la thermostabilité de la phycocyanine contenu dans PC-E extrait brut (pH 6,0) à 2,75 mg mL⁻¹, mis à incuber à 60 °C pendant 75 min.

• *Considérations structurales*

Afin d'examiner la thermostabilisation de la phycocyanine, contenue dans l'extrait PC-E, d'un point de vue structural, une analyse spectroscopique infrarouge est réalisée. La **figure 5.42** affiche les spectres IR-TF de PC-E natif, PC-E dénaturé à 50%, PC-E- PEG-4000 à un ratio de 1:18 (m/m) et PC-E-sorbitol à un ratio de 1:54 (m/m) avant et après chauffage à 60 °C pendant 75 min.

Le spectre IR-TF de PC-E natif révèle une large bande entre 3600 et 3000 cm^{-1} , attribuée à l'élongation O-H chevauchant des vibrations d'élongation N-H, liées à l'amide A à 3300 cm^{-1} . De plus, les trois principales bandes caractéristiques des protéines se sont révélées à 1652, 1541 et 1450 cm^{-1} et sont associées à l'amide I (élongation C=O), amide II (liaison NH) et Amide III (liaison NH et élongation CN), respectivement (Barth, 2007). Deux autres bandes sont identifiées à 2914-2840 et 1400- 1000 cm^{-1} , et sont probablement associées à l'élongation C-H symétrique et asymétrique, au groupement C=C, C-O-C et aux vibrations C-O-H, respectivement, pouvant probablement être attribuées au chromophore de la PC. Également, un pic est observé à 717 cm^{-1} , attribuée à la liaison S-CH correspondant à la liaison thioéther rapportée comme étant un agent de liaison entre le chromophore et le résidu de cystéine de la biliprotéine [229]. Ce spectre confirme donc qu'il s'agit bien d'une protéine- chromophore. Il est à noter que les études IR-TF sur les biliprotéines, la phycocyanine en particulier, sont limitées en raison de sa structure complexe. Néanmoins, le spectre obtenu dans la présente étude corrobore la structure de la phycocyanine rapportée par Bhayani *et al.* [251]. D'autre part, le PEG-4000 et le sorbitol présentent les principales bandes caractéristiques associées aux polyols, comprenant les vibrations d'élongation et de fréquences de liaison C-O, O-H et des groupes C-H, aux nombres d'ondes allant de 800 à 1500 cm^{-1} . La large bande d'absorption entre 3300 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} est caractéristique de la déformation axiale de O-H, émanant notamment du sorbitol [252]. En ce qui concerne le PC-E dénaturé à 50%, les bandes des Amide II et Amide I, couramment utilisées pour l'analyse de la structure secondaire des protéines, sont affectées par le traitement thermique. Le pic Amide-I de PC-E dénaturé à 50% se révèle décalé vers des nombres d'onde de 1655 cm^{-1} et l'intensité du pic Amide-II est réduite comparativement à celle de l'amide-I et II du PC-E natif. De plus, la bande caractéristique de l'Amide-III et les liaisons C-H (2900- 2800 cm^{-1}) ont disparu dans PC-E dénaturé à 50%. Idem, le pic de liaison S-CH observé à 717 cm^{-1} n'est plus détecté, ce qui indique la rupture de la liaison chimique protéine-chromophore du PC-E. Lorsque PC-E est combiné avec du PEG-4000 à un ratio de 1:18 (m/m), la bande Amide I a été préservée et aucun décalage n'a été noté, témoignant de l'action stabilisante du PEG-4000, et ce par sa présence à la surface de PC-E permettant la formation d'une couche protectrice contre la dégradation thermique sans changement structural de la conformation de la protéine. Par ailleurs, lorsque PC-E est combiné avec du sorbitol à un ratio de 1:54, les bandes d'absorption de sorbitol chevauchent les bandes caractéristiques des groupes Amide de PC-E, étant donné de son addition à des concentrations plus élevées que le PEG-4000.

(élongation C=O), amide II (liaison NH) et Amide III (liaison NH et élongation CN), respectivement (Barth, 2007). Deux autres bandes sont identifiées à 2914-2840 et 1400-1000 cm^{-1} , et sont probablement associées à l'élongation C-H symétrique et asymétrique, au groupement C=C, C-O-C et aux vibrations C-O-H, respectivement, pouvant probablement être attribuées au chromophore de la PC. Également, un pic est observé à 717 cm^{-1} , attribuée à la liaison S-CH correspondant à la liaison thioéther rapportée comme étant un agent de liaison entre le chromophore et le résidu de cystéine de la biliprotéine [229]. Ce spectre confirme donc qu'il s'agit bien d'une protéine-chromophore. Il est à noter que les études IR-TF sur les biliprotéines, la phycocyanine en particulier, sont limitées en raison de sa structure complexe. Néanmoins, le spectre obtenu dans la présente étude corrobore la structure de la phycocyanine rapportée par Bhayani *et al.* [251].

D'autre part, le PEG-4000 et le sorbitol présentent les principales bandes caractéristiques associées aux polyols, comprenant les vibrations d'élongation et de fréquences de liaison C-O, O-H et des groupes C-H, aux nombres d'ondes allant de 800 à 1500 cm^{-1} . La large bande d'absorption entre 3300 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} est caractéristique de la déformation axiale de O-H, émanant notamment du sorbitol [252]. En ce qui concerne le PC-E dénaturé à 50%, les bandes des Amide II et Amide I, couramment utilisées pour l'analyse de la structure secondaire des protéines, sont affectées par le traitement thermique. Le pic Amide-I de PC-E dénaturé à 50% se révèle décalé vers des nombres d'onde de 1655 cm^{-1} et l'intensité du pic Amide-II est réduite comparativement à celle de l'amide-I et II du PC-E natif. De plus, la bande caractéristique de l'Amide-III et les liaisons C-H (2900- 2800 cm^{-1}) ont disparu dans PC-E dénaturé à 50%. Idem, le pic de liaison S-CH observé à 717 cm^{-1} n'est plus détecté, ce qui indique la rupture de la liaison chimique protéine-chromophore du PC-E. Lorsque PC-E est combiné avec du PEG-4000 à un ratio de 1:18 (m/m), la bande Amide I a été préservée et aucun décalage n'a été noté, témoignant de l'action stabilisante du PEG-4000, et ce par sa présence à la surface de PC-E permettant la formation d'une couche protectrice contre la dégradation thermique sans changement structural de la conformation de la protéine. Par ailleurs, lorsque PC-E est combiné avec du sorbitol à un ratio de 1:54, les bandes d'absorption de sorbitol chevauchent les bandes caractéristiques des groupes Amide de PC-E, étant donné de son addition à des concentrations plus élevées que le PEG-4000.

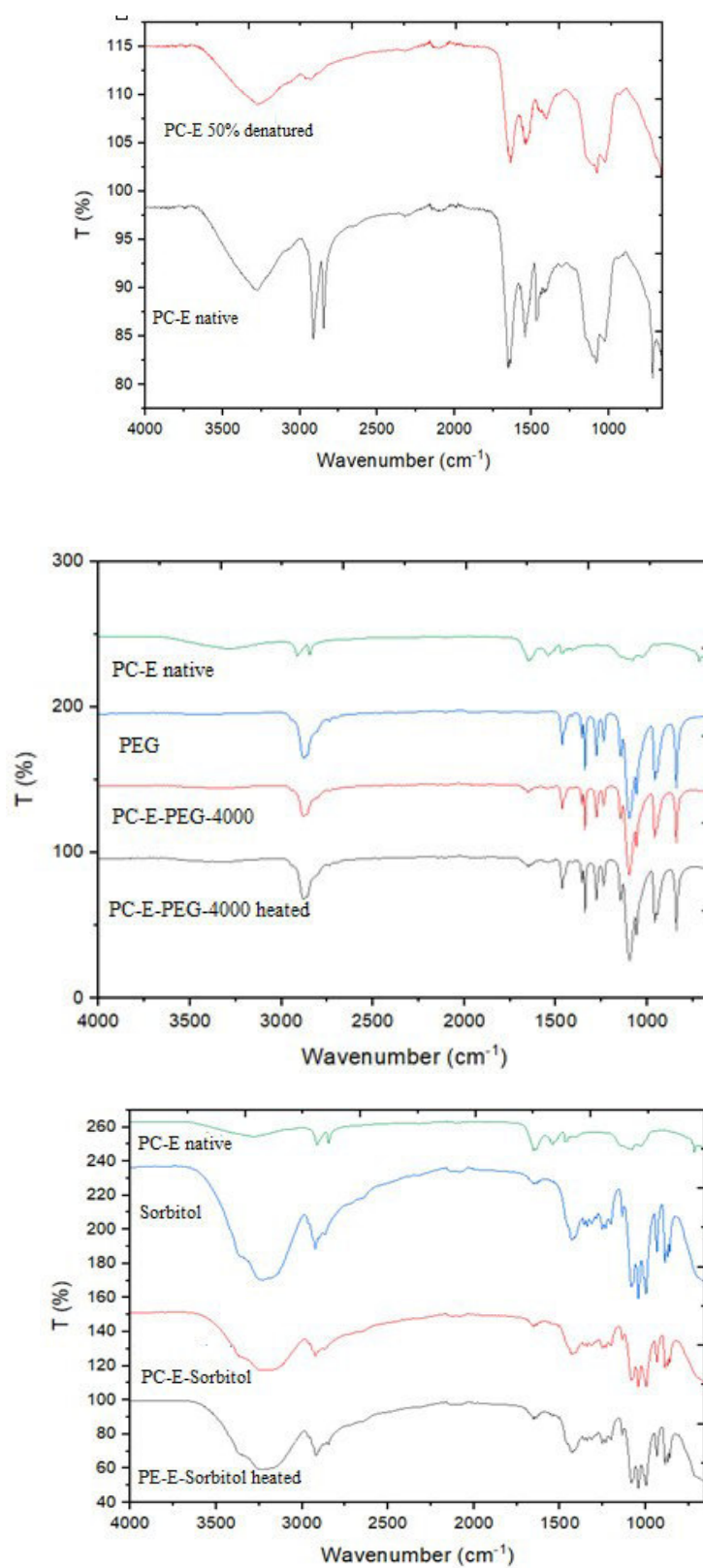


Figure 5.42: Spectres IR-TFde PC-E natif, dénaturé et stabilisé. T (%) : Transmittance.

De ce fait, aucune conclusion directe sur l'action protectrice du sorbitol ne peut être tirée sur la préservation de l'amide I. Cependant, à des nombres d'onde de 3300- 3600 cm^{-1} , le PC-PEG-4000 et PC-E-Sorbitol présentent une forme d'élongation différente de celle observée pour le PC-E natif, ce qui suggère que le PEG-4000 et surtout le sorbitol interagissent de préférence avec les groupes OH et NH dans la molécule de protéines. De ce constat, il est possible de conclure que des liaisons OH se sont formées entre le PC-E et les stabilisants. Le pic lié à la liaison thioéther dans le PC- E-PEG-4000 et PC-E-Sorbitol, est masqué due à la présence de PEG-4000 et du sorbitol en une concentration élevée, qui a couvert la surface de PC-E et masqué donc le signal de cette liaison.

Toutefois et de manière intéressante, après le traitement thermique, PC-E-PEG- 4000 et PC-E-Sorbitol présentent des spectres similaires à ceux non chauffées, indiquant leur stabilité structurelle vis-à-vis du chauffage. L'interaction O-H établie entre PC-E et PEG-4000 /sorbitol mentionnée ci-dessus pourrait expliquer la préservation de la structure du PC-E, d'où sa thermostabilité.

Tous ces résultats sont en accord avec les résultats empiriques précédents obtenus par spectroscopie UV-Visible pour la thermostabilisation de PC. En effet, les polyols sont parmi les co-solutés ayant le plus fort impact sur la stabilisation des protéines (Wang, 2000). Dans la littérature, l'un des mécanismes qui a acquis une large acceptation relatif à la stabilisation des protéines implique la formation de liaisons hydrogène entre la protéine et le stabilisant à la fin du processus de lyophilisation, en particulier pour PEG-4000, satisfaisant ainsi, l'exigence minimale en hydrogène requise pour la stabilisation des surfaces des protéines [250].

•Considérations thermiques

L'analyse calorimétrique à balayage différentiel est réalisée pour mettre en évidence les changements conformationnels au niveau de PC-E en absence et en présence de stabilisants en fonction de la température. Les thermogrammes des échantillons PC-E natifs et stabilisés se caractérisent par un pic endothermique associé à la transition de l'hélice α présente en état amorphe. La température de transition à l'état amorphe et l'enthalpie de transition (ΔH_g) des échantillons sont indiquées dans le **tableau 25**.

Tableau 5.25: Température initiale d'amorphicité et d'enthalpie de transition de PC natif, destabilisé et stabilisé

| | Température initiale d'amorphicité (°C) | ΔH_g (J/g) |
|------------------------------|--|-----------------------|
| PC-E natif | 48,04 | 227,90 |
| PC-E-PEG-4000 | 53,44 | 144,50 |
| PC-E-Sorbitol | 59,81 | 86,00 |
| PC-E-PEG-4000 traité* | 53,04 | 147,60 |
| PC-E-Sorbitol traité* | 65,40 | 90,76 |

*Traité à 60 °C pendant 75 min.

Les résultats de la température initiale de transition à l'état amorphe montrent des valeurs assez rapprochées entre les différents échantillons de 48,04, 59,81, 53,44, 65,40 et 53,04 °C pour PC-Natif, PC-E-Sorbitol (1:54 m/m) et PC-E-PEG-4000 (1:18 w/w), PC-E-Sorbitol (1:54 m/m) et PC-E-PEG-4000 (1:18 w/w) traités à 60 °C pendant 75 min, respectivement. De plus, l'enthalpie de transition (ΔH), associée à l'interaction relative entre les composants de l'échantillon, révèle que la valeur d'enthalpie la plus élevée a été enregistrée pour PC-E natif avec 227,9 J/g. Cette valeur est considérablement inférieure dans PC-E-PEG-4000 et PC-E-Sorbitol avec des valeurs respectives de 144,5 et 86,0 J/g.

D'une manière intéressante, les valeurs de ΔH propres aux PC-E-PEG-4000 et PC-E-Sorbitol traités sont très proches à celles des échantillons non traités, avec 147,5 et 90,76 J/g, respectivement. En effet, il a été admis qu'une valeur d'enthalpie élevée indique que l'échantillon nécessite plus d'énergie pour retourner vers son état initial [253]. Ainsi, PC-E natif nécessite plus d'énergie pour se régénérer que PC-E stabilisé avec le PEG-4000 et le sorbitol. De plus, Antello *et al.* [144] ont rapporté que l'énergie d'activation de la phycocyanine destabilisée, suite à un traitement impliquant la température et la variation de pH, est élevée comparativement à celle de son état natif. L'état amorphe des protéines est lié au ralentissement de l'interconversion des substituants conformationnels et à la relaxation conformationnelle d'une protéine, entraînant une augmentation de sa stabilité [254, 255, 256]. Tenant compte de ces résultats, PEG-4000 et le sorbitol pourraient être capables de former des interactions adéquates avec PC-E pendant l'étape de lyophilisation, permettant ainsi de le maintenir dans sa conformation relativement native et de réduire la mobilité locale et globale de ses chaînes pendant le traitement thermique, ce qui corroborent avec les résultats UV.

Ainsi, en présence de stabilisant, en particulier du sorbitol, un état amorphe de PC-E est formé, donnant lieu à des produits plus stables.

5.3.3.3. Paramètres de couleur du PC-E

Le maintien de la couleur bleue de la phycocyanine indique que la conformation de safraction protéique est bien maintenue comme rapporté par Fukui *et al.* [257]. Les données Cie L*a * b * de PC-E dénaturé, natif et stabilisé indiqués dans le **tableau 5.26** confirment clairement la haute conservation des valeurs de couleur L*, a* et b* après addition de PEG-4000 et de sorbitol, pour réduire significativement le changement de couleur ΔE de 78,5, 3,75 et 2.9 entre PC-E natif/déstabilisé, natif/PC-E-PEG-4000 et natif/PC-E-sorbitol, respectivement.

Tableau 5.26 : Paramètres de couleur de PC natif, déstabilisé et stabilisé

| | PC-E natif | PC-E-PEG-4000 chauffé | PC-E-Sorbitol chauffé | PC-E déstabilisé |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| L* | 24,12±0,7 ^a | 21,77±0,08 ^b | 20,46±0,1 ^c | 94,75±0,07 ^d |
| a* | 0,34±0,02 ^a | 0,236±0,04 ^b | 0,279±0,14 ^c | -5,20±0,05 ^d |
| b* | -26,45±0,87 ^a | -23,52±0,22 ^b | -24,1±0,17 ^c | -1,53±0,03 ^d |
| ΔE | / | 3,75±0,11 ^a | 2,69±0,23 ^b | 78,5±2,13 ^c |

L*, a*, b* sont les coordonnées CieLab, ΔE différence de couleur. Les différentes lettres dans une même ligne indiquent une différence significative (p<0.05). PC-E-Sorbitol 1:54 (m/m), PC-E-PEG-4000 1:18 (m/m).

Conclusion

L'extrait de phycocyanine d'une pureté de 1,24 a été préparé à partir de la souche saharienne d'*Arthrospirasp.*, selon la méthode de congélation et décongélation, et précipitation au sulfate d'ammonium. Les résultats ont démontré que cet extrait possède un bon potentiel fonctionnel et bioactif et pourrait bien servir à des applications industrielles tout en respectant des seuils de températures n'excédant pas les 50 °C et des pH compris entre 5,0 et 7,0. À des procédés industriels impliquant des températures supérieures (60 °C), l'utilisation du sorbitol ou du PEG à des ratios de 1:54 et 1:18 (m/m), respectivement, peut assurer jusqu'à 85 à 87% de la stabilité et donc de fonctionnalité de la phycocyanine contenue dans l'extrait.

5.4. Performances de l'extrait de phycocyanine d'*Arthrospira* sp. dans l'élaboration de films d'emballages comestibles et bioactifs.

Introduction

En raison de sa richesse en métabolites bioactifs, la valorisation et l'application de la biomasse du genre *Arthrospira*. a gagné plusieurs domaines. En effet, différents extraits ont été incorporés dans diverses formulations, notamment alimentaires telles que les pâtes [83] les produits laitiers [258], en tant que colorant (cas de la phycocyanine) [259], ou cosmétiques à travers la formulation de crèmes anti-âge [82]. L'intérêt porté du consommateur sur les emballages bioactifs a conduit à de nouvelles applications, impliquant l'incorporation de ses extraits dans des films comestibles [14, 15], Ainsi, l'objectif dans ce chapitre est de développer, et ce pour la première fois, un film bioactif, biodégradable et comestibles à base de gélatine bovine incorporé avec l'extrait brut de phycocyanine (PC-E) à différents ratios (1,25, 2,5, 6,25 et 12,5% ; m/m).L'effet de cette incorporation sera évalué sur le plan physico-chimique, structural, thermique, mécanique et biologique.

5.4.1. Poids sec et solubilité des films élaborés

Les films comestibles destinés à l'emballage doivent maintenir le niveau d'humidité dans le produit emballé. Par conséquent, connaître le poids sec et la teneur en humidité des films est d'une grande importance en vue de leurs applications en tant qu'emballage alimentaire [260]. Les valeurs du poids sec des différents films élaborés sont présentées dans le **tableau 5.27**. Les résultats obtenus révèlent que le poids sec des films de gélatine incorporés avec l'extrait de phycocyanine G-PC-E augmente de $89,01 \pm 0,95\%$ à $92,16 \pm 1,35\%$ lorsque le PC-E est ajouté à 1,25 et 12,5% (m/m), respectivement. Cette augmentation entre les échantillons de films incorporés n'est pas significative. Cependant, l'incorporation de PC-E, même à faible concentration (1,25% ; m/m) a entraîné une augmentation significative du poids sec du film à base de gélatine seulement ($81,3 \pm 2,21\%$) ($p < 0.05$).

Ce résultat suggère que l'incorporation de PC-E permet l'obtention de films de gélatine plus secs, pourrait être en relation avec l'interaction de PC-E avec le glycérol, de nature très hydraté, rendant ainsi les molécules d'eau moins disponibles [261]. Par ailleurs, la solubilité est une propriété importante des films d'emballage, vu qu'ils peuvent être en contact avec l'eau contenue dans les aliments. Les valeurs de la solubilité des films à base de gélatine incorporés avec le PC-E (**Tableau 5.27**) indiquent que l'ensemble des films présentent une importante solubilité dans l'eau, qui augmente très légèrement avec l'incorporation de PC-E avec une valeur maximale de $96,79 \pm 1,68\%$.

L'incorporation de PC-E, même à de faibles concentrations, n'a montré aucune différence significative de la solubilité des films. Ainsi les films élaborés présentent une faible résistance à l'eau. La solubilité est directement conditionnée par le type de protéines utilisées, mais aussi par la nature des autres composants (protéiques ou non protéiques) présents dans le film préparés [262]. Hosseini *et al.* [263], ont indiqué que le caractère hydrophile des protéines est dû à la présence de peptides polaires. De plus, le caractère hydrosoluble de PC-E pourrait expliquer le fait que son incorporation n'a pas affecté de façon significative la solubilité du film de gélatine non enrichi. Une tendance similaire a été décrite par Gomez-Estaca *et al.* [264] pour des films à base de gélatine bovine incorporés avec des extraits aqueux d'origan et de romarin. Ces derniers présentent des valeurs similaires de solubilité dans l'eau que celles des films contrôle. En revanche, les films à base de gélatine de peau de thon incorporés avec ces mêmes extraits aqueux ont présenté une augmentation notable de la solubilité des films dans l'eau.

Tableau 5.26: Valeur du poids sec, solubilité et activité de l'eau des films enrichis en PC-E

| Films | Poids sec (%) | Solubilité (%) |
|---------------------|--------------------|--------------------|
| Control | $81,3 \pm 2,21^a$ | $91,33 \pm 2,22^a$ |
| G-PC-E-1.25% | $89,01 \pm 0,95^b$ | $95,61 \pm 3,4^a$ |
| G-PC-E-2.5% | $89,57 \pm 1,9^b$ | $96,75 \pm 2,04^a$ |
| G-PC-E-6.25% | $91,48 \pm 1,48^b$ | $96,79 \pm 1,68^a$ |
| G-C-E-12.5% | $92,16 \pm 1,35^b$ | $96,40 \pm 2,60^a$ |

Les différentes lettres dans une même colonne indiquent un effet significatif ($p < 0,05$).

5.4.2. Couleur, transparence et transmission de la lumière

La couleur et la transparence constituent des propriétés importantes pour les films d'emballage en termes d'apparence générale, d'acceptabilité par le consommateur et de leur utilisation, particulièrement dans le cas où les additifs naturels incorporés sont conjugués à des pigments [265]. Le **tableau 5.28** indique les paramètres de couleur et de transparence des films élaborés, incorporés à différentes concentrations de PC-E. Les résultats indiquent que les films préparés présentent des valeurs de L^* et a^* , inversement proportionnelles à la concentration de PC-E incorporée. En revanche, les valeurs de b^* sont proportionnelles à la concentration de PC-E ajoutée. Ainsi, ces résultats permettent de conclure que l'addition de PC-E dans les films de gélatine modifie de manière significative ($p < 0,05$) leurs couleurs, d'une couleur pâle (film témoin) à une couleur bleue très intense (film G-PC-12,5%). Ceci est consolidé par la variation significative des valeurs de ΔE qui témoignent d'une grande différence de couleur des films élaborés, qui augmentent avec l'augmentation de la concentration de PC-E.

Tableau 5.27 : Valeurs de la couleur à la surface et de la transparence des films enrichis en PC-E

| Films | L^* | a^* | b^* | ΔE | Transparence |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------|
| Contrôle | 90,73±0,20 ^a | 0,8±0,07 ^a | -0,73±0,20 ^a | - | 1,19 |
| G-PC-E-1,25 % | 82,36±0,32 ^b | -4,2±0,2 ^b | -14,4±0,36 ^b | 16,79±0,23 ^a | 2,26 |
| G-PC-E-2,5 % | 76±1,27 ^c | -6,86±0,15 ^c | -23,93±1,15 ^c | 28,53±1,43 ^b | 3,87 |
| G-PC-E-6,25 % | 63,23±1,7 ^d | -5,63±1,02 ^d | -41,2±1,67 ^d | 49,35±2,3 ^c | 8,50 |
| G-PC-E-12,5 % | 59,9±0,72 ^e | -2,5±0,17 ^e | -46,43±0,41 ^e | 55,23±0,57 ^d | 13,72 |

Les différentes lettres dans une même colonne indiquent un effet significatif ($p < 0,05$)

De plus, la transparence des films préparés a été évaluée sur la base de leur absorbance à 600 nm. Plus grande est la valeur de transparence ($> 5\%$), plus le film est dit opaque [266]. Par conséquent, d'après les résultats de la transparence, il est ressorti que l'ajout de PC-E engendre des films de gélatine opaques, atteignant une valeur de 13,72 à une concentration de PC-E de 12,5% (m/m), alors que celle du film contrôle n'est que de 1,19. Intermédiairement, l'incorporation de 1,25 à 2,5% (m/m) de PC-E conduit à l'obtention de films de couleur bleue mais transparents. D'un autre côté, la capacité des

films à prévenir contre la transmission de la lumière UV est essentielle afin d'éviter l'oxydation des aliments emballés. Les valeurs de transmission des rayons UV et de la lumière visible (200 à 800 nm) des films élaborés sont présentées dans le **tableau 5.29**. Les résultats indiquent que la transmission de la lumière dans le domaine visible (350-800 nm) des films préparés varie entre 8,9 à 88,3%, avec un maximum de transmission à 600 nm, correspondant à la phycocyanine, dont le maximum d'absorbance est à 620 nm.

À 200 nm, la transmission de la lumière UV n'excède pas la valeur de 0,1%. En outre, à 280 nm, une réduction drastique de la transmission de la lumière UV est enregistrée pour l'ensemble des films enrichis en comparaison avec celui contrôle, de 14% pour le film contrôle à 0,5% pour le film incorporé à 12,5% (m/m) de PC-E.

Par conséquent, l'incorporation de PC-E dans les films à base de gélatine, a efficacement amélioré les propriétés optiques et la résistance à la lumière, aboutissant à des films à effet barrière contre les rayons UV.

Tableau 5.28 : Valeurs de la transmission de la lumière des films enrichis en PC-E dans le domaine de l'UV-visible

| | 200 | 280 | 350 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 |
|---------------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| Contrôle | 0,1 | 14 | 56 | 72,2 | 79,5 | 82,2 | 82,5 | 83,4 |
| G-PC-E-1.25% | 0,1 | 11 | 57,3 | 74,5 | 84,7 | 69,3 | 88,2 | 88,3 |
| G-PC-E-2.5% | 0,1 | 5,3 | 43,4 | 55,9 | 69,1 | 39,6 | 76,1 | 77 |
| G-PC-E-6.25% | 0,1 | 4,4 | 35,5 | 48,2 | 57,9 | 32,7 | 63,1 | 64,6 |
| G-PC-E-12.5% | 0,1 | 0,5 | 23,2 | 36 | 50,6 | 8,9 | 61,6 | 64,5 |

Les valeurs de la transmission de la lumière ont été mesurées à 25 °C sous une RH de 50% et exprimées en %.

La variation dans la couleur, la transparence et la transmission de la lumière, en particulier lorsque l'extrait PC-E est ajouté à raison de 6,25% et 12,5% (m/m), est attribuée à la présence de la phycocyanine, dans le PC-E, comportant un chromophore bleu hautement hydrosoluble responsable de la couleur bleue observée dans les films après incorporation de PC-E [60]. À ce jour, aucune étude sur l'incorporation des biliprotéines dans les films à base de biopolymère n'est entreprise. Cependant, de nombreuses études portant sur l'incorporation d'extraits naturels, pigmentés ou non, dans les films à base de gélatine

et

de chitosane notamment, ont indiqué que ces derniers contribuent à la variation de la couleur, de la transparence et de la transmission de la lumière [267, 262]. Dans une étude plus récente, Balti *et al.* [14] ont rapporté que l'incorporation de l'extrait éthanolique de spiruline à raison de 2,5 à 20% (m/v) a un effet sur la couleur des films à base de chitosane leur conférant une couleur jaune et améliorant leur transmission à la lumière de manière significative.

5.4.3. Propriétés structurales des films

5.4.3.1. Structure par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La technique IR-TF a été utilisée pour révéler les groupements fonctionnels et les changements structuraux au niveau moléculaire des films de gélatine suite à l'incorporation du PC-E. Les spectres IR-TF des films de gélatine, avec ou sans incorporation de PC-E aux nombres d'onde allant de 600 à 4000 cm^{-1} sont représentés dans la **figure 5.43**. Il est ressorti que les films préparés présentent une bande située au nombre d'onde allant de 980 à 1110 cm^{-1} , qui correspond au groupement OH du glycérol, ajouté comme plastifiant dans les films [268]. De plus, les spectre des films contrôle et incorporés de PC-E à raison de 1,25%, 2,5%, 6,25% et 12,5% (m/m) révèlent une bande Amide-I aux nombres d'ondes de 1643, 1647, 1649, 1648 et 1648 cm^{-1} , respectivement, correspondant à l'élongation C=O couplé à l'élongation CN en mode flexion avec les fonction NH et CCN [267]. Ce décalage de la région Amide I révélé pour l'ensemble des films pourrait être attribué à une différence dans l'orientation et la conformation des chaînes polypeptidiques de la gélatine en raison de l'addition de PC-E. En outre, le film contrôle et les films incorporés avec 1,25%, 2,5%, 6,25% et 12,5%, ont présenté une bande d'absorption caractéristique de l'Amide-II (provenant de la vibration de flexion des groupes NH et les vibrations des groupes CN) aux nombres d'ondes de 1552, 1551, 1551 et 1548, 1547 cm^{-1} , respectivement. La bande amide-III correspond à des pics combinant des vibrations des groupements CN, NH, ainsi que des absorptions résultant des vibrations du groupe CH_2 du squelette glycine et des chaînes latérales de proline de la gélatine [269]. Dans le film contrôle, l'amide-III est représentée par 3 bandes observées à un nombre d'ondes de 1253, 1310 et 1380 cm^{-1} . De même, les bandes amide-III des films incorporés par PC-E à raison

de 1,25% et 2,5% sont observées au même nombre d'ondes que le film contrôle. Cependant, un déplacement notable en particulier des bandes à 1310 et 1380 cm^{-1} est révélé dans les films incorporés de PC-E à raison de 6,25 et 12,5%, pour être observées à 1337 et 1047,2 cm^{-1} , respectivement.

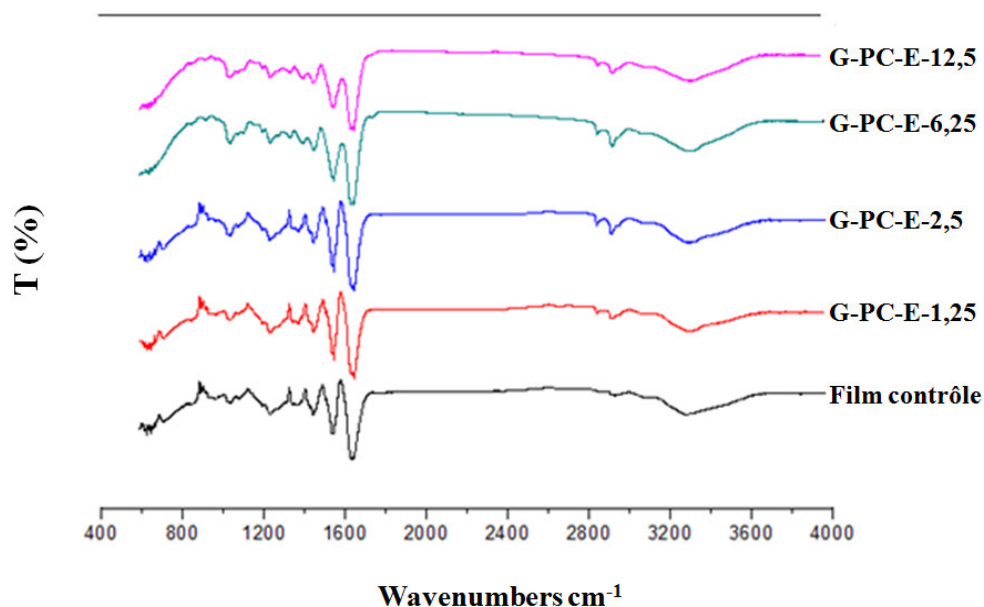


Figure 5.43 : Spectres IR-FT des films enrichis PC-E. Mesures faites à 25 °C et à une humidité relative de 50%.

D'un autre côté, les films contrôle et incorporés en PC-E ont montré une large bande entre 3600 et 3000 cm^{-1} qui est attribuée à l'élongation O-H chevauchant la vibration N-H liée à l'amide-A à 3300 cm^{-1} [270]. Les bandes de l'Amide-B du film contrôle ont été observées à un nombre d'ondes compris entre 2920 et 2945 cm^{-1} . De nouveaux pics ont été observés au nombre d'ondes allant de 2900 à 2840 cm^{-1} dans les films incorporés de PC-E, associés à l'extrémité C-H de l'élongation symétrique et asymétrique ainsi que des groupements C = C, C-O-C et C-O-H, qui sont attribués au chromophore de la phycocyanine, indiqué dans le chapitre précédant aux mêmes nombres d'ondes [250]. L'intensité de ces deux pics augmente proportionnellement avec l'augmentation du ratio d'incorporation de PC-E. Les résultats de la IR-TF suggèrent que l'incorporation de PC-E modifie l'organisation moléculaire et les interactions intermoléculaires de la matrice du film de gélatine en particulier quand PC-E est ajouté aux concentrations de 6,25 et 12,5% (m/m).

5.4.3.2. Microstructure

Les coupes transversales du film témoin et celui incorporé avec 6,25% de PC-E, analysés par microscopie électronique à balayage (MEB) sont présentés sur la **figure 5.44**. Le film témoin à base de gélatine affiche une structure compacte, structurellement intègre sans micropores mais peu homogène, qui corrobore avec celle rapportée par plusieurs auteurs [271, 272].

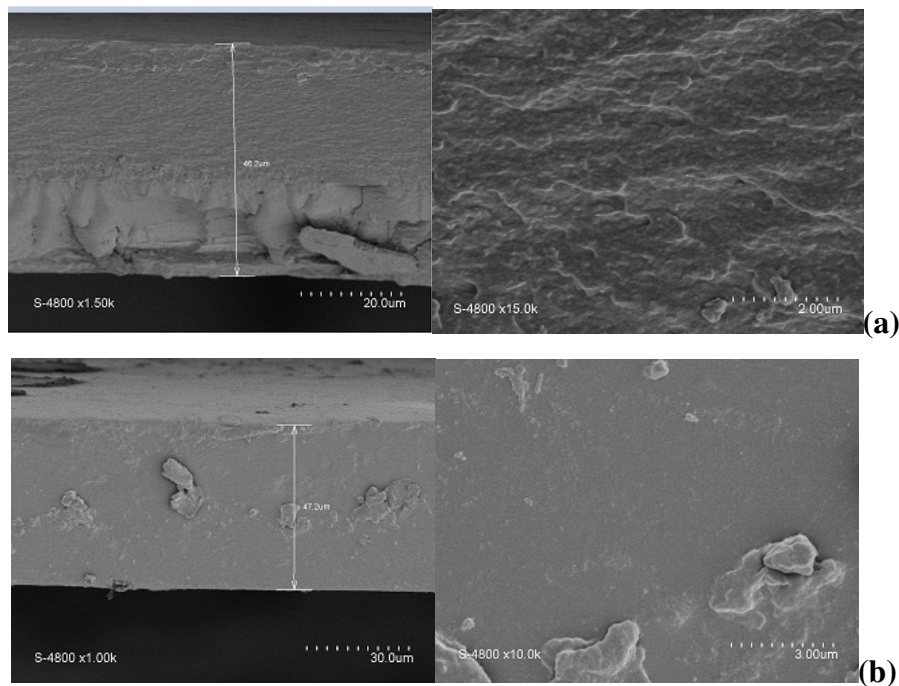


Figure 5.44 : Micrographie d'une coupe transversale du film contrôle à base de gélatine

De manière intéressante, le film incorporé avec 6,25% de PC-E (m/m) présente une structure plus compacte, hautement homogène et lisse, révélant une bonne adhérence et compatibilité entre la gélatine et PC-E. Ceci peut-être dû au fait que les arrangements des chaînes de gélatine, au cours de la formation du film, ont eu lieu de manière organisée, présentant des zones de jonction uniques et ordonnées uniques formées dans le réseau du film, lorsque le PC-E a été ajouté.

5.4.4. Propriétés mécaniques et thermiques des films

5.4.4.1. Propriétés mécaniques

Une résistance mécanique et une adéquate extensibilité sont généralement nécessaires pour les films destinés à l'emballage alimentaire, afin de résister au stress externe et de maintenir leur intégrité et par conséquent leurs propriétés lors de la manipulation, le stockage et leurs cycle de vie lors de la commercialisation du produit emballé [263]. La résistance à la traction (RT) et le pourcentage d'élongation à la rupture (ER) des films de gélatine incorporés ou non avec PC-E à différentes concentrations ont été mesurés et les résultats sont indiqués dans le **tableau 5.30**.

Tableau 5. 29: Propriétés mécaniques des films enrichis en PC-E

| Films | RT (MPa) | ER (%) |
|---------------|---------------------------|--------------------------|
| Control | 16,14 ± 0,36 ^a | 18,92± 0,09 ^a |
| G-PC-E-1.25 % | 15,54 ± 0,22 ^b | 18,77± 0,16 ^a |
| G-PC-E-2.5 % | 14,97 ± 0,25 ^c | 17,31± 0,22 ^b |
| G-PC-E-6.25 % | 14,32 ± 0,07 ^d | 15,29± 0,12 ^c |
| G-PC-E-12.5 % | 13,73 ± 0,12 ^e | 14,49± 0,94 ^d |

RT :Résistance à la traction ;**ER** :Elongation à la rupture. Toutes les mesures sont réalisées à 25 °C et à une humidité relative de 50%. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD (n=6). Les différentes lettres dans la même colonne indiquent une différence significative (p<0.05).

Les résultats des propriétés mécaniques indiquent que l'ajout de PC-E influence significativement les propriétés mécaniques des films à base de gélatine (p<0,05). Les deux paramètres RT et ER diminuent proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de PC-E, de 16,14±0,36 MPa et 18,9±0.09% à 13,73±012 MPa et 14,49±0,94% pour le film contrôle et celui incorporé de 12,5% PC-E, respectivement. La diminution à la fois de RT et ER suggère que les films incorporés sont moins résistants que le film contrôle. Néanmoins, bien que, statistiquement, ces valeurs soient réduites significativement, elles sont empiriquement proches. Ainsi, d'un point de vue pratique, les films à base de gélatine incorporés avec PC- E peuvent être considérés comme résistants au même seuil que le film à base de gélatine

seule. Ces résultats laissent supposer que la nature protéique de PC-E peut former un réseau avec la gélatine mais pas assez fort pour renforcer la résistance des films à la rupture. Par ailleurs, la diminution de l'allongement des films incorporés avec PC-E peut être attribuée à des interactions créées entre l'extrait PC-E et la gélatine qui impliquerait un phénomène de réticulation ou de formation cristalline, ce qui provoque la diminution du volume libre, de la mobilité moléculaire et de la flexibilité de la gélatine et par conséquent la diminution de l'élongation et la résistance à la traction [262]. À ce jour, aucune étude sur les propriétés mécaniques des films à base de gélatine suite à l'incorporation des biliprotéines, n'a été réalisée. Cependant, différentes tendances ont été rapportées dans la littérature impliquant l'effet de différents additifs sur les propriétés mécaniques des films de gélatine. Dans leur étude, Kchaou *et al.* [271] ont signalé que l'ajout de l'isolat protéique, obtenu à partir de la peau de seiche, aux films à base de gélatine entraîne une diminution de l'ER et de RT à mesure que la concentration de l'isolat protéique augmentait. Dans une autre étude, les paramètres ER et RT des films à base de gélatine (bovine et peau de thon) n'a pas été modifiée par l'incorporation de l'extrait aqueux d'origan et de romarin [264]. Par ailleurs, une diminution significative de l'ER a été rapportée pour les films à base de gélatine incorporée avec du thé vert, de pépins de raisin, de gingembre et d'extrait de feuilles de Ginkgo [265], tandis qu'aucune différence dans la RT n'a été observée dans les films de gélatine marine incorporés avec des extraits de macroalgue en comparaison avec le film témoin [273].

5.4.4.2. Propriétés thermiques

- ***Analyse par balayage calorimétrique différentiel***

Les propriétés thermiques des films préparés ont été étudiées par DSC afin d'évaluer l'effet de l'addition de PC-E sur leur température de transition vitreuse (Tg). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 5.31**. D'après les résultats obtenus, le film contrôle à base de gélatine seule présente une seule valeur de Tg d'une valeur de 61 °C, similaire à la valeur de Tg rapportée par Abdelhedi *et al.* [272] pour les films à base de gélatine bovine (64,35 °C), ainsi que pour les films à base de gélatine de la peau de sèche entre 60 et 66,94 °C [274; 271].

La Tg est un paramètre important pour déterminer la compatibilité entre les polymères et les additifs. Les résultats de la DSC confirment la compatibilité entre la gélatine et le PC-E en raison de la présence d'une seule transition vitreuse dans les films incorporés avec PC-E.

Tableau 5.30 : Températures de transition vitreuse des films enrichis en PC-E

| Films | Contrôle | G-PC-E-1.25% | G-PC-E-2.5% | G-PC-E-6.25% | G-PC-E-12.5% |
|---------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Tg (°C) | 60,95±0,07 ^a | 79,97±0,042 ^b | 82,37±0,55 ^b | 83,82±0,19 ^c | 82,345±1,09 ^c |

Les différentes lettres dans la même ligne indiquent une différence significative ($p < 0.05$).

De plus, les films incorporés avec PC-E présentent des valeurs de Tg qui augmentent significativement avec l'ajout croissant de l'additif de 1,25 à 12,25% (m/m), pour atteindre une valeur maximale de 83,82 à 6,25% PC-E ($p < 0,05$). En effet, en comparaison avec la Tg enregistrée pour le film contrôle, l'addition de 1,25% et de 2,5% de PC-E induit l'augmentation significative de la valeur de Tg, atteignant les 80 °C. De même, l'ajout de 6,25% de PC-E, induit l'augmentation significative de la valeur de Tg aux alentours de 83 °C en comparaison au film contrôle. Toutefois, suite à l'ajout de 12,5% PC-E, la valeur de Tg n'enregistre aucune amélioration significative par rapport au film incorporé de 6,25% de PC-E. À partir de ces résultats, il est ressorti que l'addition de PC-E renforce la structure du film de gélatine, vu que la température de transition vitreuse a été décalée de quasiment 20 °C quand PC-E a été ajouté, amplifiant par conséquent leurs possibles applications dans les emballages alimentaires. Des tendances similaires ont été obtenues par [275, 276] après l'ajout d'additifs de nature protéique.

- **Analyse thermogravimétrique**

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée afin de révéler le comportement de dégradation thermique des films de gélatine incorporés de PC-E à différents ratios. Les thermogrammes obtenus sont présentés sur la **figure 5.45**, la perte de poids (Δ_w), la masse résiduelle ainsi que la température de dégradation maximale (T_{max}) sont indiquées dans le **tableau 5.32**. D'après les résultats, trois principales étapes de transformation pour chaque film ont été observées. La première étape de transformation, observée aux alentours de 100°C, indique des valeurs de Δ_w comprises entre 12,27 et 13,77% pour le film de gélatine

incorporé avec 12,5% de PC-E et le film contrôle, respectivement. Cette perte de masse est associée à la perte de l'eau adsorbée résiduelle ou libre des films.

La seconde étape de transformation est observée entre 260 et 290 °C, dont les valeurs de Δw varient de 8,28 à 13,14%. Cette perte est attribuée à la perte de glycérol [269], utilisé comme plastifiant pour les films, ainsi qu'à la dégradation de la fraction protéique de faible masse moléculaire [267].

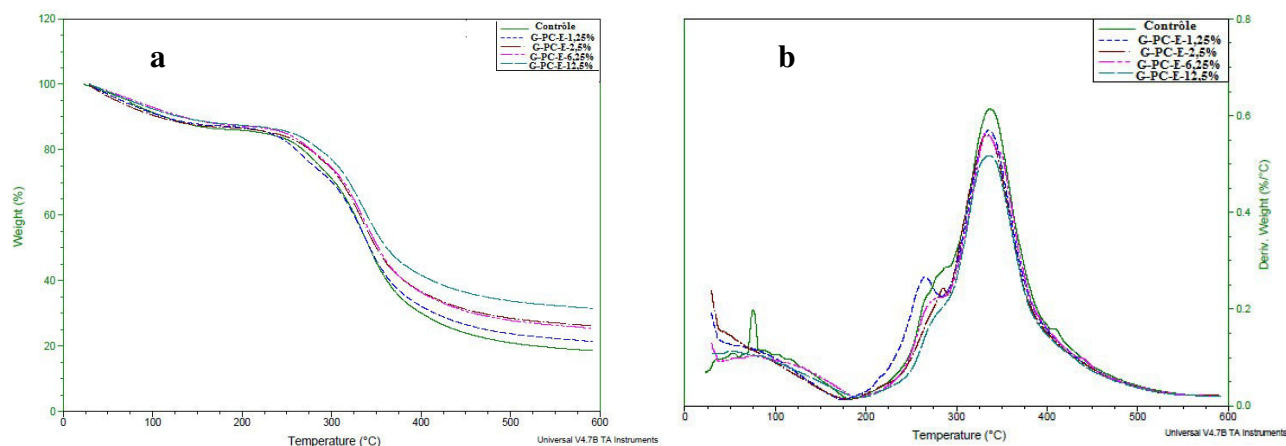


Figure 5.45: Thermogrammes des films enrichis en PC-E. (a) : Perte de poids (%) en fonction de la température. (b) : Dérivée de la perte de poids (%/°C) en fonction de la température.

Tableau 5.31: Perte de masse, température maximale de dégradation et masse résiduelle des films enrichis en PC

| Films | 2 ^{ème} | | | T _{max} (°C) | Masse résiduelle (%) |
|--------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | 1 ^{ère} Transformation | transformation | 3 ^{ème} transformation | | |
| | Δw_1 (%) | Δw_2 (%) | Δw_3 (%) | | |
| Contrôle | 13,77 | 13,14 | 54,54 | 336,38 | 18,55 |
| G-PC-E-1.25% | 12,67 | 12,97 | 52 | 336,38 | 21,4 |
| G-PC-E-2.5% | 13,12 | 10,4 | 50,31 | 334,76 | 26,1 |
| G-PC-E-6.25% | 12,52 | 10,13 | 51,93 | 332,01 | 25,8 |
| G-PC-E-12.5% | 12,27 | 8,28 | 47,88 | 335,8 | 31,5 |

Au cours de la troisième étape, la dégradation a été inversement proportionnelle aux ratios de PC-E incorporés. En effet, les valeurs de Δw ainsi que celles de la masse résiduelle sont passées de 54,54% à 47,88% et de 18,55 à 31,5% pour le film à base de gélatine uniquement (contrôle) et le film de gélatine incorporé avec 12,5% de PC-E, respectivement.

Cependant, la température de dégradation maximale du film à base de gélatine (contrôle) de 336,38 °C n'a pas été affectée par l'incorporation de PC-E. En effet, les films incorporés de PC-E ont enregistré un décalage négligeable de 4 °C en comparaison avec le film contrôle indiquant que PC-E maintient les propriétés thermiques du film de gélatine.

Par conséquent, les films de gélatine incorporés de PC-E sont stables à des températures n'excédant pas les 250 °C, ce qui encourage leur utilisation en tant qu'emballage dans différentes applications alimentaires.

5.4.5. Propriétés biologiques des films

5.4.5.1. Activité antioxydante *in vitro*

Compte tenu du fait que les agents antioxydants impliquent différents mécanismes d'action, il est d'une grande importance de combiner plusieurs méthodes afin de déterminer cette capacité antioxydante. Dans cette optique, les activités antioxydantes des films à base de gélatine incorporés avec PC-E ont été examinées selon leurs capacités à piéger les radicaux DPPH, réduire le fer, chélater les ions ferreux et prévenir contre le blanchiment du β -carotène par les radicaux linoléate.

- ***Activité anti radicalaire***

La **figure 5.46** présente les valeurs de la capacité des films G-PC-E à piéger les radicaux DPPH. Les résultats révèlent que cette capacité augmente significativement avec l'incorporation du PC-E à des concentrations supérieures ou égale 1,25% (m/m), par rapport au film contrôle, avec une activité de 43% ($p < 0,05$ (*)). L'incorporation de PC-E à raison de 1,25 à 6,25% (m/m) permet d'atteindre des valeurs d'activité allant de 46,73±0,38% à 78,58±0,61%, respectivement, puis diminue légèrement à un ratio d'incorporation de 12,5% pour atteindre une valeur de 75,89±0,15%.

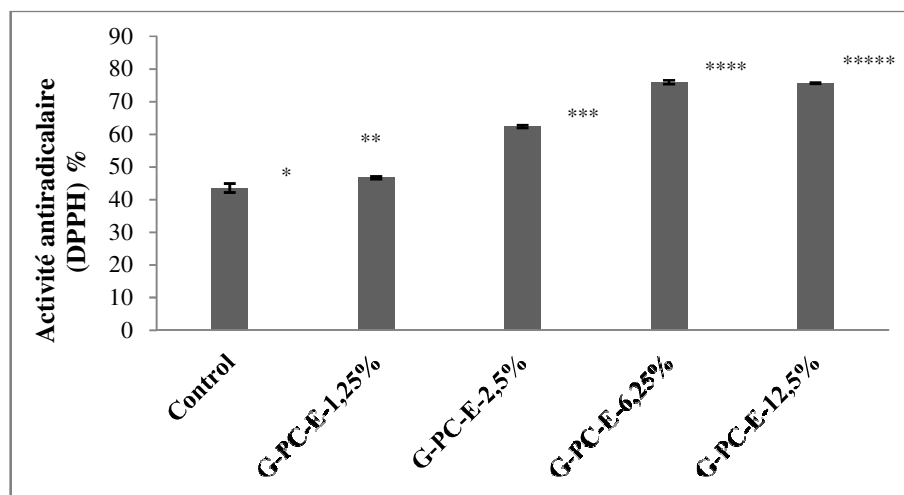


Figure 5.46 : Activité antiradicalaire des films enrichis en PC-E.

• *Pouvoir réducteur*

La capacité antioxydante des films préparés a également été déterminée par leur aptitude à réduire le fer ferrique en fer ferreux à partir du réactif de ferrocyanure de potassium. Les résultats obtenus sont indiqués sur la **figure 5.47**. Le film à base de gélatine seule présente une faible capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux ($DO_{700} = 0,21$). Néanmoins, l'incorporation de PC-E améliore le pouvoir réducteur du film de gélatine de manière significative et dose dépendante. En effet, le film incorporé avec 6,25% de PC-E possède un pouvoir réducteur 3 fois plus supérieur par rapport au film contrôle. Cependant, la valeur du pouvoir réducteur diminue à $0,517 \pm 0,01$ lorsque le film de gélatine est incorporé avec 12,5% de PC-E.

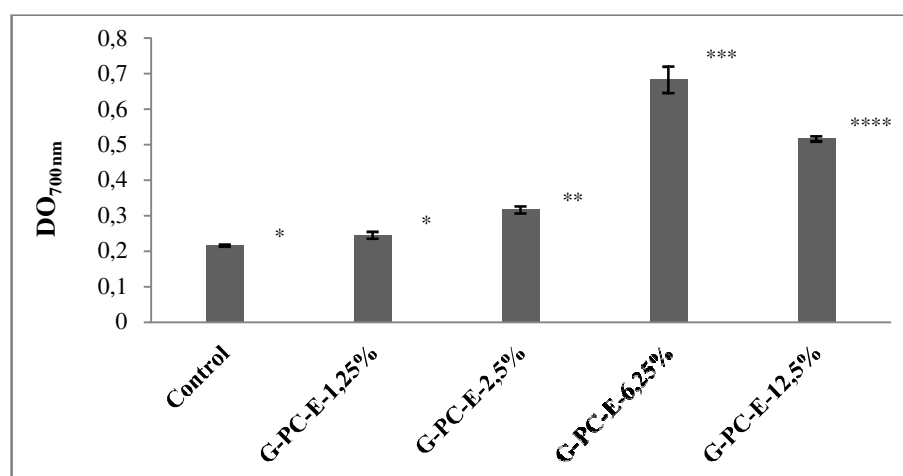


Figure 5.47 : Pourvoir réducteur des films enrichis en PC-E.

• *Effet chélateur du fer*

Les ions métalliques sont connus pour être des précurseurs catalyseurs de la peroxydation lipidique et peuvent conduire à la formation de radicaux libres (peroxydes). La capacité des films préparés à chélater le fer est indiquée sur la **figure 5.48**. Les résultats ont révélé que les films de G-PC-E sont capables de chélater le fer (II) de manière significative et proportionnelle à l'augmentation de la concentration de PC-E. En effet, le film contrôle présente un faible effet chélateur (22%), l'ajout de 1,25 et de 2,5% de PC-E n'a pas amélioré cette activité de façon prononcée, où les valeurs n'ont pas dépassé les 30%. Cependant, à une concentration d'incorporation de 6,25 et 12,5%, une amélioration nette et significative de l'effet chélateur est marquée et les valeurs atteignent $85\pm 0,44\%$ et $92,2\pm 2,7\%$, respectivement.

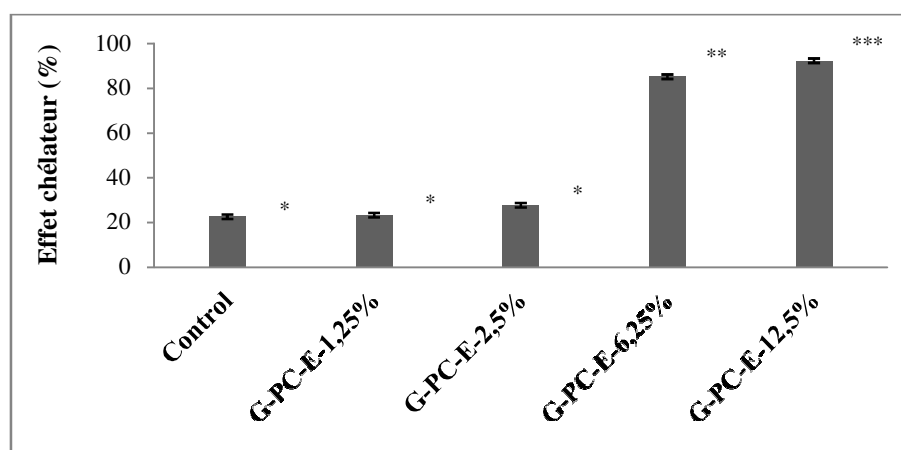


Figure 5.48 : Effet chélateur des films enrichis en PC-E.

• *Inhibition du blanchiment du β -carotène*

Le test de blanchiment du β -carotène-linoléate est couramment utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des composés bioactifs. Le β -carotène subit une décoloration rapide en absence des agents antioxydants. La **figure 5.49** illustre les résultats de la prévention du blanchiment du β -carotène dans l'ensemble des films préparés. Le film à base de gélatine seule présente pratiquement aucune protection contre le blanchiment du β -carotène ($2,08\pm 0,08\%$) en comparaison avec ceux incorporés avec PC-E ($p < 0,05$), où la valeur maximale atteinte est de $28,38\pm 1,47\%$ à une concentration de PC-E de 12,5%. Toutefois, bien que l'ajout de PC-E améliore l'activité d'inhibition du blanchiment du β -carotène de manière dépendante, cette valeur maximale est considérée comme modeste.

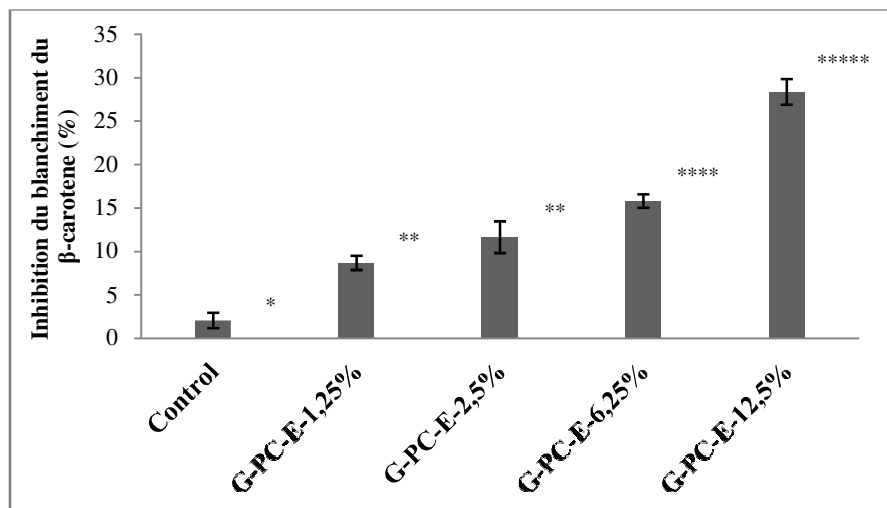


Figure 5.49 : Capacité des films enrichis en PC-E à inhiber le blanchiment du β - carotène.

Il a été bien rapporté que l'addition d'extraits bioactifs naturels augmente les capacités antioxydantes des films à base de gélatine. Par exemple, l'addition de boldine, esculine et l'extrait de feuille de durian, améliore de manière significativement l'activité antioxydante des films de gélatine, en fonction de leurs concentrations [266, 275, 277].

À notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée, jusqu'à présent, sur les propriétés antioxydantes des films de gélatine incorporés avec l'extrait de phycocyanine (PC-E). Les résultats obtenus indiquent clairement que l'incorporation de PC-E améliore significativement l'activité antioxydante des films de gélatine surtout à un ratio d'incorporation de 6,25% (m/m). Ces propriétés antioxydantes sont attribuées à la phycocyanine, dont l'activité biologique a déjà été démontrée précédemment dans la présente étude, ainsi que par la littérature [60, 220, 278]

5.4.5.2. Activités antibactériennes

La prolifération bactérienne est l'une des principales causes attribuées à la détérioration des aliments. L'activité antimicrobienne d'un film d'emballage est d'un grand intérêt pour palier à ce problème. L'activité antibactérienne des solutions filmogènes de gélatine incorporées ou non avec PC-E à différentes concentrations, contre six bactéries à Gram positif et Gram négatif est indiquée dans le **tableau 5.33**.

La solution filmogène à base de gélatine seule ne présente aucune inhibition contre les bactéries testées. Cependant, lorsque PC-E est incorporé, l'activité antibactérienne a été améliorée significativement en fonction de la concentration incorporée.

Tableau 32 : Activité antibactérienne des films enrichis en PC-E

| Films | Zones d'inhibition (mm) | | | | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Contrôle | G-PC-1,25% | G-PC-2,5% | G-PC-6,25% | G-PC-12,5% |
| <i>S. aureus</i> | 6,50±0,70 ^a | 8,50±0,70 ^b | 8,75±0,40 ^b | 10,50±0,70 ^c | 12,50±0,70 ^d |
| <i>L. monocytogenes</i> | NA | NA | NA | NA | NA |
| <i>M. luteus</i> | 7,00±0,70 ^a | 9,50±0,70 ^b | 11,00±0,70 ^c | 13,50±0,70 ^d | 18,5±0,70 ^e |
| <i>S. typhimurium</i> | NA | NA | NA | NA | NA |
| <i>E. coli</i> | 6,50±0,70 ^a | 9,00±0,70 ^b | 10,50±0,40 ^c | 12,00±0,40 ^d | 13,00±0,70 ^e |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 6,00±0,00 ^a | 6,00±0,70 ^a | 6,50±0,70 ^a | 9±0,7 ^b | 9,00±0,70 ^b |

NA : Non Actif. Les différentes lettres dans la même ligne indiquent une différence significative ($p < 0.05$).

L'ajout de PC-E aux films à base de gélatine à raison de 1,25 à 12,5% (m/m) a permis d'inhiber la croissance de *M. luteus*, *E. coli* et *S. aureus*, avec des diamètres de la zone d'inhibition croissants et proportionnels à la concentration de PC-E ajoutée. Le diamètre maximal est atteint pour une dose ajoutée de 12,5% de PC-E contre toutes les trois souches sensibles. Cette activité antibactérienne est attribuée à la phycocyanine contenue dans PC-E.

En effet, en plus de ses propriétés antioxydantes, PC-E est doué d'une activité antibactérienne intéressante, ce qui corrobore avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent. Kushik *et* Abhishek [279] et Sarada *et al.* [243] ont montré que la phycocyanine purifiée à partir de *Spirulina plantensis* est douée d'une activité antibactérienne intéressante contre plusieurs souches notamment *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Conclusion

Les films d'emballage préparés à base de gélatine et incorporés avec les biliprotéines extraites à partir de la souche saharienne d'*Arthrospira* sp. ont été élaborés avec succès en utilisant la méthode du casting sur boîte.

En raison de leur biocompatibilité, ces mélanges ont donné des films avec une structure homogène, révélée par la spectroscopie infrarouge et les résultats thermiques ainsi que la microstructure. L'addition de PC-E a maintenu les propriétés mécaniques du film à base de gélatine et a amélioré significativement leurs propriétés barrière à l'UV. De plus et de manière intéressante, les activités antioxydantes et antibactériennes des films préparés ont été améliorées particulièrement à un ratio d'incorporation de 6,25% (m/m) de PC-E. Cette étude démontre clairement ainsi que les films G-PC-E peuvent être considérés comme un emballage bioactif prometteur à utiliser dans les industries alimentaires.

CONCLUSION GENERALE

La souche saharienne *Arthrospira* sp. isolée depuis la Guelta du Palmier de Tamanrasset (Algérie), représente une source naturelle importante de composants bioactifs utiles à la nutrition humaine. *Arthrospira* sp. a montré une bonne acclimatation aux conditions de laboratoire permettant d'atteindre des concentrations de biomasse concurrentielles, atteignant ainsi son maximum de production au bout de 4 à 5 jours de culture en batch sous des conditions optimales de lumière de 80 μmol de photons m^2/s et de 30 °C de température. De plus, cette souche détient un potentiel de flexibilité métabolique intéressant sous l'effet de différents niveaux d'intensité de lumière et de concentrations en NaCl, d'azote et de phosphore selon un mode de culture en deux phases.

Le présent travail a démontré que les conditions de stress modulent significativement la composition d'*Arthrospira* sp. de manière dynamique. Les résultats ont indiqué que l'application d'un stress à facteurs multiples donne des taux de maximisation très satisfaisant en termes de sucres totaux, de lipides, de caroténoïdes totaux, de phycobiliprotéines et de production d'EPS. De plus, plusieurs interactions clés identifiées entre l'intensité de lumière et les concentrations en NaCl, NaNO_3 et K_2HPO_4 ont été mise en évidence, dont il faut tenir compte pour atteindre ces taux de maximisation. Le mode de culture en deux phases adopté pourrait être prometteur pour produire différents types de biomasse de Spiruline enrichis en métabolites souhaitables et ce au bout de 3 jours sans réduire la productivité de biomasse

Le présent travail a également démontré que les EPS produits par cette souche peuvent être considérés comme des métabolites à intérêt industriel alimentaire et nutritionnel. L'étude de la maximisation de la production des EPS en utilisant uniquement deux facteurs industriels, notamment l'intensité de la lumière et la concentration en NaCl, a montré que leur interaction permet améliorer la production des EPS et donner un EPS avec une faible teneur en protéine. L'exopolysaccharide obtenu (PS) après déprotéinisation des EPS, présente une bonne résistance thermique et l'étude de son comportement rhéologique suggère qu'il présente un comportement non Newtonien pseudo plastique par cisaillement et un comportement de type gel, pouvant résister à la température.

Les résultats de cette étude appuient, ainsi, les performances du PS extrait d'être utilisé dans diverses formulations alimentaire et nutritionnelles.

L'extrait de phycocyanine brut (PC-E) a été préparé à partir de la biomasse d'*Arthrospira* sp. cultivée sous les conditions qui maximisaient le taux en phycobiliprotéines. Le PC-E présente des propriétés émulsifiantes et moussantes intéressantes ainsi que des capacités antioxydantes et antibactériennes satisfaisantes.

Par ailleurs, le PC-E interagit de manière adéquate avec le PEG-4000 et le sorbitol permettant ainsi sa thermostabilisation. De plus, les performances du PC-E dans l'élaboration des films comestibles et bioactifs à base de gélatine ont été investigués. L'incorporation du PC-E permet d'obtenir des films avec une structure homogène et résistante à la chaleur (jusqu'à 250 °C). De plus, l'addition de PC-E permet le maintien des propriétés mécaniques du film à base de gélatine et lui confère des propriétés anti-UV, antioxydantes et antibactériennes.

Ces résultats ont clairement mis en évidence les performances de PC-E en tant qu'ingrédient fonctionnel et bioactif prometteur pour des applications industrielles, notamment nutritionnelle ou d'emballage d'aliment. En perspective, des travaux complémentaires sont en cours de réalisation et portent sur :

1. La quantification des composants phénoliques chez *Arthrospira* sp. cultivée sous un stress à facteur combinés multiples;
2. L'estimation de l'activité biologique des extraits organiques de la biomasse d'*Arthrospira* sp. cultivée sous un stress à facteur combinés multiples;
3. L'identification des composés phénoliques responsables de cette activité biologique par GC-MS / LC-MS;
4. La purification d'une fraction polysaccharidique intracellulaire active chez *Arthrospira* sp. par gel perméation (SEPHADEX G100) et chromatographie échangeuse d'ions (DEAE);
5. L'évaluation de l'activité antivirale et antiproliférative de cette fraction polysaccharidique purifiée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Whitton, B.A., Potts, M. (2002). Introduction to the cyanobacteria. The Ecology of Cyanobacteria. s.l., Kluwer Academic Publishers, pp 669.
- [2] Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition, In Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (Richmond, A.,ed.), Oxford. Blackwell Publishing Ltd, pp. 114-122.
- [3] Borowitzka, M.A. (2018). The 'stress' concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1399-0>
- [4] De Philippis, R., Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their applications possible. *FEMS Microbiology Reviews*. 22, 151-175.
- [5] Fox, D., Fox, R. (1999). Spiruline: Techniques pratiques et promesses. Aix en Provence: EdiSud. p 246
- [6] Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad S., Richmond, A. (1982). Production of Spirulina biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*. 2, 175-185.
- [7] Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. (2012a). Carbohydrates production and bio-flocculation characteristics in cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: improvements through phosphorus limitation process. *BioEnergy Research*. 5, 915–925.
- [8] Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D. (2012b). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28, 2661–2670.
- [9] De Philippis, R., Sili, C., Vincenzini, M. (1993). Glycogen and poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Spirulina maxima*. *Microbiology*. 138, 1623–1628.
- [10] Fillali Mouhim R., Cornet J.F., Fontaine T., Fournet B., Dubertret G. (1993). Production, isolation and preliminary characterisation of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters*. 15, 567-572.
- [11] Majdoub, H., Mansour, M.B., Chaubet, F., Roudesli, M.S, Maaroufi, R.M.(2009). Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. *Biochimica Biophysica Acta*. 1790, 1377–1381.
- [12] Challouf, R., Trabelsi, L., BenDhieb, R., El Abed, O.,Yahia, A., Ghozzi, K., Ben Ammar, J., Omran, H., Ben Ouada., H.(2011). Evaluation of cytotoxicity and biological in

extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54, 831–838.

[13] Trabelsi, L., Ben Ouada, H., Bacha, H., Ghoul, M. (2009). Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 21, 405–412.

[14] Balti R., Ben Mansour M., Sayari N., Yacoubi L., Rabaoui L., Brodu N., Massé A. (2017). Development and characterization of bioactive edible films from spider crab (*Maja crispata*) chitosan incorporated with *Spirulina* extract, *International Journal of Biological Macromolecules*. 105, 1464–1472.

[15] Benelhadj, S., Fejji, N., Degraeve, P., Attia, H., Ghorbel, D., Gharsallaoui, A. (2016). Properties of lysozyme/*Arthrospira platensis* (*Spirulina*) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. *Algal Research*. 15, 43-49.

[16] Nabout, J.C., da Silva Rocha, B., Carneiro, F.M., Sant'Anna, C.L. (2013). How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity Conservation*. 22, 2907–2918.

[17] Troshl, C., Meixner, K., Drosig, B. (2017). Cyanobacterial PHA Production-Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering (Basel)*. 4, 26-45.

[18] Golubic, S., Knoll, A.H. (1993). Fossil prokaryotes. In *Fossil Prokaryotes and Protists* (Lipps, J.H., editor). Blackwell Scientific, Oxford, pp 342.

[19] Mulikidjanian, A.Y., et al., (2006). The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 13126–13131.

[20] Barsanti, L., Gualtieri, P. (2014). *Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 361.

[21] Castenholz, R.W., Wilmotte, A., Herdman, M., Rippka, R., Waterbury, J.B., Iteman, I., Hoffman, L. (2001) Phylum BX. Cyanobacteria. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. (Eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, New York. pp 473-599.

[22] Komárek, J., Kling, H., Komárková, J. (1998). Filamentous cyanobacteria, In *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification* (*John D. Wehr & Robert G. Sheath*, ed.). pp. 117-196.

[23] Richmond, A., Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: 2nd Edition*. John Wiley and Sons. p 736.

[24] Leu, S., Boussiba, S. (2014). Advances in the production of high-value products by microalgae. *Industrial Biotechnology*. 10, 169–183.

[25] Skulberg, O.M. (1996). Terrestrial and limnic algae and cyanobacteria. In: Elevebakk, A. et Prestrud, P.. A Catalogue of Svalbard Plants, Fungi, Algae and Cyanobacteria. s.l.: Norsk Polarinstitutt Skrifter 198, pp. 383-395.

[26] Guihéneuf, F., Khan A., Tran L.S P. (2016). Genetic engineering: a promising tool to engender physiological, biochemical, and molecular stress resilience in green microalgae. *Frontiers in Plant Sciences*. 7, 1-8.

[27] Singh, S., Parihar, P., Singh, M.1, Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, P.V., Prasad, S. M., (2017). Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects, *Frontiers in Microbiology*. 8, 515. doi: 10.3389/fmicb.2017.00515. eCollection 2017.

[28] Rittmann, B.A.E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology Bioengineering*. 100, 203-212.

[29] Malathi, T., Babu, M.R., Mounika, T., Snehalatha, D., Rao, B.D. (2014). Screening of cyanobacterial strains for antibacterial activity. *Phykos*, 44, 6–11.

[30] Mukund, S., Muthukumaran, M., Sivasubramanian, V. (2014). In-silico studies on cyanobacterial metabolites against lung cancer EGFR protein. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*. 4, 89–98.

[31] Semary, N.A.E., Fouda, M. (2015). Anticancer activity of *Cyanothece* sp. strain extracts from Egypt: first record. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5, 992–995.

[32] Rath, B., Priyadarshani, I. (2013). Antibacterial and antifungal activity of marine cyanobacteria from Odisha coast. *International Journal of Current Trends in Research*. 2, 248-251.

[33] Shaieb, FA., Issa, A.A., Meragaa, A. (2014). Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. *Archives of Biomedical Sciences*. 2, 34-41.

[34] Abdo, S.M., Mona H.H., Waleed, M.E., Rawheya, A.S. E. D., Gamila, H. A. (2012). Antiviral activity of freshwater algae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2, 21–25.

[35] Grobbelaar, J.U., (2004). In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 97-115.

- [36] Djaghoubi, A., Daddi Bouhoun, M., Hadj Said, S., Saggai, A., Sobti, S., Belhadj Hamdi, A., (2015). Growth and nitrogen removal Efficiency as protein content of *Spirulina* from tertiary municipal wastewater in Ourgla. *Energy Procedia*. 74, 1402-1409.
- [37] Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández, E. (2001). The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresource Technology*. 77,19-24.
- [38] Yan-Kun, L. (2004). In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 40-56.
- [39] Perez-Garcia, O., Escalante, F.M., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*. 45, 11-36.
- [40] Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 14, 217–232.
- [41] Watson, E. (2013). Could algae be the next big thing in the protein market? Part two: Aurora Algae. URL: <http://www.foodnavigatorusa.com/Markets/Could-algae-be-the-next-big-thing-in-the-protein-market-Part-two-Aurora-Algae>, consulté le 10.7.2016.
- [42] Trecidi, M.R. (2004). In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 178-214
- [43] Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant, P. (2007). Photoautotrophic High-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*. 98, 288–295.
- [44] Bennekom (2014). Bennekom, AlgaePARC. <http://www.solartours.nu/2014/algaeparc/>. Consulté le :15.6.2016.
- [45] Zittelli, G.C., Biondi, N., Rodolfi, L., Trecidi, M.R. (2013). Photobioreactors for mass production of microalgae. In: Richmond, A., Hu, Q., editors. Handbook of microalgal
- [46] Soni, R.A., Sudhakar, K., Rana, R. (2017). *Spirulina*—From growth to nutritional product: A review, *Trends Food Science and Technology*. 69, 157-171
- [47] Paniagua-Michel, J., Dujardin, E., Sironval, C. (1993). Le Tecuitlatl, concentré de spirulines source de protéines comestibles chez les Aztèques. *Cahiers de l'Agriculture*. 2, 283-287.
- [48] Compere, P., Leonard, J. (1967). *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en protéines, 37, 23 p.
- [49] Delpeuch, F., Joseph, A., Cavalier, C. (1975). Consommation alimentaire et

apport nutritionnel des algues bleues (*Arthrospira platensis*) chez quelques populations du Kanem (Tchad). *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*. 29, 497-515.

[50] Sautier, C., Trémolière, J. (1976). Food value of Spirulina in humans. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*. 30, 517-534.

[51] Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*, Taylor & Francis, London, p 233.

[52] Geltier, L. (1932). Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz, 14. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig. Johnson, New York, London.

[53] Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrstructure and taxonomy of *Arthrospira (spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. Ed. : Avigad Vonshak, pp 1-15.

[54] Nelissen, B., Wilmotte, A., Neefs, J.M., De Wachter, R. (1994). Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosome RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*. 17, 206-210.

[55] Jourdan J. P. (1999) Cultivez votre Spiruline. *Manuel de Culture Artisanale de la Spiruline*. Antenna Technology, Genève. p 126.

[56] Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B.A., Belay, A., Wilmotte, A., (1999) *Arthrospira (spirulina)* strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*. 172, 213-22.

[57] Zarrouk, C. (1966). Contribution to the study of a Cyanophyceae. Influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima* (Setch. and Gardner) Geitler. Ph.D Thesis. University of Paris, France.

[58] Charpy, L., Langlade, M.J. et Alliod, R. La spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique? 2006, Vol. 6, pp. 31-41.

[59] Balasubramani, R., Gupta, S.K., Cho, W., Kim, J., Lee, S., Jeong, K., Choi, H. (2016). Microalgae potential and multiple roles-current progress and future prospects-an overview. *Sustainability*, 8, 1251.

[60] Manirafasha, E., Ndikubwimana T., Zeng, X., Lu., Y., Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent, *Biochemical Engineering Journal*. 109, 282-296.

[61] Cohen, Z. (2002). The chemicals of Spirulina. In *Spirulina platensis*

(*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnology. Ed. : Avigad Vonshak, pp 175-212.

[62] Rechter, S., König, T., Auerochs, S., Thulke, S., Walter, H., Dörnenburg, H., Walter, C., Marschall, M. (2006). Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Research*. 72,197-206.

[63] Yin, C., Daoust, K., Young, A., Tebbs, E. J., Harper, D. M. (2017). Tackling community undernutrition at Lake Bogoria, Kenya: The potential of spirulina (*Arthrospira fusiformis*) As a food supplement. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*.17, 11603-11615.

[64] Shalaby, E.A., Shanab, S.M., Singh, V. (2010). Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. *Journal of Medicinal Plant Research*. 4, 2622–2632.

[65] Aikawa, S., Izumi, Y., Matsuda, F., Hasunuma, T., Chang, J.S, Kondo, A. (2012). Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresources Technology*. 108, 211–215.

[66] Lee, M.C., Chen, Y.C., Peng, T.C. (2012). Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. *Journal of Science Food and Agriculture*. 92, 1562–1569.

[67] Lee, S.H, Lee, J.E, Kim, Y., Lee, S.Y. (2016). The production of high purity phycocyanin by *Spirulina platensis* using light-emitting diodes based two-stage cultivation. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology*. 178, 382–395.

[68] Sharma, G., Kumar, M., Ali, M.I., Jasuja, N.D. (2014). Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 6, 202–206.

[69] Rizzo, R.F., Dos Santos, B.N.C., De Castro, G.F.P.S., Passos, T.S., Nascimento, M.A., Guerra, H.D., Da Silva CG., Da Silva DD., Domingues, J.R., De Lima-Araújo, K.G. (2015). Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different light conditions for application in food products. *Food Sciences and Technology*. 35, 247-252.

[70] Vonshak, A., Guy, R. (1987). Photo-inhibition as a limiting factor in outdoor cultivation of *Spirulina platensis*. In Stadler T (Ed), *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science Publishers. pp 365-370.

[71] Ogbonda, K.H., Aminigo R.E., Abu, G.O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*. 98, 2207-2211.

- [72] Sudhakar, K., Rajesh, M., Premalatha, M. (2012). A Mathematical Model to Assess the Potential of Algal Bio-fuels in India, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 34, 1114-1120.
- [73] Saeid, A., Chojnacka, K. (2015). Toward production of microalgae in photobioreactors under temperate climate. *Chemical Engineering Research and Design*. 93, 377-391.
- [74] Novoveskáa, L., Zapataa, A. K.M., Zabolotneya, J. B., Atwood, M. C., Sundstrom, E. R. (2016). Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in large-scale offshore photobioreactors. *Algal Research*. 18, 86–94.
- [75] Raof, B., Kaushika, B.D., Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*. 30, 537-542.
- [76] Samuel, G. S., Sofi, M. Y., Masih, S. (2010). Potential of different light intensities on the productivity of *Spirulina platensis* under Agra conditions. *Research Journal of Agriculture Science*. 1, 468-469.
- [77] Pragya, N.P., Krishan, K., and Sahoo P.K. (2013). A Review On Harvesting, Oil Extraction And Biofuels Production Technologies From Microalgae. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2, 159-171.
- [78] Richmond, A., Vonshak, A. (1978). *Spirulina* culture in Israel. *Achieves Hydrobiology Beihefte Ergebnisse der Limnology*. 11, 274-280.
- [79] Ponce-Canchihuamán, Pérez-Méndez, O., Hernández-Muñoz, R., Torres-Durán, P., Juárez-Oropeza, M. (2010). Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids in Health and Diseases*. 9, 35-42.
- [80] Jaroulya, U., Anish, Z. J., Kumar, P, Bisen, P.S., G.B.K.S., Prasad. (2012). Alleviation of metabolic abnormalities induced by excessive fructose administration in Wistar rats by *Spirulina maxima*. *Indian Journal of Medical Research*. 135, 422-428.
- [81] Hosseini, S.M., Khosravi-Darani, K., Mozafari, M.R. (2013). Nutritional and medical applications of *spirulina* microalgae. *Mini Review of Medical Chemistry*. 13, 1231-1237.
- [82] Suza, C., Maia Campos, P., Schanzer, S., Albrecht, S., Lohan, S.B., Lademann, J., Darvin, M.E., Meinke, M.C. (2017). Radical scavenging activity of a sunscreen enriched by antioxidants providing protection in the whole solar spectral range. *Pharmaceutical Sciences*. 30, 81-89.
- [83] Lucas, B. Franco., de Moraes, M.G., Santos, T.D., Costa, J.A.V. (2018).

Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. *LWT-Food Science and Technology*.90, 270-276.

[84] Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*. 16, 41-46.

[85] Laws A., Gu, Y., Marshall. (2001). Biosynthesis, caractérisation and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. 19, 597-625.

[86] Scriben, R. (1984). Biotechnologie. (Eds technique et document Lavoisier).pp.66.

[88] Comte S., Guibaud, G., Baudu, M. (2005). Biosorption properties of cellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: soluble or bound. *Process Biochemistry*. 41, 815-823.

[87] Otero, A., Vincenzini, M. (2003) Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology*. 102, 143-152

[89] Trabelsi L. (2009). Identification et caractérisation des polymères extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* Compère (1968), Université de Monastir, 126 pp. Tunisie

[90] De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of hétéropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11, 687-707.

[91] Nicolaus B., Panico A., Lama L., Romano I., Manca M.C., De Giulio A., Gamdacorta A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of hétérocystous and non hétérocystous cyanobactéria. *Phytochemistry*. 52, 693-647.

[92] Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P.H. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol Advances*. 34,1159-1179.

[93] Chi, Z., Su, C.D., Lu, W.D. (2006). A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. *Bioresource Technology*. 98, 1329–1332.

[94] Kawaguchi, T., Decho, A.W. (2002). A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric sécrétions (EPS) in influencing CaCO₃ polymorphism. *Journal of Crystal Growth*. 240, 230-235.

[95] Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis R., Tamagnini, P.(2009)Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition,

structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Review*. 33, 917-941.

[96] Parikh, A., Madamwar, D. (2006). Partial caractérisation of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology*. 97, 1822-1827.

[97] Van Casteren, W.H.M., Dijkema, C., Schols, H.A., Beldman, G., Voragen, A.G.J. (1998). Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* sub sp. cremoris B40. *Carbohydrate Polymers*. 37, 123-130.

[98] Rossi, F., De Philippis, R. (2016). Exocellular polysaccharides in microalgae and cyanobacteria: chemical features, role and enzymes and genes involved in their biosynthesis. In: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds). *The physiology of microalgae*. Springer, Dordrecht. pp 565-590.

[99] Pereira S. B., Mota R., Santos C. L., De Philippis R. & Tamagnini P. in *Advances in Botanical Research: Genomics of Cyanobacteria Vol. 65* (eds Chauvat F. & Cassier-Chauvat C.) Ch. 7, 235–279 (Academic Press, 2013).

[100] Hokputsa, S., Hu, C., Paulsen, B.S., Harding, S.E. (2003). A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. *Carbohydrate polymers*. 54, 27-32.

[101] Boelsa, I.C., Van Kranenburga, R., Hugenholtza, J., Kleerebezema, M., De Vosa, W.M. (2001). Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 11, 723-732

[102] De Winder, B., Staats, N., Stal, L.J., Paterson, D.M. (1999). Carbohydrate écretion by phototrophic communities in tidal sediments. *Journal of sea researches*. 42, 131-146.

[103] Atkinsin R.J., Gordon J.D.M., Gibson, R.N. (2004). The essentiel rôle of exopolymers (EPS) in aquatic systems. (Eds CRC Press). p 548.

[104] Decho, A.W., Visscher, P.T., Reid, R.P. (2005). Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 219, 71-86.

[105] Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W. (2002). Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*. 203, 263-278.

[106] De Philippis, R., Faraloni, C., Sili, C., Vincenzini, M. (2005). Populations of exopolysaccharide-producing cyanobactéria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). *Science of the Total Environment*.

353, 360–368.

[107] Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., Sakamoto, T. (2005). Crucial rôle of extracellular polysaccharides in dessication and freezing tolérance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 7327-7333.

[108] Nicklin, J., Graemicook, K., Paget, T., Killington, R. (1999). L'essentiel de microbiologie.(edsBERTI).p 86.

[109] Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., Nascimento, O.R. (2005). The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an ERP study. *Process Biochemistry*. 40, 2215-2224.

[110] Stal, L.J., Wolfstein, K. (2002). Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatom: effet of irradiance and temperature. *Marine Ecology Progress Series*.236, 13-22.

[111] Moreno, J., Vargas M.A., Olivares H., Rivas J., Guerrero M.G. (1998). Exopolysaccharides production by cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. 60, 175-182.

[112] Collic-jouanlt, S., Zanchetta P., Helley D., Ratiskol J., Sinqui C., Fisher A.M., Guezennec J. (2004). Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie*. 52, 127-130.

[113] Guezennec, J. (2004). Les bactéries des sources hydrothermales profondes a l'origine de nouvelles molécules bioactives ?, Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement [En ligne], Volume 5 Numéro 3 | décembre 2004, mis en ligne le 01 décembre 2004, consulté le 22 Septembre 2014. URL : <http://journals.openedition.org/vertigo/3214> ; DOI : 10.4000/vertigo.3214.

[114] Triveni, R., Shamala, T.R., Rastogi, N.K. (2001). Optimized production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry*. 36, 787-795.

[115] Anita, I., Kalpana, M., Bhavanath, J. (2006). Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 220–222.

[116] Duboc, P., mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11, 759–768.

[117] Morris, G.A., Li, P., Puaud, M., Liu, Z., Mitchell, J.R., Harding, S.E. (2001). Hydrodynamic caractérisation of the exopolysaccharide from the halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02: a comparison with xanthan.

Carbohydrate Polymers .44, 261-268.

[118] Parada, J.L., De Caire, G., De Mule, M.C.Z., De Cano, M.M.S. (1998). Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology*. 45, 225-228.

[119] Raposo, M.P.F.J., Morais, R.M.S.C., Morais, R.M.S.C (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine drugs*, 11, 233-252.

[120] De Caire, G.Z., De Cano, M.S., Palma, R.M., De Mule, C.Z. (2000). Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biology & Biochemistry*. 32, 1985-1987.

[121] Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nystrom A., Pettersen J. , Bergman R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 42, 3-40.

[122] Goupy, J. (2006). Introduction aux plans d'expériences.(eds Dunod). p 322.

[123] Goupy, J. (1997). Plan d'expériences. Technique de l'ingénieur. Traité, analyse et caractérisation .pp.1-24.

[124] Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 111, 1-61.

[125] Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Review*.35, 171–205.

[126] Khatum, R., Hossain, M.M., Begum, S.M.S., Majid, F.Z. (1994). *Spirulina* culture in Bangladesh IV. Developpement of simple, inexpensive culture media suitable for rural or domestic level cultivation of *Spirulina* in Bangladesh. (Bangladesh), *Journal of Scientific and Industrial Research*. 29, 163–166.

[127] Abdelhedi, O., Nasri, R., Souissi, N., Nasri, M., Jridi, M. (2016). Sulfated polysaccharides from common smooth hound: Extraction and assessment of anti-ACE, antioxidant and antibacterial activities, *Carbohydrate Polymers*.152, 605-614.

[128] Kumar D., Dhar D.W., Pabbi S., Kumar N., Walia S. (2014). Extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*. 19, 184-188.

[129] Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P.F., Kabke, K., Weber, A. (2002). Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface

methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 603–607.

[130] AOAC. (2000). Official methods of analysis (17th Ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

[131] Crooke, W. M., Simpson, W.E. (1971). Determination of Ammonium in Kjeldahl Digests of Crops by an Automated Procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2, 9–10.

[132] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J, Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265–275.

[133] Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

[134] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animals Tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497- 509.

[135] Rezanka, T., Dor, I., Prell, A., Dembitsky, V.M. (2003). Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. *Folia Microbiologia (Praha)*. 48, 71-75.

[136] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350–356.

[137] Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.

[138] Bryant, D.A., Glazer, A.N., Eiserling, F.A. (1976). Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp.. *Archives of Microbiology*. 110, 61–75.

[139] Bennett, A., Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*. 58, 419-435.

[140] Lewin, R.A.(1956). Extracellular polysaccharides of green algae. *Canadian Journal of Microbiology*. 2, 665-672.

[141] Lloyd, A.G., Dodgson, K.S., Price, R.B., Rose, F.A. (1961). Infrared studies on sulfate esters. I. Polysaccharide sulfates. *Biochimica et Biophysica Acta*. 46, 108–115

[142] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

[143] Nirmala, C., Prakash, D.V. Venkataraman (1992). Physico-chemical and

functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). *Food research*, 36, 569-577.

[144] Antelo, F.S., Costa, J.A., Kalil, S.J. (2008). Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*. 41 ,43-47.

[145] Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Bunnag. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*. 47, 659-664.

[146] Gennadios A., Handa, A., Froning, G.W., Weller, C. L., Hanna, M. A. (1998). Physical properties of egg white-dialdehyde starch films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1297-1302.

[147] Pearce, K.N., Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 26,716-723.

[148] Shahidi, F., Han, X.Q., Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*).*Food Chemistry*. 53, 285-293.

[149] Macosko, C.W. (1994). *Rheology Principles, Measurements and Applications*, Willey Edition. p 586.

[150] ISO 527-3: (1995). Determination of tensile properties (Part 3). Test conditions for films and sheets.

[151] Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P., Groot, A.D., Evstatieva, L.N. (2002) Screening of plant extract for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry annals*. 13, 8-17.

[152] Yildırım, A., Mavi, A., Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49, 4083-4089.

[153] Decker, E.A., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 38, 674-677.

[154] Bersuder, P., Hole, M., Smith,G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 75, 181-187.

[155] Vanden Berghe, A.J., Vlietinck A. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants, In: Hostettmann, K.: *Methods in plant biochemistry*. 47-69.

[156] Peltier, M.R., Wilcox, C.J., Sharp, D.C. (1998). Technical note: application of the Box-Cox data transformation to animal science experiments. *Journal of Animal Science*. 76, 847–849.

[157] Jolliffe, I. (2002). *Principal component analysis, 2nd ed.*, Springer, New York. p 448.

[158] Iltis, A. (1970). Phytoplankton des eaux salées du Kanem (Tchad) IV. Note sur les espèces du genre *Oscillatoria*, sous-genre *Spirulina* (Cyanophyta). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Hydrobiol.* Vol. IV: 130-134.

[159] Richmond A. 1986. *CRC Hand book of microalgal mass culture.* (CRC Press). p 70.

[160] Vonshak, A., Torzillo, G. (2004). In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 57- 82

[161] Doumandji, A., Boutekrabt, L., Saidi, N., A., Doumandji, S., Hamerouch, D., Haouari, S. (2012). Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal, *Nature et Technology (Algérie)*, 06, 40-50.

[162] Boussiba, S., Richmond, A.E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*. 120, 155-159.

[163] Grama, B.S., Chader, S., Khelifi, D., Agathos, S.N., Clayton, J. (2014). Induction of canthaxanthin production in a *Dactylococcus* microalga isolated from the Algerian Sahara. *Bioresource Technology*. 151, 297–305.

[164] Ross, E., Dominy, W. (1990). The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulina platensis*) for poultry. *Poultry Science*. 69, 94-80.

[165] Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cell. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 101, 223- 226

[166] Xu, H., Miao, X.L., Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499-507.

[167] Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., Georgakakis, D. (2013a). Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

Energies, 6, 3937-3950

[168] Aráoz, R., Häder, D.P. (1999). Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV-B in the cyanobacterium *Nostoc*. *Plant Physiology and Biochemistry*.37, 223–229.

[169] Oliveira, C.A., Oliveira, W.D.C., Riberia, S.M.R., Stringheta, P.C., Galavo do Nascimento A. (2014). Effect of light intensity on the production of pigments in *Nostroc* spp. *Europeen Center for Research*, 2, 23-36.

[170] Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Shestakov, S.V., and Sokolenko, A. (2004). Involvement of the Spp A1 peptidase in acclimation to saturating light intensities in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*. 186, 3991-3999.

[172] Wyman, M., Fay, P. (1986). Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria) I. The influence of light quantity. *Proceeding of Royal Society of London B*. 227, 367–380

[172] Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., Bugbee, B. (2013). Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content trade off in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*. 131,188-194.

[173] Markou, G., Nerantzis E. (2013b). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advences*. 31, 1532–1542.

[174] Kromkamp, J. (1987). Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 21, 457–465

[175] Steiger, S., Schafer, L., Sandmann, G. (1999). High-light-dependent up regulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 52, 14–18.

[176] Choudhoury, N.K., Behera, R.K. (2001). Photo inhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*. 39, 481-488.

[177] Olaizola, M., Duerr, E.O. (1990). Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*. 2, 97-104.

[178] Lamers, P.P., Van de Laak, C.C.W., Kaasenbrood, P.S., Lorier, J., Janssen, M., DeVos, R.C.H., Bino, R.J., Wijffels, R.H. (2010), Carotenoids and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology Bioengineering*. 106, 638–648.

[197] Del Campo, J.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M.I., Rivas, J., Guerrero, M.G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorellazofingiensis*

(Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 848–854.

[180] Mur, L.R., Elema, R.P. (1983). The influence of light quality on the growth of some phytoplankton species. *Hydrobiological Bulletin*. 18,73–74

[181] Khajepour, F., Hosseini, S.A., Ghorbani Nasrabadi, R., Markou, G. (2015). Effect of light intensity and photoperiod on growth and biochemical composition of a local isolate of *Nostoc calcicola*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176, 2279–2289.

[182] Post, A.F., DeWit, R., Mur, L.R. (1985). Interactions between temperature and light intensity on growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Plankton Research*. 7, 487–495.

[183] Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M, Malcata, F.X. (2010). Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 87, 791–801.

[184] Chrismadha, T., Borowitzka, M.A. (1994). Effect of cell-density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*. 6, 67–74

[185] Ho, S.H., Chen, C.Y, Chang, J.S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresources Technology*. 113, 244–252.

[186] Tedesco, M.A., Duerr, E.O. (1989). Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology*. 1, 201-209.

[187] Sassano, C.E.N., Gioielli, L.A., Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S, Sato, S., Converti, A., Carvalho J.C.M. (2010) .Evaluation of the composition of continuously cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass Bioenergy*. 34, 1732–1738.

[188] Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (1988). *Dunaliella*. In: Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. (Eds) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 27–58.

[189] Ben-amotz, A., Katz, A., Avron, M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 18, 529–537.

[190] Lamers, P.P., Janssen, M., De Vos, R.C.H., Bino R.J., Wijffels, R.H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular

green microalga. *Journal of Biotechnology*, 162, 21–27.

[191] Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., Kessly, D. (1990). Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*. 2, 111–119.

[192] Lu, C., Vonshak, A. (2002). Effects of salinity on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum*. 114, 405–413.

[193] Hifney, A.F., Issa, A.A., Fawzy, M.A., (2013). Abiotic stress induced production of β -carotene, allophycocyanin and total lipids in *Spirulina* sp..*Journal of Biology and Earth Sciences*. 3,54–64.

[194] Chen, L.Z., Li, D.H., Song, L.R., Hu, C.X., Wang, G.H., Liu, Y.D. (2006). Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus*Gom. *Journal of Integrative Plant Biology*.48, 914–919.

[195] Depraetere, O., Pierre, G., Deschoenmaecker, F., Badri, H., Foubert, I., Leys, N., Markou, G., Wattiez, R., Michaud, P., Muylaert., K. (2015). Harvesting carbohydrate-rich *Arthrospira platensis* by spontaneous settling. *Bioresource Technology*. 180, 16–21.

[196] Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Manca, M.C., Romano, I., Gambacorta, A. (1996). Effect of growth conditions on endo and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10C. *Phytochemistry*. 42, 655–659.

[197] Sudo, H., Burgess, J.G., Takemasa, N., Nakamura, Matsunaga, T. (1995). Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*, *Current Microbiology*. 30, 219-222.

[198] Hu, C., Liu, B.S., Paulsen, D., Petersen, D., Klaveness. (2003). Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain, *Carbohydrate Polymers*. 54, 33–42.

[199] Su, C., Zhenming, C., Weidong, L. (2007). Optimization of medium and cultivation condition for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 25, 411-417.

[200] Ozturk, S., Aslim, B. (2010). Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress.*Environmental Science and Pollution Research* . 17, 595-602.

[201] Kumar, A.S., Mody K., Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of Basic Microbiology*. 47,103–117.

[202] Suyatma, N.E., Copinet, A., Tighzert, L., Coma V. (2004). Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends.

Journal of Polymers and the Environment. 12, 1-6.

[203] Rochas, C., Lahaye, M., Yaphe, W. (1986). Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Botanica Marina*. 29 , 335-340.

[204] Santhiya, D., Subramanian, S., Natarjan, K.A. (2002). Surface chemical studies on sphalerite and galena using extracellular polysaccharides isolated from *bacillus polymyxa*. *Journal of Colloid and Interface Sciences*. 256, 237-248.

[205] Maalej, H., Hmidet, N., Boisset, C., Bayma, E., Heyraud, A., Nasri. M. (2016). Rheological and emulsifying properties of a gel-like exopolysaccharide produced by *Pseudomonas stutzeri* AS22, *Food Hydrocolloids* .52, 634-647.

[206] Zhou, F., Wu, Z., Chen, C., Han J., Ai, L., Guo, B. (2014) . Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. *Food Hydrocolloids*. 36, 362-368.

[207] Andhare, P., Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., Pathak, H. (2017). Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample, *Food Hydrocolloids*. 64, 1-8.

[208] Najji, S., Razavi, Karazhiyan, S.M.A. H. (2012). Effect of thermal treatment on functional properties of cress seed (*Lepidium sativum*) and xanthan gums: A comparative study. *Food Hydrocolloids*. 28, 75-81.

[209] Velasco, S.E., Areizaga, J., Irastorza, A., Duenas, M.T., Santamaria, A., Munoz, M.E. (2009). Chemical and rheological properties of the beta-glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57, 1827-1834.

[210] Saha, D., Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, *Journal of Food Sciences and Technology*. 47, 587-597.

[211] Hesarinejad, M., Koocheki, A., Razavi, S. (2014) Dynamic rheological properties of *lepidium perfoliatum* seed gum: effect of concentration, temperature and heating/cooling rate. *Food. Hydrocolloids*. 35, 583-589.

[212] Bao, H., You, S., Cao, L., Zhou, R., Wang, Q., Cui, S.W. (2017). Chemical and rheological properties of polysaccharides from fruit body of *Auricularia auricular-judae*, *Food Hydrocolloids*. 22, 223-230.

[213] Gottlieb, M., Macosko, C.W., Benjamin, G.S., Meyers, K.O., Merrill .E. W. (1981). Equilibrium modulus of model poly (dimethylsiloxane) networks, *Macromolecules*. 14, 1039-1046.

[214] Rochefort, W., Middleman, S. (1987). Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments, *Journal of*

Rheology. 31, 337.

[215] Miao, M., Huang, C., Jia., Cui, X.S.W., Jiang, B., Zhang, T. (2015). Physicochemical characteristics of a high molecular weight bioengineered α -D-glucan from *Leuconostocitreum*SK24. 002. *Food Hydrocolloids*. 50, 37-43.

[216] Sun, F., Huang, Q., Wu, J. (2014). Rheological behaviors of an exopolysaccharide from fermentation medium of a *Cordyceps sinensis fungus* (Cs-HK1). *Carbohydrate Polymers*. 114, 506-513.

[217] Freitas F., Alves, V.D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira R., Reis, M.A.M. (2009) . Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*. 78, 549-556.

[218] Hussein, M.D.M., Ghaly, M.F., Osman, M.Y., Shalaby, A.G., Helal, M.M (2015). Production and prebiotic activity of exopolysaccharides derived from some probiotics. *Egypt Pharmaceutical Journal*. 4, 1-9.

[219] Trabelsi, L., Chaieb, O., Mnari, A., Abid-Essafi, S., Aleya, L. (2016). Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16, 210-220.

[220] Chen, X., Wu, M., Yang, Q., Wang, S. (2017). Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. *LWT-Food Science and Technology*.77, 468-474.

[221] Pan-utai, W., Kahapana, S., Iamtham. (2017). Extraction of C-phycoyanin from *Arthrospira (Spirulina)* and its thermal stability with citric acid. *Journal of Applied Phycology*. 30, 231-242.

[222] Hadiyanto ,M.S., Majid, D., Setyawan, D., Sutanto H., (2017). Improvement of stability and antioxidant activities by using phycocyanin -chitosan encapsulation technique, *IOP. Conf. Ser.: Earth and Environmental Science*. 55, 1-9.

[223] Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. *Biomedicine Research International*. 742859.doi: 10.1155/2013/742859. Epub 2013 Aug 26.

[224] Martinez-Palma, N., Martinez-Ayala, A., D'ávila-Ortiz, G. (2015). Determination of antioxidant and chelating activity of protein hydrolysates from spirulina "Arthrospira maxima" obtained by simulated gastrointestinal digestion. *Revista Mexicana*

De Ingeniería Química. 14, 25-34.

[225] Liu, L.N., Chen, X.L., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C. (2003). Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red alga : an overview. *Biochemica Biophysica Acta: Bioengineering*. 1708, 133-142.

[226] Karshikoff, A., Ladenstein, R. (1998). Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Engineering*. 11, 867–872.

[227] Cohn, E.J, Edsall, J.T. (1943). Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions, Reinhold Publishing Corporation, New York.p 686.

[228] Rastogi, R. P., Sonani, R., Madamwar, D. (2015). Physico-chemical factors affecting the in vitro stability of phycobiliproteins from *Phormidium rubidum* A09DM. *Bioresource Technology*. 190, 219–226

[229] Kannaujiya, V.K., Kumar, D., Richa, J.P., Sokner, A.S., Rajneesh, V.S., Sundaram, S., R.P. Sinha., R.P. (2017). Recent Advances In Production And The Biotechnological Significance Of Phycobiliproteins, in: R.P.S.a. Richa (Ed.) *New Approaches in Biological Research*, Nova Science Publisher. p 329.

[230] Dalgleish, D.G. (2004). Food emulsions: their structures and properties.*Food Emulsions*. 1-44.

[231] Lawal, O.S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*. 86, 345-355.

[232] Dagorn, Scaviner, C., Gueguen, J., Lefebvre, J.(1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *Journal of Food Sciences*. 52, 335-341.

[233] Phillips, M.C. (1981). Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology*. 35, 50-57.

[234] Guo, Q., Mu, T. (2011). Emulsifying properties of sweet potato protein: effect of protein concentration and oil volume fraction. *Food Hydrocolloids*. 25, 98-106.

[235] Jridi, M., Nasri, R., Lassoued, I., Souissi, N., Mbarek, A., Barkia, A., Nasri, M. (2013a). Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from alkali-pretreated skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using pepsin. *Food Research International*. 54, 1680-1687.

[236] Aluko, R., Yada, R. (1995). Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and

functional properties, *Food Chemistry*. 53, 259-265.

[237] Zayas, J.F. (1997). *Functionality of proteins in food*, Springer Science & Business Media. p 373.

[238] Devi, M.A.L, Venkataraman, L.. (1984). Venkataraman, functional properties of protein products of mass cultivated blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Food Sciences*. 49, 24-27.

[239] Bermejo, P., Piñero, E., Villar, A.M. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulinaplatensis*. *Food Chemistry*. 110, 436-445

[240] Zhou, Z., Chen, X., Chen, C., Zhang, Y. (2003). Effect of apoprotein on antioxidant activity of phycobiliproteins. *Marine Sciences*. 279, 77-81.

[241] Madhyastha, S., Sivashankari, T., Vatsala, T.M. (2009). C-phycocyanin from *Spirulina fussiformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity. *Biochemical Engineering Journal*. 43, 221-224.

[242] Sharma, O.P., Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113, 1202-1205.

[243] Sarada, D., Kumar, S.C., Rengasamy, R. (2011). Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria, World. *Journal of microbiology and Biotechnology*. 27,779-783.

[244] Mozhaev, V., Martinek, K. (1984). Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microbiology and Technology*. 6, 50-59.

[245] Patel, A., Pawar, R., Mishra, S., Sonawane, S., Ghosh, P. (2004). Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycocyanin. 41, 254-257.

[246] Pumas, C., Vacharapiyasophon, P., Peerapornpisal, Y., Leelapornpisid, P., Boonchum, W., Ishii, M., Khanongnuch, C. (2011). Thermostability of phycobiliproteins and antioxidant activity from four thermotolerant cyanobacteria. *Phycological Research*. 59, 166-174.

[247] Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C., Carpenter, J.F. (1993). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Review*. 10, 1-28.

[248] Cleland, J.L., Lam, X., Kendrick, B.J., Yang, T.H., Yang, D., Overcashier, D., Brooks, Hsu C., Carpenter, J.F. (2001). A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 90, 310-321.

[249] Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, Ferrari, M. D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*. 49, 154-159.

[250] Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmacy*. 203, 1-60.

[251] Bhayani, K., Mitra, M., Ghosh, T., Mishra, S. (2016). C-Phycocyanin as a potential biosensor for heavy metals like Hg²⁺ in aquatic systems. *RSC Advances*. 6, 111599-111605.

[252] Shameli, K., Bin, M., Ahmad, S.D., Jazayeri, S., Sedaghat, P., Shabanzadeh, H., Jahangirian, H., Mahdavi, M., Abdollahi, Y. (2012). Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 6639-6650.

[253] Aksel, T., Majumdar, A., Barrick, D. (2011). The contribution of entropy, enthalpy, and hydrophobic desolvation to cooperativity in repeat-protein folding. *Structure*. 19, 349-360.

[254] Roser, B.J. (1991). Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying. *Biopharmaceutical*. 5, 44-53.

[255] Franks, F. (1994). Long-term stabilization of biologicals, *Nature Biotechnology*. 12, 253-256.

[256] Fox, K.C. (1995). Putting proteins under glass, *Science*, 267, 1922-1924.

[257] Fukui, K., Saito, T., Noguchi, Y., Kodera, Y., Matsushima, A., Nishimura, H., Inada, Y. (2004). Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes and Pigments*. 63, 89-94.

[258] Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., Ayadi, M.A., Fendri, I., Attia, H., Abdelkafi, S. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT-Food Science and Technology*. 88, 323-330.

[259] Buchweitz, M. Natural solutions for blue colors in food. In: *Handbook on natural pigments in food and beverages*. Woodhead Publishing, (2016) 355-384

[260] Leceta, I., Guerrero, P., Caba, K.D.L. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*. 93, 339-346.

[261] Bergo, P., Moraes, I.C.F., Sobra, P.J.A. 1. (2013). Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films. *Food Hydrocolloids*. 32, 412-415.

[262] Wang, S., Marcone, M.F., Barbut, S., Barbut, Lim, L-T. (2012). Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*. 49, 80-91.

[263] Hosseini, S.F., Javidi, Z., Rezaei, M. (2016). Efficient gas barrier properties of multi634 layer films based on poly(lactic acid) and fish gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 92, 1205–1214.

[264] Gomez-Estaca, J., Bravo, L., Gomez-Guillen, M. C., Aleman, A., Montero, P. (2009a). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*. 112(1), 18–25.

[265] Li, J. H., Miao, J., Wu, J. L., Chen, S. F., Zhang, Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166–173.

[266] López, D., Márquez, A., Gutiérrez-Cutiño, M., Venegas-Yazigi, D., Bustos, R., Matiacevich, S. (2017). Edible film with antioxidant capacity based on salmon gelatin and boldine, *LWT–Food Science and Technology*. 77,160-169.

[267] Hoque, M. S., Benjakul, S., Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*. 25, 1085–1097.

[268] Cerqueira, M.A., B.W.S., Souza, J.A. Teixeira, A.A., Vicente. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films a comparative study. *Food Hydrocolloids*. 27 ,175-184.

[269] Jackson, M., Choo, L. P., Watson, P. H., Halliday, W. C., Mantsch, H. H. (1995). Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1270, 1-6.

[270] Hanani, Z. A. N., Beatty, E., Roos, Y. H., Morris, M. A., & Kerry, J. P. (2013). Development and characterization of biodegradable composite films based on gelatin derived from beef, pork and fish sources. *Foods*. 2, 1-17

[271] Kchaou, H., Jridi, M., Abdelhedi, O., Benbettaieb, N., Karbowiak, T., Nasri, M., Debeaufort, F. (2017). Development and characterization of cuttlefish (*Sepia officinalis*) skin gelatin-protein isolate blend films, *International Journal of Biological Macromolecules*. 105, 1491-1500.

[272] Abdelhedi, O., Nasri, R., Jridi, M., Kchaou, H., Benbettaïb,N., Karbowiak, T., Debeaufort, F., Nasri, M. (2018) Composite bioactive films based on smooth-hound

viscera proteins and gelatin: Physicochemical characterization and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*. 74, 17-186.

[273] Rattaya, S., Benjakul, S., Prodpran, T. (2009). Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. *Journal of Food Engineering*. 95, 151-157

[274] Jridi, M., Souissi, N., Mbarek, A., Chadeyron, G., Kammoun, M., Nasri, M. (2013b) .Comparative study of physico-mechanical and antioxidant properties of edible gelatin films from the skin of cuttlefish. *International Journal of Biological Macromolecules*. 6, 17– 25.

[275] Liang, C., Jia, M., Tian, D., Tang, T., Ju, W., Ding, S., Tian, Ren, X., Wang, X. (2017). Edible sturgeon skin gelatine films: Tensile strength and UV light-barrier as enhanced by blending with esculine. *Journal of Functional Foods*. 37, 219–228.

[276] Lin, J., Wang, Y., Pan, D., Sun, Y., Ou, S., Cao, J. (2018). Physico-mechanical properties of gelatin films modified with Lysine, Arginine and Histidine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 108, 947-952.

[277] Kam, W.Y.J., Mirhoseeini, H., Abas, F., Hussain, N., Hedayatnia, S., Chong, H.L.F. (2018). Antioxidant activity enhancement of biodegradable film as active packaging utilizing crude extract from durian leaf waste. *Food Control*. 90, 66-72.

[278] Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., Rimbau, V. (2003). C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptides Sciences*. 4, 207-216.

[279] Kaushik, P., Abhishek, C. (2008). *in-vitro*antibacterial activity of lab grown culture of *S.platensis*. *Indian Journal of Microbiology*. 48, 348-352.

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES

Chentir Imene, Doumandji A. (2016). Evaluation de la croissance d'une souche de spiruline autochtone isolée du Sahara Algérien (*Arthrospira* sp.) et étude de l'effet de l'intensité de la lumière sur le taux de phycocyanine. *Agrobiologia*, 6, 176-183.

Chentir Imene, Doumandji A , Ammar J, Zili F, Jridi M, Markou G, et Ben Ouada H « Induced Change in *Arthrospira* Sp. (*Spirulina*) Intracellular and Extracellular Metabolites Using Multifactor Stress Combination Approach ». *Journal of Applied Phycology* 30, n° 3 accepté (à paraître juin 2018): 1563-74. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1348-3>.

Chentir Imene, Hamdi M, Doumandji A, HadjSadok A, Ben Ouada H, Nasri M, et Jridi M.

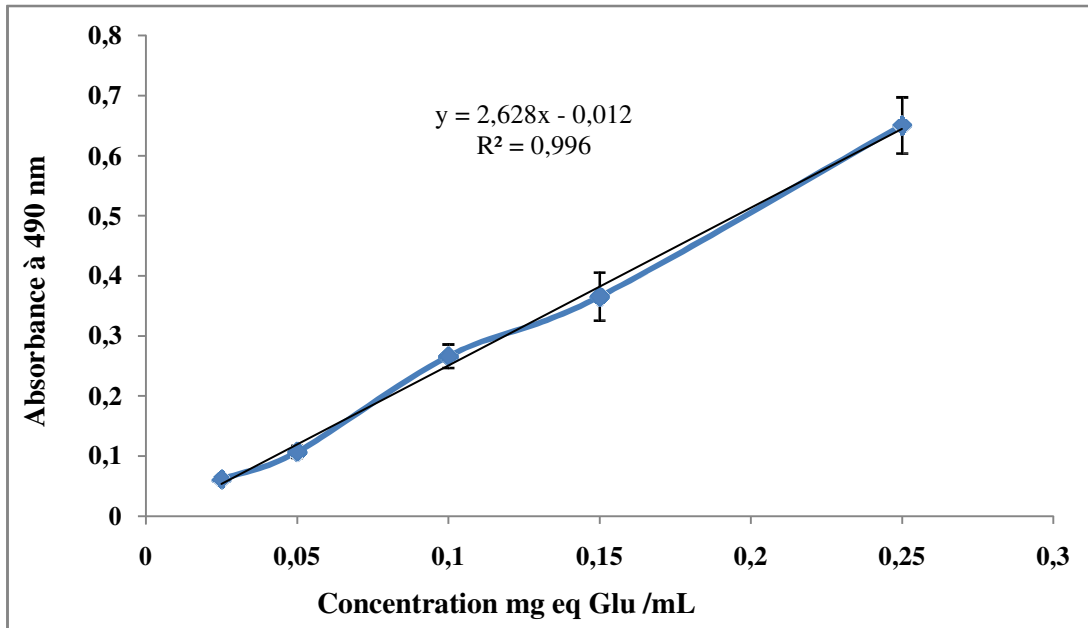
« Enhancement of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Production in *Spirulina* (*Arthrospira* Sp.) by Two-Step Cultivation Process and Partial Characterization of Their Polysaccharidic Moiety ». *International Journal of Biological Macromolecules* 105 (à paraître décembre 2017): 1412-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.009>.

Chentir Imene, Hamdi M, Li S, Doumandji A, Markou G, et Nasri M. « Stability, Bio-Functionality and Bio-Activity of Crude Phycocyanin from a Two-Phase Cultured Saharian *Arthrospira* Sp. Strain ». *Algal Research* 35 (novembre 2018): 395-406. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.013>.

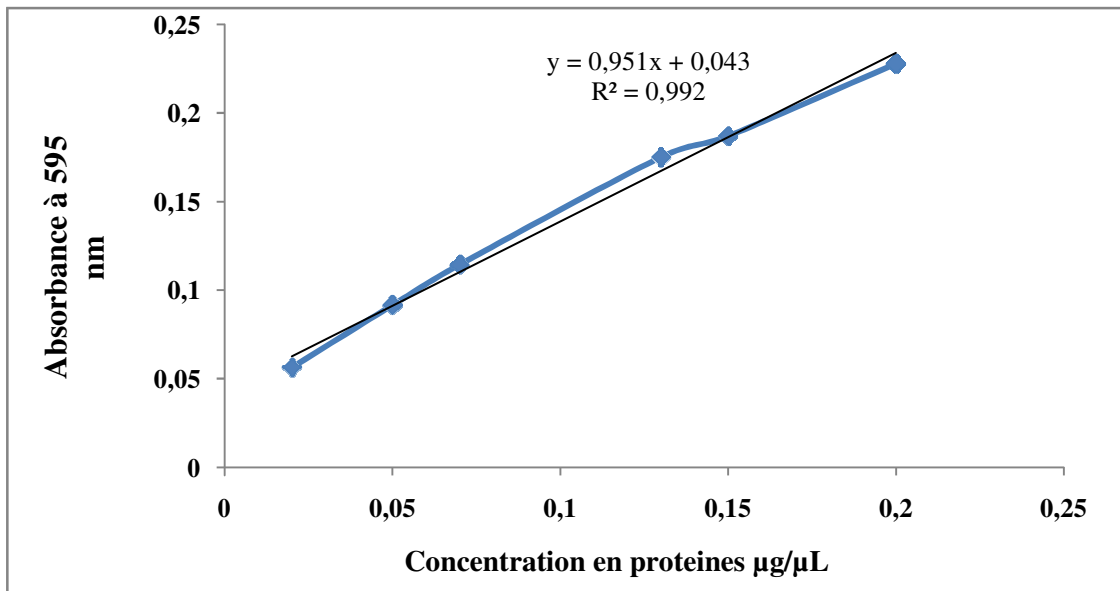
Chentir Imene, Kchaou H, Hamdi M, Jridi M, Li S, Doumandji A, et Nasri M.

« Biofunctional Gelatin-Based Films Incorporated with Food Grade Phycocyanin Extracted from the Saharian Cyanobacterium *Arthrospira* Sp. » *Food Hydrocolloids*. in press <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.034>.

Courbe d'étalonnage pour la détermination du taux de sucres totaux :

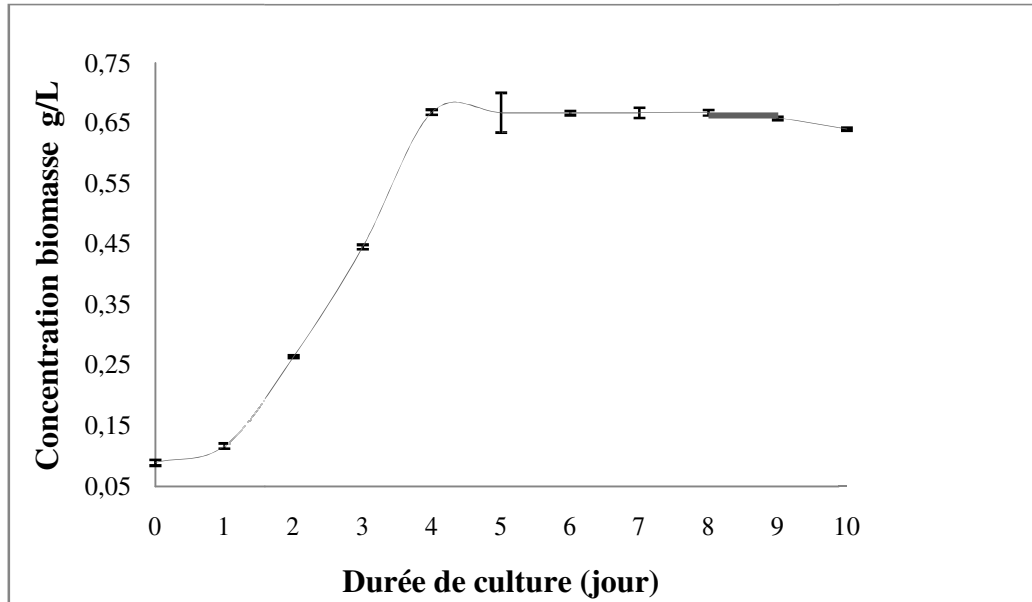


Courbe d'étalonnage pour la détermination du taux de protéines solubles (méthode de Bradford (1976)) :



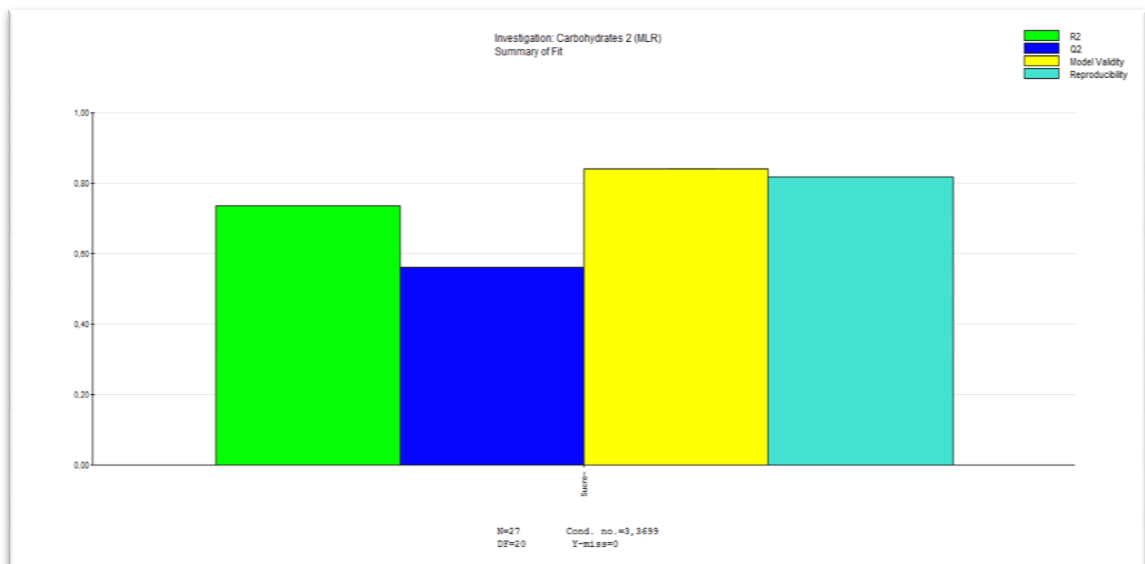
Annexe 2

Courbe de croissance d'*Arthrospira* sp. (10 L) menée dans les conditions optimales de croissance

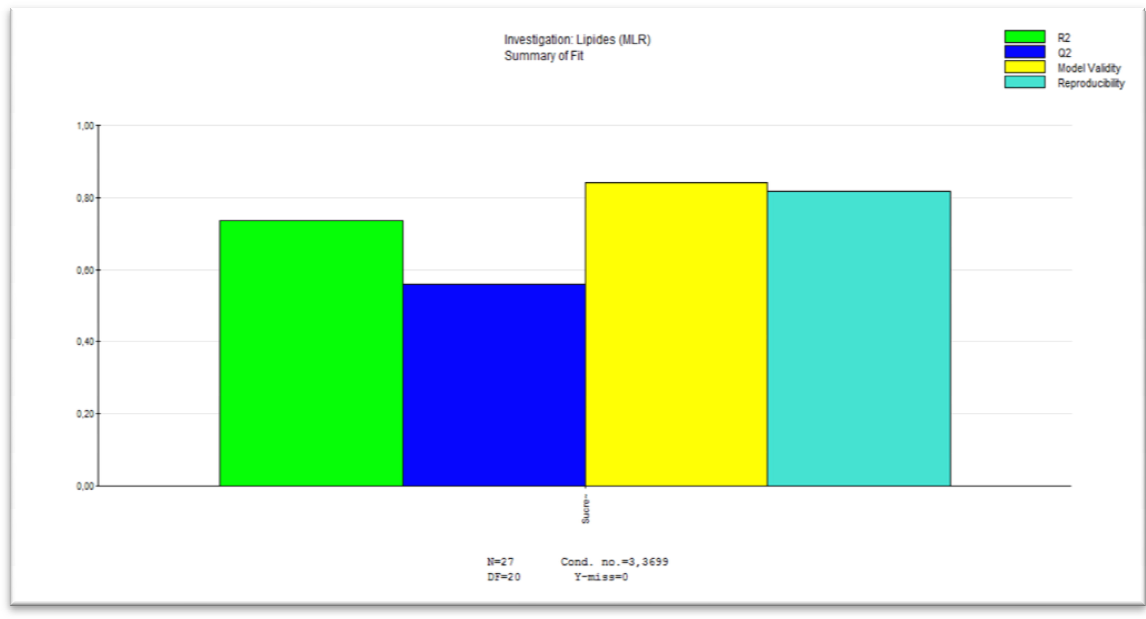


« Summary plot » des modèles obtenus :

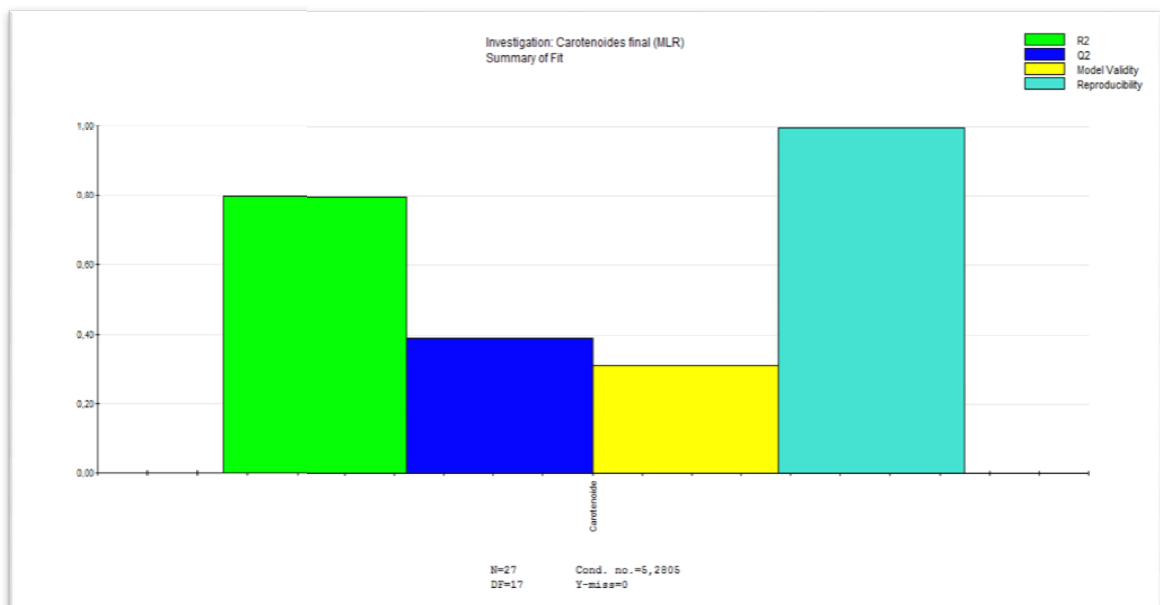
1.1. Sucres totaux :



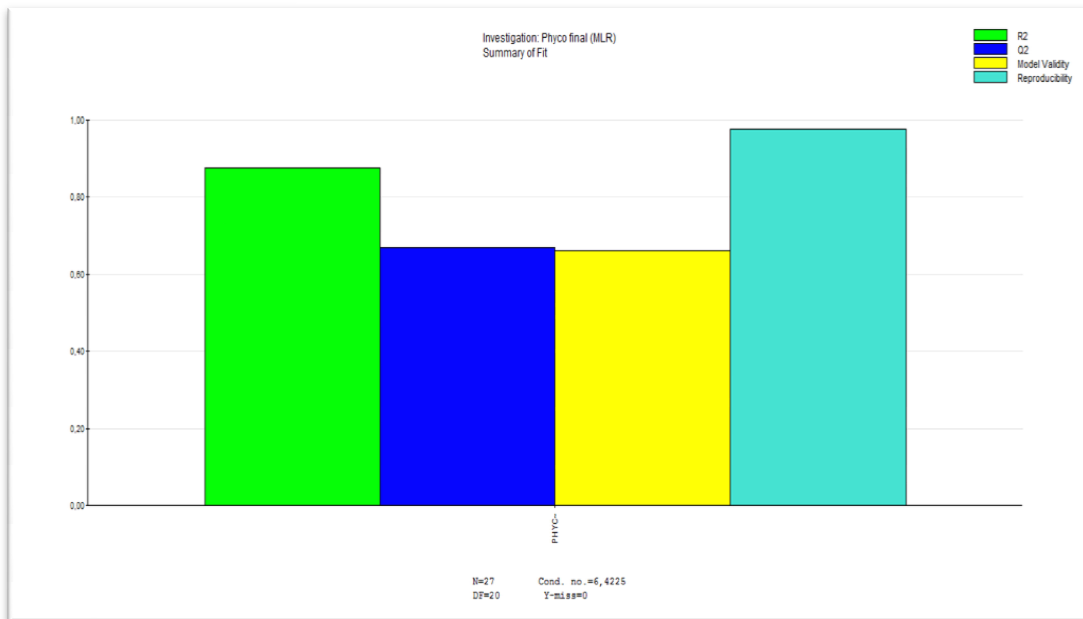
1.2. Lipides :



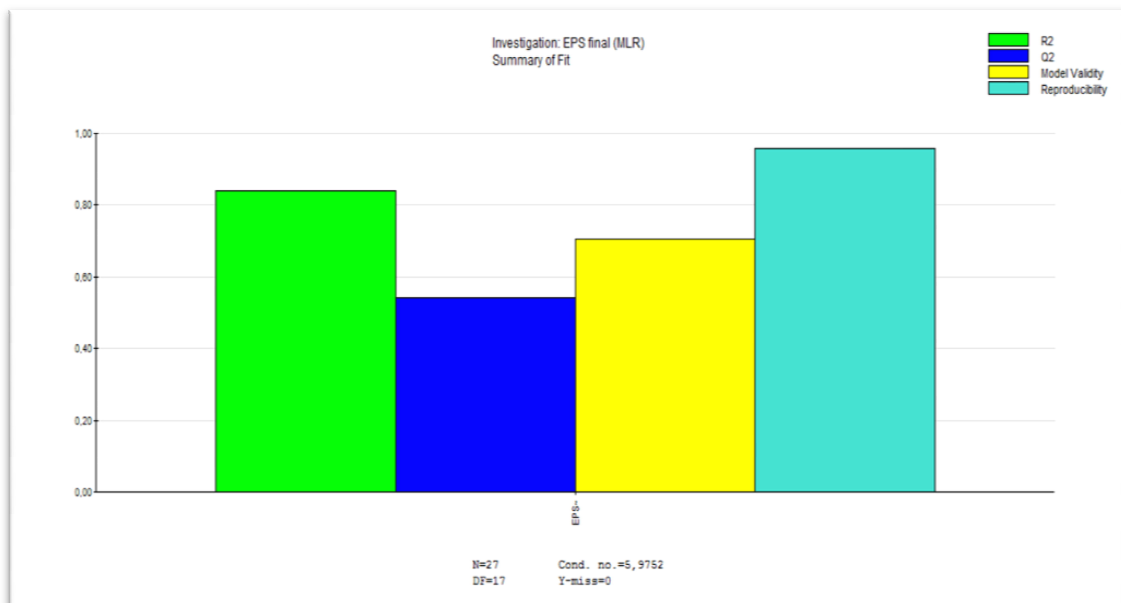
1.3. Caroténoïdes totaux



1.4. Phycobiliprotéines :

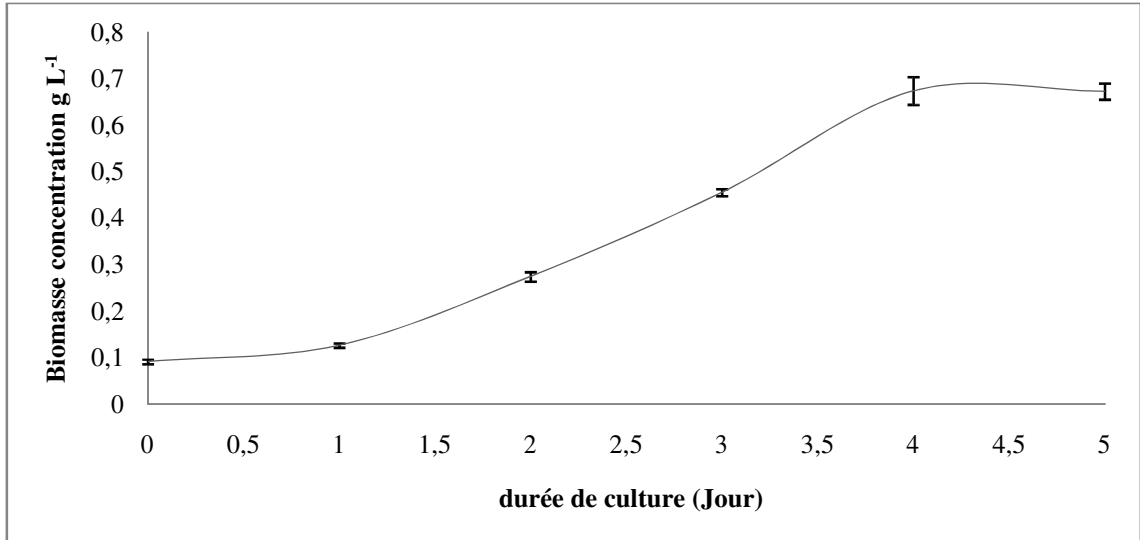


1.5. EPS :

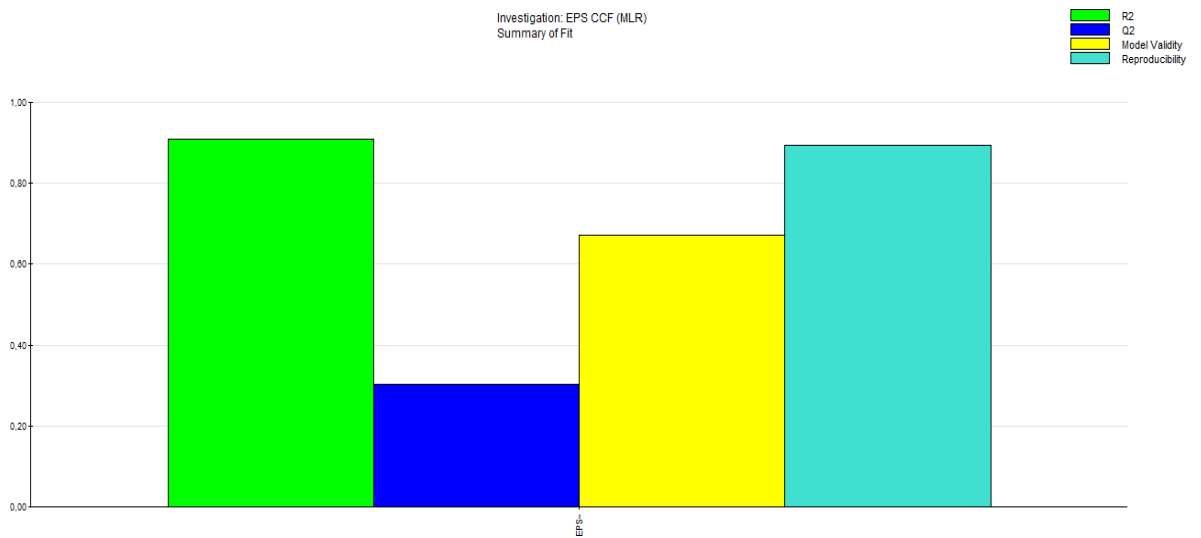


Annexe 3

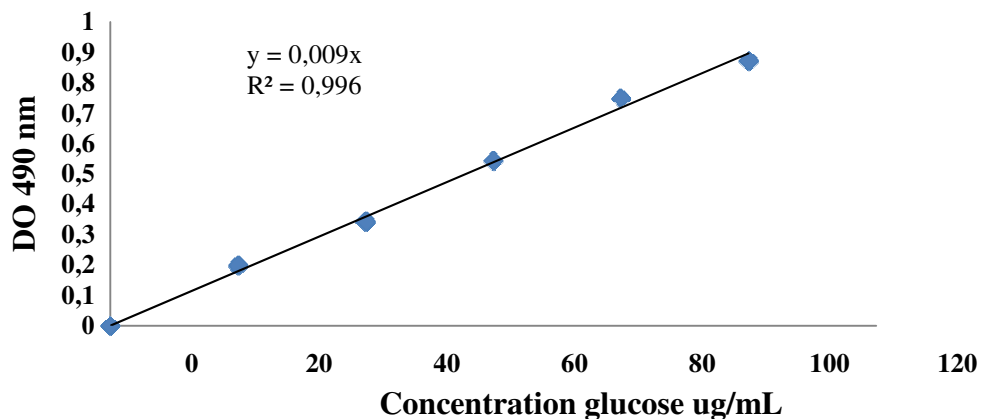
Courbe de croissance d'*Arthrospira* sp. (5 L) menée dans les conditions optimales de croissance



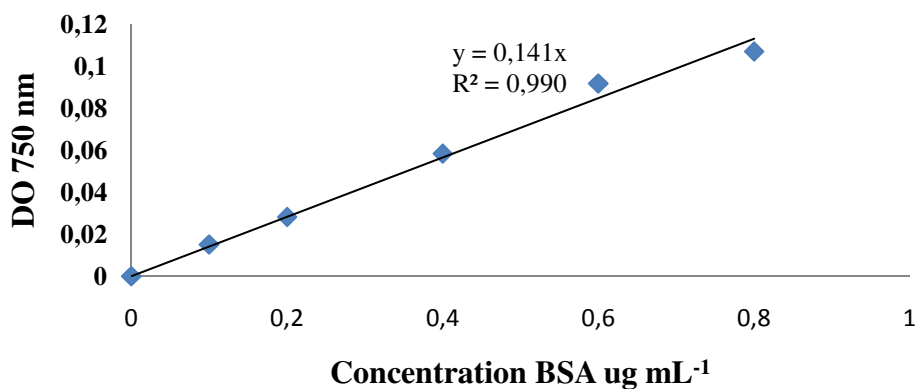
Graphique résumant les paramètres du modèle EPS après réajustement



Courbe d'étalonnage pour la détermination du taux de sucres totaux :



Courbe d'étalonnage pour la détermination du taux de protéines solubles (méthode de Lowry (1951))



Courbe d'étalonnage pour la détermination du taux des groupements sulfate

