

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

THESE DE DOCTORAT (EN SCIENCE)

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

**ÉXTRACTION ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS STRUCTURALES
D'UNE PROTÉINE BACTÉRIENNE : LA PHYCOCYANINE**

Par

Safia LOUNICI

Devant le jury composé de :

Pr. M. BENCHABANE	Professeur, U. S. D. Blida 1	Président
Pr. A. HADJ ZIANE-ZAFOUR	Professeur, U. S. D. Blida 1	Examinatrice
Pr. A. BITAM	Professeur, ESSAIA, Alger	Examineur
Pr. S. ALOUACHE	Professeur, ENSSMAL, Alger	Examinatrice
Pr. A. DOUMANDJI	Professeur, U. S. D. Blida 1	Co-Directrice de Thèse
Pr. L. BOUTEKRABT-BENHADJA	Professeur, U. S. D. Blida 1	Directrice de Thèse

Blida, Décembre 2024

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

THESE DE DOCTORAT (EN SCIENCE)

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

**ÉXTRACTION ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS STRUCTURALES
D'UNE PROTÉINE BACTÉRIENNE : LA PHYCOCYANINE**

Par

Safia LOUNICI

Devant le jury composé de :

Pr. M. BENCHABANE	Professeur, U. S. D. Blida 1	Président
Pr. A. HADJ ZIANE-ZAFOUR	Professeur, U. S. D. Blida 1	Examinatrice
Pr. A. BITAM	Professeur, ESSAIA, Alger	Examineur
Pr. S. ALOUACHE	Professeur, ENSSMAL, Alger	Examinatrice
Pr. A. DOUMANDJI	Professeur, U. S. D. Blida 1	Co-Directrice de Thèse
Pr. L. BOUTEKRABT-BENHADJA	Professeur, U. S. D. Blida 1	Directrice de Thèse

Blida, Décembre 2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

RESUME

Les cyanobactéries dénommées Spiruline, *Arthrospira* ou *Limnospira* sont des mines de nutriments bien connues dans le monde entier. Malgré leur longue histoire d'utilisation pour la consommation humaine, de nombreuses souches indigènes n'ont pas été étudiées. Dans le cadre de nos recherches, nous avons effectué une caractérisation génomique d'une souche algérienne isolée de Tamanrasset depuis 2004. Le génome de la *Limnospira sp. AlgLouSa11* a été séquencé et comparé (via ANI et PaSit4) à 21 génomes des genres *Arthrospira* et *Limnospira*, indiquant que *L. fusiformis KN01* étant le parent le plus proche (99,3 %) à la souche *L. sp. AlgLouSa11*.

L'analyse de la composition biochimique de la souche *AlgLouSa11* a montré qu'elle est très riche en protéines ($44,37 \pm 0,78$), en glucides ($33,43 \pm 1,77$) et en fibres ($7,54 \pm 0,43$). Ainsi qu'une large gamme de composés bioactifs à propriétés fonctionnelles dont les chlorophylles a et b et les phycocyanines (C-PC). Beaucoup d'études ont été consacrées à l'extraction de la phycocyanine en raison de ses applications pharmaceutiques et alimentaires. Dans notre travail, l'extraction de la C-phycocyanine, par solutions salines, a été optimisée en utilisant la RSM ; pour l'ensemble des variables testées, les facteurs qui semblent avoir des effets positifs sont le temps de macération, suivi de la concentration dans la cyanobactérie.

L'étude des propriétés structurantes par BET de la phycocyanine a montré qu'elle présente une surface spécifique de $3,4845 \text{ m}^2/\text{g} \pm 0,346$ avec une capacité moyenne d'adsorption de $C = 8,138$. La détermination de la tension interfaciale phycocyanine/air, phycocyanine/huile et leurs *modulus* ont montré que la PC ait des propriétés émulsifiantes meilleures comparativement aux propriétés moussantes.

La phycocyanine en solution, se comporte comme un fluide non-newtonien et perd sa viscosité à environ 30°C. L'analyse rhéologique indique que la phycocyanine est rhéofluidifiante et peut être classée en tant qu'un pseudoplastique.

Mots clés : *Limnospira sp. AlgLouSa11*, Tamanrasset, Algérie, Analyse du génome, phycocyanine, extraction, optimisation, propriétés structurantes.

ABSTRACT

Cyanobacteria known as *Spirulina*, *Arthrospira* or *Limnospira* are well-known nutrient mines throughout the world. Despite their long history of use for human consumption, many indigenous strains have not been studied. As part of our research, we carried out a genomic characterization of an Algerian strain isolated from Tamanrasset since 2004. The genome of *Limnospira sp. AlgLouSa11* was sequenced and compared (via ANI and PaSit4) with 21 genomes of the *Arthrospira* and *Limnospira* genera, showing *L. fusiformis KN01* to be the closest relative (99.3%) to the *L. sp. AlgLouSa11* strain.

Analysis of the biochemical composition of the *AlgLouSa11* strain showed it to be very rich in protein (44.37 ± 0.78), carbohydrates (33.43 ± 1.77) and fiber (7.54 ± 0.43). As well as a wide range of bioactive compounds with functional properties, including chlorophylls a and b and phycocyanins (C-PC). Many studies have been devoted to phycocyanin extraction because of its pharmaceutical and food applications. In our work, the extraction of C-phycocyanin, using saline solutions, was optimized using MSR; for all the variables tested, the factors that appear to have positive effects are maceration time, followed by concentration in the cyanobacteria.

The BET study of phycocyanin's structural properties showed that it has a specific surface area of $3.4845 \text{ m}^2/\text{g} \pm 0.346$ with an average adsorption capacity of $C = 8.138$. Determination of the interfacial tension phycocyanin/air, phycocyanin/oil and their moduli showed that CP had better emulsifying properties than foaming properties.

Phycocyanin in solution behaves like a non-Newtonian fluid, losing its viscosity at around 30°C . Rheological analysis indicates that phycocyanin is rheofluidifying and can be classified as a pseudoplastic.

Keywords : *Limnospira sp. AlgLouSa11*, Tamanrasset, Algeria, genome analysis, phycocyanin, extraction, optimization, structural properties.

ملخص

تعتبر البكتيريا الزرقاء المعروفة باسم سبيرولينا أو أرثروسبيرا أو ليمنوسبيرا من المناجم الغذائية المعروفة في جميع أنحاء العالم. وعلى الرغم من تاريخها الطويل في الاستخدام للاستهلاك البشري، لم تتم دراسة العديد من السلالات المحلية. وكجزء من بحثنا، قمنا بإجراء توصيف جينومي لسلالة جزائرية معزولة من تمنراست منذ عام 2004. وقد تم تسلسل جينوم سلالة *Limnospira sp.* *AlgLouSa11* ومقارنته (عبر ANI و PaSit4) مع 21 جينومًا من أجناس *Arthrospira* و *Limnospira*، مما أظهر أن *L. fusiformis KN01* هو الأقرب (99.3%) لسلالة *L. sp. AlgLouSa11*.

وأظهر تحليل التركيب الكيميائي الحيوي لسلالة *AlgLouSa11* أنها غنية جدًا بالبروتين ($44.37 \pm$) و 0.78) والكربوهيدرات (1.77 ± 33.43) والألياف (0.43 ± 7.54). بالإضافة إلى مجموعة واسعة من المركبات النشطة بيولوجيًا ذات الخصائص الوظيفية، بما في ذلك الكلوروفيل أ و ب والفيكوسيانين (C-PC). وقد خُصصت العديد من الدراسات لاستخلاص الفيكوسيانين بسبب تطبيقاته الصيدلانية والغذائية. في عملنا هذا، تم تحسين استخلاص C-فيكوسيانين سي باستخدام المحاليل الملحية باستخدام المحاليل الملحية باستخدام MSR؛ وبالنسبة لجميع المتغيرات التي تم اختبارها، فإن العوامل التي يبدو أن لها تأثيرات إيجابية هي وقت النقع، يليها التركيز في البكتيريا الزرقاء.

أظهرت دراسة الخواص التركيبية للفيكوسيانين الفايكوسيانين بواسطة BET أن له مساحة سطح محددة تبلغ 3.4845 م²/غم ± 0.346 مع قدرة امتزاز متوسطة $C = 8.138$. وأظهر تحديد التوتر البيئي للفيكوسيانين/الهواء والفيكوسيانين/الزيت ومعدلاتهما أن الفيكوسيانين في محلول الفايكوسيانين له خصائص استحلاب أفضل من خصائص الرغوة.

يتصرف الفايكوسيانين في المحلول كسائل غير نيوتوني ويفقد لزوجته عند حوالي 30 درجة مئوية. يشير التحليل الريولوجي إلى أن الفايكوسيانين مائع غير نيوتوني ويمكن تصنيفه على أنه مادة شبه بلاستيكية.

الكلمات المفتاحية: ليمنوسبيرا *Limnospira sp. AlgLouSa11*، تمنراست، الجزائر، التحليل الوراثي، الفايكوسيانين، الاستخلاص، الضبط الأمثل، الخصائص البنيوية.

REMERCIEMENTS

Je commence par remercier **ALLAH** ﷻ, Le très-Haut, le plus-Puissant, de m'avoir donné tous ce que j'ai... Louange à **ALLAH** par Lequel les bonnes choses se réalisent.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, **Mme Boutekrabt-Benhadja Lynda**, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida 1 et Directrice de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral, Alger. Malgré ses nombreuses responsabilités et occupations, elle a toujours été présente pour moi, avec une bienveillance et une douceur remarquable. Sa présence, ses encouragements et son soutien inestimable ont été d'une aide précieuse. Je suis honorée d'avoir pu bénéficier de ses qualités humaines et scientifiques exceptionnelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde reconnaissance.

À ma Co-directrice de thèse, **Mme Doumandji Amel**, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida 1. Je vous exprime ma profonde gratitude pour votre soutien inestimable tout au long de la réalisation de ma thèse. Merci infiniment pour vos encouragements, vos conseils avisés, et vos orientations précieuses. Votre présence constante et la douceur avec laquelle vous m'avez accompagnée, semblable à celle d'une grande sœur, ont été d'un grand réconfort dans les moments les plus difficiles. Je vous suis profondément reconnaissante. Que ces mots témoignent de ma sincère reconnaissance et de mon respect immense.

Je remercie chaleureusement le président, **M. Benchabane Messaoud**, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida 1, pour l'immense honneur qu'il m'a accordé en acceptant de présider ce jury de soutenance.

Je tiens à exprimer mes remerciements sincères aux honorables membres du jury, **Mme. Hadj-Ziane Zafour Amel**, Professeur à l'université de Blida 1 ; **M. Bitam Arezki**, Professeur à l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires, Alger et **Mme Alouache Souhila**, Maitre de Conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral, Alger. Je suis profondément honorée qu'ils aient accepté d'examiner et de juger ce modeste travail. Qu'ils

trouvent ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

À l'ange qui a toujours été à mes côtés pendant toutes ces années. À celle qui a veillée à ce que je mène ce travail à bien et le terminer, celle qui m'a soutenue ma très chère amie *Leys Natalie, Docteur au Centre d'étude de l'Energie Nucléaire, SCK-Cen, Belgique*. Je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi.

À *Mme. Wilmotte Annick, Professeur à l'université de Liège, Belgique*, qui m'a orienté et conseillé bien avant le début de cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

Je tiens à remercier vivement *M. Van Houdt Rob, Docteur au Centre d'étude de l'Energie Nucléaire SCK-Cen Belgique* pour son accueil chaleureux, son aide précieuse et sa maîtrise inestimable de la bio-informatique. Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers les institutions qui m'ont permis de mener à bien les travaux de recherche pour cette thèse. En particulier, je remercie chaleureusement le *Centre d'étude de l'Energie Nucléaire SCK-CEN en Belgique*, Ce fut un véritable plaisir de collaborer avec vous.

Mes remerciements s'adressent aussi au *Professeur Zoukel Halim, Directeur du plateau Technique d'analyse physicochimique (PTAPC - CRAPC) - Laghouat*, et tout le personnel du plateau.

Je tiens à exprimer aussi ma gratitude à *M. Ramdane Sid Ali, Professeur à l'université Saad Dahlab de Blida 1* pour ses aides précieuses, sa disponibilité et ses encouragements et à *M. Kadi Imed Eddine, Chercheur à l'Unité de Recherche sur les plantes médicinales (URPM - CRBt) - Laghouat*.

Une pensée amicale à mes chères amies et collègues *Mme. Allali Khadidja, MCA à l'Université Amar Telidji de Laghouat*. Et *Mme Abdesselam Amira, MAA à l'Université Amar Telidji de Laghouat*. Pour leur présence, encouragement, aide et soutien.

*J'*aimerais également remercier vivement et infiniment ma très chère amie et collègue Mme. *Salhi Selma*, MCB à l'Université de Batna 2. Pour son aide et soutien, ses encouragements et sa présence qui étaient forts utiles.

Mes profonds remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin lors de la réalisation de ce travail et ceux qui m'ont soutenu

Une pensée affectueuse pour mon défunt *père*, ainsi que mes sincères remerciements à ma chère *mère*, pour leur amour inestimable, leur patience et leur précieuse éducation.

A mes princesses, mes adorables filles *Farah*, *Nouha* et *Rahma-Maryam*, ainsi qu'à la mémoire de ma fille *Djanna*.

Que toutes les personnes, ayant collaboré ou contribué à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	I
ABSTRACT	II
ملخص.....	III
REMERCIEMENTS.....	IV
TABLE DES MATIERES.....	V
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	VI
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATION	VII
LISTE DES ÉQUATIONS.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1	5
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I. GENERALITES LA CYANOBACTERIE (<i>ARTHROSPIRA</i> OU <i>LIMNOSPIRA</i>)	5
I.1. TAXONOMIE	6
I.2. ÉTYMOLOGIE.	7
I.3. MORPHOLOGIE.....	7
I.4. REPRODUCTION.....	9
I.5. PRODUCTION ET CULTURE.....	10
I.6. RECOLTE ET CONSERVATION.....	11
II. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE LA SPIRULINE.....	12
II.1. PROTEINES	12
II.2. GLUCIDES	13
II.3. LIPIDES	14
II.4. Vitamines	14
II.5. MINERAUX ET OLIGOELEMENTS.....	15
II.6. PIGMENTS	16
II.7. TOXICITE DE LA SPIRULINE	17
II.7.1. Toxicité par les métaux lourds.....	17
II.7.2. Toxicité par les microorganismes.....	17
II.8. SPIRULINE ET REACTIONS ALLERGIQUES	18
III. GÉNÉRALITÉS SUR LA PHYCOCYANINE	18
III.1. LES PHYCOBILIPROTEINES	18
III.2. LES PHYCOBILISOMES.....	19
III.3. LA PHYCOCYANINE	21
III.4. EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA PHYCOCYANINE	22
III.4.1. Extraction de la phycocyanine	22
III.4.1.1. Extraction par sonication	25
III.4.1.2. Extraction avec des cycles de congélation-décongélation	25
III.4.1.3. Extraction chimique.....	25
III.4.1.4. Extraction enzymatique	26
III.4.1.5. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)	26
III.4.1.6. Méthodes d'extraction combinées.....	26

III.4.2. Purification de la phycocyanine.....	28
III.5. STABILITE DE LA PHYCOCYANINE.....	28
III.5.1. Le pH.....	29
III.5.2. Température.....	29
III.5.3. La lumière.....	29
III.5.4. Agents stabilisateurs.....	29
III.6. PROPRIETES STRUCTURANTES DES PROTEINES.....	29
CHAPITRE 2.....	31
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
I. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	31
II. CARACTERISATION GENOMIQUE DE LA CYANOBACTERIE DE TAMANRASSET ET DES BACTERIES ASSOCIEES A SA CULTURE.....	31
II.1. ISOLEMENT DE LA CYANOBACTERIE.....	31
II.2. CONDITIONS DE CULTURE DE LA CYANOBACTERIE.....	32
II.3. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES BACTERIES ASSOCIEES A LA CULTURE DE LA <i>LIMNOSPIRA SP.</i> <i>ALGLOUSAI1</i>	33
II.4. EXTRACTION DE L'ADN.....	34
II.5. AMPLIFICATION EN CHAINE PAR POLYMERASE (PCR).....	35
II.5.1. Amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S chez <i>Limnospira sp.</i> , et séquences d'espacement intergénique (ITS) entre le gène de l'ARNr 16S et le gène de l'ARNr 23s.....	35
II.5.2. PCR pour les gènes de l'ADNr 16S des contaminants.....	37
II.5.3. Quantification et détermination de la pureté de l'ADN.....	37
II.5.4. Analyse de l'ADN par électrophorèse.....	38
II.6. PURIFICATION DES PRODUITS DE LA PCR.....	39
II.7. SEQUENÇAGE DU GENOME ENTIER, ANNOTATION ET ANALYSE PHYLOGENOMIQUE.....	40
III. CARACTERISATION DE LA CYANOBACTERIE <i>LIMNOSPIRA SP. ALGLOUSAI1</i>.....	41
III.1. CARACTERISATION MICROSCOPIQUE.....	41
III.2. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE.....	41
III.2.1. Détermination de la teneur en humidité.....	41
III.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse.....	41
III.2.3. Détermination de la teneur en protéines.....	42
III.2.4. Détermination de la teneur en sucres totaux.....	43
III.2.5. Détermination de la teneur en fibres.....	43
III.2.6. Détermination de la teneur en amidon.....	44
III.2.7. Valeur énergétique.....	45
III.2.8. Détermination du taux de la matière minérale.....	45
III.2.9. Dosage des minéraux et des métaux lourds.....	45
III.2.9.1. Dosage des métaux lourds et certains oligoéléments.....	45
III.2.9.2. Dosage du phosphore total.....	46
III.2.9.3. Dosage du Calcium.....	46
III.3. ANALYSE PHYTOCHIMIQUE.....	47
III.3.1. Dosage des pigments chlorophylliens.....	47
III.3.2. Dosage des phycobiliprotéines.....	48
III.4. ÉTUDE STATISTIQUE.....	48
IV. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE.....	49

IV.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION DE LA C-PHYCOCYANINE DE LA <i>LIMNOSPIRA SP. ALGLOUSAI1</i> , PAR SOLUTIONS SALINES.....	49
IV.1.1. Facteurs de variations sur le rendement d'extraction de la C-phycoyanine.....	49
IV.1.2. Optimisation du rendement d'extraction de la C-PC par méthodologie de réponse en surface (RSM).....	50
IV.2. MÉTHODOLOGIE DE L'EXTRACTION DE LA C-PC.....	52
VI.2.1. Dosage de la concentration en C-PC.....	53
IV. ETUDE DES PROPRIETES STRUCTURANTES DE LA C-PHYCOCYANINE.....	54
IV.1. PROPRIETES DE SURFACE.....	55
IV.1.1. Détermination de la surface spécifique.....	55
IV.1.2. Mesure de la tension superficielle / interfaciale.....	56
IV.2. MESURE DE LA VISCOSITE.....	57
IV.3. PROPRIETES DE STRUCTURES ET TEXTURE :.....	58
CHAPITRE 3.....	59
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	59
I. CARACTERISATION GENOMIQUE DE LA CYANOBACTERIE DE TAMANRASSET ET DES BACTERIES ASSOCIEES A SA CULTURE.....	59
I.1. POSITION TAXONOMIQUE DE LA CYANOBACTERIE DE TAMANRASSET, <i>LIMNOSPIRA SP. ALGLOUSAI1</i>	59
I.2. CARACTERISTIQUES GENERALES DU GENOME DE <i>LIMNOSPIRA SP. ALGLOUSAI1</i>	61
I.3. METABOLITES SECONDAIRES.....	65
I.4. IDENTIFICATION GENETIQUE DES BACTERIES ASSOCIEES A LA CULTURE DE LA <i>LIMNOSPIRA</i> DE TAMANRASSET.....	67
II. CARACTERISATION DE LA CYANOBACTERIE <i>LIMNOSPIRA SP. ALGLOUSAI1</i>.....	71
II.1. OBSERVATION MICROSCOPIQUE.....	71
II.2. COMPOSITION BIOCHIMIQUE.....	71
II.2.1. Résultats et discussions de la composition biochimique générale.....	71
II.2.2. Composition en minéraux.....	73
II.2.3. Composition en métaux lourds.....	75
II.3. TENEUR EN PHYTONUTRIMENTS.....	76
II.3.1. Teneur en pigments chlorophylliens.....	76
II.3.2. Teneurs en phycobiliprotéines et phycoyanine.....	76
III. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE.....	78
III.1. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DE LA PC PAR METHODOLOGIE DE REPONSE EN SURFACES.....	78
IV. ETUDE DES PROPRIETES STRUCTURANTES ET FONCTIONNELLES DE LA PHYCOCYANINE.....	91
IV.1. PROPRIETES DE SURFACE.....	91
IV.1.1. Surface spécifique de la phycoyanine.....	91
IV.1.2. Tension superficielle de la phycoyanine.....	91
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	97
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	100
APPENDICE A.....	126
PUBLICATION INTERNATIONALE (Q1).....	130

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES		Page
Figure 1.1	: Les différentes morphologies de <i>Limnospira</i>	8
Figure 1.2	: Formation de cellules nécrides dans les clones	9
Figure 1.3	: Cycle biologique de la Spiruline	10
Figure 1.4	: Schéma de la structure interne d'une cyanobactérie	20
Figure 1.5	: Organisation du phycobilisome chez <i>Arthrospira platensis</i>	20
Figure 1.6	: Structure chimique du chromophore phycocyanobiline de la phycocyanine d' <i>Arthrospira platensis</i>	21
Figure 1.7	: Processus d'extraction et de purification de la phycocyanine	27
Figure 2.1	: Cartographie du site d'isolement de la spiruline <i>Limnospira sp AlgLouSa11</i>	32
Figure 2.2	: Photographie des cultures de la souche de la spiruline	33
Figure 2.3	Programme de cyclage final appliqué pour l'amplification de l'ARNr 16S, utilisant 16S3' F et 23S5' R.	36
Figure 2.4	: Photographie du <i>NanoDrop</i> utilisé	38
Figure 2.5	: Photographie montrant la migration sur gel électrophorèse et le bio-rad de lecture des gels	39
Figure 2.6	: Photographie de l'électrophorèse de purification	40
Figure 2.7	: Procédure de dosage des fibres	44
Figure 2.8	: Photographie des surnageants obtenus utilisés pour la détermination de la teneur en pigments (Chla et Chlb)	47
Figure 2.9	: Photographie de quelques essais appliqués pour l'optimisation de l'extraction de la C-PC	52
Figure 2.10	: Photographie de quelques surnageants récupérés après l'extraction de la C-PC et séparation de la biomasse	53
Figure 2.11	: Photographie montrant les étapes de la lyophilisation de la C-PC extraite	55
Figure 2.12	: Photographie du BET utilisé	56
Figure 2.13	: Photographie du tensiomètre utilisé	57
Figure 2.14	: Photographie du viscosimètre utilisé	57
Figure 2.15	: Photographie montrant l'analyse des propriétés rhéologique de la phycocyanine	58
Figure 3.1	: Cohérence génomique de 22 génomes d' <i>Arthrospira/Limnospira</i> mesurée par l'identité nucléotidique moyenne	60
Figure 3.2	: Arbre phylogénomique montrant les relations entre la souche <i>AlgLouSa11</i> et les souches des genres <i>Arthrospira</i> et <i>Limnospira</i>	61
Figure 3.3	: Représentation circulaire du génome de <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i> .	62
Figure 3.4	: Classification EggNOG de toutes les séquences codantes du génome de <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i> .	63

Figure 3.5	: Représentation graphique des loci CRISPR-Cas, des opérons Cas orphelins et des réseaux CRISPR orphelins	64
Figure 3.6	: Photographie montrant les proportions des bactéries associées à la culture de la <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i>	68
Figure 3.7	: Photographie de la <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i> observée au microscope photonique (x40)	71
Figure 3.8	: Anneau représentatif de la teneur en les différentes Phycobiliprotéines (A-PC, C-PC et FE) de la <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i>	77
Figure 3.9	: Graphiques des contours concentriques de l'interaction entre les facteurs pour l'extraction de la phycocyanine pour chaque variable	83-85
Figure 3.10	: Graphiques des surfaces de réponse obtenues par RSM montrant les effets relatifs d'interaction des facteurs affectant le rendement d'extraction de la phycocyanine	86-88
Figure 3.11	: Courbe d'écoulement, contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement, de la phycocyanine	94
Figure 3.12	: Courbe d'écoulement, viscosité en fonction du gradient de cisaillement, de la phycocyanine	95

TABLEAUX

		page
Tableau 1.1	: Pourcentage moyen des acides aminés de <i>Spirulina platensis</i> selon différents auteurs et de <i>Spirulina mexicana</i>	13
Tableau 1.2	: Teneur en vitamines en µg/g de matière sèche de Spiruline	15
Tableau 1.3	: Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche	16
Tableau 1.4	: Normes imposées en France pour la contamination des spirulines alimentaires en métaux lourds (Arrêté du 21/12/1979)	17
Tableau 1.5	: Normes imposées par la normalisation française pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries (Arrêté du 21/12/1979)	18
Tableau 1.6	: Les différentes méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines	24
Tableau 2.1	: Liste des amorces PCR, orientation et séquences de nucléotides (sens 5' à 3')	37
Tableau 2.2	: Facteurs, avec leurs niveaux, utilisés pour l'optimisation de l'extraction de la C-PC.	50
Tableau 2.3	: Matrice du plan composite centré de RSM.	51
Tableau 3.1	: Gènes impliqués dans les métabolites secondaires transportés par <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i> .	65
Tableau 3.2	: Composition biochimique de la <i>Limnospira sp. ALgLouSa11</i>	72
Tableau 3.3	: Teneurs en minéraux de la <i>Limnospira sp. ALgLouSa11</i>	74
Tableau 3.4	: Teneurs en métaux lourds de la <i>Limnospira sp. ALgLouSa11</i> .	75
Tableau 3.5	: Résultats de réalisation de la matrice du plan composite centré de RSM.	79
Tableau 3.6	: Analyse de la variance du plan de l'optimisation.	80
Tableau 3.7	: Ajustement du modèle CCD par rapport à R1.	81

Tableau 3.8	: Résultats de la détermination de la surface spécifique de la PC par BET	91
Tableau 3.9	: Résultats de la mesure de la tension superficielle / interfaciale de la phycocyanine dans l'air (P/A) et dans l'huile (P/H).	92
Tableau 3.10	: Résultats de la viscosité de la phycocyanine	93

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATION

A

A %	:	Teneur en Amidon en pourcentage en masse
ADN	:	Acide désoxyribonucleique
ANI	:	<i>Average Nucleotide Identity</i>
A-PC	:	Allophycocyanine
ARNr	:	Acide ribonucleique ribosomal
ARNr 16S	:	ARN ribosomique 16S

B

BET	:	Brunauer, Emmett et Teller
------------	---	----------------------------

C

Ca-Sp	:	Calcium-spirulan
CC	:	Contrainte de cisaillement
CCD	:	Plan composite centré
CDS	:	Distribution des séquences codantes
Ch_a	:	Chlorophylle a
Ch_b	:	Chlorophylle b
CL	:	<i>Cluster</i>
CL SUB	:	<i>Sub Cluster</i>
COG	:	Cartographie Optique du Génome
CpcA	:	phycocyanin Locus A
CpcB	:	phycocyanin Locus B
CpcHID	:	<i>C-phycocyanin rod linker polypeptide H, I et D</i>
C-PCY / C-PC	:	C-phycocyanine
CRISPR	:	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>

D

dNTPs	:	Désoxynucléosides triphosphates
DO	:	Densité optique

E

EDTA	:	Acide éthylène diamine tétra acétique
EM	:	Energie métabolisable
EPS	:	Exo-polysaccharides

F

F : Forward

G

G % : Teneur en Glucide en pourcentage en masse

GAE : Equivalent acide gallique

gvp : groupes de gènes de la vésicule gazeuse

H

H % : Taux d'Humidité en pourcentage en masse

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

I

IGS : *Intergenic spacer*

ITS : *internal transcribed spacer*

ITS : Internal Transcribed Spacer

L

Lan : Lanthionine

LB : *Lysogeny broth*

M

MAE : **Extraction assistée par micro-ondes**

MeLan : Méthyllanthionine

MELiSSA : *Micro-Ecological Life Support System Alternative*

MG : Matière Grasse

MM % : Teneur en Matière minérale en pourcentage en masse

MS : *Matière sèche*

N

NA : Norme Algérienne

NCBI : *National center for biotechnology information*

NDF : *Neutral detergent fiber*

NDS : Neutral Détergent Solution

NF : Norme Française

P

P % : Teneur en protéines en pourcentage en masse

P/A : Phycocyanine dans Air

P/H : Phycocyanine dans Huile

pb : Paire de bases

PBPs : Phycobiliprotéines

PBS	:	Phycobilisome
PC	:	Phycocyanines
PCB	:	Phycocyanobiline
PCR	:	<i>Polymorphisme Chain reaction</i>
PE	:	Phycoérythrine
PEG	:	Polyéthylène glycol

R

R	:	<i>Reverse</i>
rpm	:	Tour par minute
RSM	:	<i>Responce Surface Methodology</i>

S

SAAF	:	Spectroscopie d'absorption atomique à flamme
SCE	:	Somme des carrées des écarts
SQDG	:	Sulfoquinovosyl-diacyl-glycerol

T

TPS	:	Terpènes synthases
------------	---	--------------------

U

UFC	:	Unités formant colonies
US	:	Ultrasonication
UV	:	Ultraviolet

V

VDyn.	:	Viscosité dynamique
--------------	---	---------------------

Z

ZLB	:	<i>Zarrouk lysogeny broth</i>
------------	---	-------------------------------

LISTE DES ÉQUATIONS

Equation 2.1.	Equation de la détermination de la teneur en humidité	39
Equation 2.2.	Équation de calcul du taux de la matière grasse	39
Equation 2.3.	Équation de la détermination de la teneur en protéines	40
Equation 2.4.	Équation de la détermination de la teneur en fibres	41
Equation 2.5.	Équation de la détermination de la teneur en amidon	42
Equation 2.6.	Équation de la détermination de l'énergie métabolisable	42
Equation 2.7.	Équation de calcul du taux de la matière minérale	42
Equation 2.8.	Équation du dosage du phosphore	43
Equation 2.9.	Équation du dosage du Calcium	44
Equation 2.10.	Équation de calcul de la teneur en chlorophylle a	45
Equation 2.11.	Équation de calcul de la teneur en chlorophylle b	45
Equation 2.12.	Équation de calcul de la teneur en Allo-phycoyanine	45
Equation 2.13.	Équation de calcul de la teneur en Phycoérythrine	45
Equation 2.14.	Équation de calcul de la teneur en C-Phycocyanine (mg/g)	45
Equation 2.15.	Équation de calcul de la teneur en Phycocyanine brute	46
Equation 2.16.	Équation de calcul de la teneur en C-Phycocyanine (mg/ml)	51
Equation 2.17.	Équation de calcul du rendement d'extraction de la phycocyanine	51
Equation 3.1.	Équation de régression de l'analyse RSM	80

Introduction



INTRODUCTION

Les cyanobactéries existent probablement depuis l'augmentation de l'oxygène dans l'atmosphère et les océans lors de ce que l'on appelle le Grand Événement d'Oxydation [1] [2]. Parmi les cyanobactéries, trois genres possèdent des trichomes à enroulement hélicoïdal : *Spirulina*, *Halospirulina*, et *Arthrospira* [3]. Ce dernier est un taxon très connu, utilisé depuis longtemps comme source de nourriture, sous forme de dihé en Afrique ou de tecuitlatl au Mexique [4 ; 5].

En marketing, *Arthrospira* est commercialisée sous le nom commun de « Spiruline » bien que *Arthrospira* et *Spirulina* représentent deux genres indépendants de différents ordres [6].

Arthrospira est l'un des dix-neuf genres de la famille des Microcoleaceae au sein de l'ordre des Oscillatoriales [6]. Les espèces appartenant à ce genre sont des cyanobactéries filamenteuses, souvent appelées algues bleues en raison de leur richesse en pigments, en particulier en caroténoïdes, en phycocyanine C (C-PC) et en chlorophylle [7 ; 8].

La classification taxonomique des espèces de ce genre est essentiellement basée sur une approche polyphasique combinant les données phénotypiques et moléculaire basées sur le gène de l'ARNr 16S, l'espacement intergénique (ITS) du gène de l'ARNr 16S-23S, le locus de l'opéron de la phycocyanine (*cpcB-IGS-cpcA*) et le groupe des gènes de la vésicule gazeuse (*gvp*) [9-14]. Les premières études phylogénétiques basées sur le gène de l'ARNr 16S ont divisé le genre *Arthrospira* en trois clades et défini six espèces d'*Arthrospira* : *A. geitleri*, *A. jenneri*, *A. platensis*, *A. fusiformis*, *A. indica* et *A. maxima* [9; 15].

En 2019, Nowicka-Krawczyk et son équipe ont modifié la description du genre *Arthrospira* en délimitant les espèces produites commercialement dans un nouveau genre *Limnospira* avec les espèces : *L. fusiformis*, *L. indica* et *L. maxima* [16].

Douées de diverses activités thérapeutiques, antioxydantes, anti-cancéreuses, antivirales, antibactériennes immunomodulatrices et agissant positivement dans le traitement de la malnutrition, de l'obésité, de l'anémie, et du diabète [17-20], les espèces de ce genre sont utilisés comme aliments. Une partie importante de leur production est vendue sous forme de compléments alimentaires ou d'additifs alimentaires [21 ; 22].

Aussi, souvent qualifiées de superaliments [23] en raison de leur teneur très élevée en macronutriments, notamment en protéines, [24-27], en micronutriments et en oligo-éléments [27 ; 28], ce sont des sources de composés biologiquement actifs [29] dont les phycobiliprotéines (PBPs).

Les phycobiliprotéines représentent la fraction majeure des protéines de la spiruline, Il s'agit principalement de trois fractions à savoir les phycocyanines (PC ou C-PC) dont la C-PCY; la R-PCY et la R-PCYII, la phycoérythrine (PE) et l'Allophycocyanine (A-PC). C'est un groupe de protéines colorées, hydrosolubles, dotées de groupes prothétiques tétrapyrroles linéaires, localisées à la surface des thylakoïdes [30 ; 31].

La phycocyanine, principal type des phycobiliprotéines représente jusqu'à 50% des phycobiliprotéines [32] et jusqu'à 15% des protéines totales de *A. platensis* [33]. Il existe 61 structures de phycobiliprotéines déposées dans la *Protein Data Bank*, obtenues par diffraction des rayons X, et qui appartiennent principalement à des cyanobactéries et à des algues rouges. Sur ces 61 structures, 36 sont des phycocyanines.

La phycocyanine présente des effets bénéfiques pour la santé : des études ont montrés que la phycocyanine extraite de *A. platensis* possède des propriétés antioxydantes, anticancéreuses, antitumorales [34 ; 35] et anti-inflammatoires [36], son effet cardioprotecteur a également été démontrée [37].

En outre, elle possède une capacité fluorescente qui permet de l'utiliser comme marqueur biochimique pour des analyses chimiques et biologiques [38 ; 39]. Ainsi, des films bio-fonctionnels ont été développés en utilisant de la gélatine bovine et de la phycocyanine [40].

La phycocyanine peut aussi être utilisée dans les formulations alimentaires, elle présente un intérêt agroalimentaires grâce à ses propriétés structurantes et technofonctionnelles, émulsifiantes, gélifiantes et moussantes [41]. Elle a été utilisée comme émulsifiant dans les crèmes glacées et gélifiant dans les gelées [41].

La phycocyanine est aussi un colorant alimentaire naturel bleu, c'est ce qui explique son nom tiré du grec « phyco » ou « algue » et « cyan » qui signifie « bleu ». Les microalgues peuvent constituer les meilleures sources de colorants naturels [42 ; 43].

L'utilisation de la phycocyanine, comme ingrédient alimentaire fonctionnel non

toxique et non cancérigène gagne en importance dans le monde entier et peut être une alternative protéique durable.

Différentes techniques d'extraction de la phycocyanine ont été étudiées et comparées, en se basant principalement sur le choix du traitement mécanique exercé (macération, ultrasons, Extraction assistée par champs électrique pulsé, congélation/décongélation, microondes), les solvants utilisés, la présence de stabilisants et autres paramètres [44-47].

L'obtention d'une phycocyanine de grade alimentaire peut être faite avec le développement de méthodes d'extraction alternatives de la phycocyanine par des méthodes dites de « chimie verte » ou « eco-extraction » réduisant ainsi, la consommation d'énergie et de solvant, parmi lesquelles l'extraction par solution saline [47].

En Algérie, dans le massif cristallin du Hoggar à Tamanrasset, une cyanobactérie a été découverte, en 1988, dans une « *guelta* », par Etienne BOILEAU et Monique BOILEAU et a été isolée en 2004 par le Dr. Abdelkader HIRI, qui lui a attribué le nom commun de « la Spiruline HTam ». Sa taxonomie et son étude génomique n'a jamais été établie. Par contre, les analyses démontraient qu'elle présentait la plus grande quantité de caroténoïdes (5,50 mg/g) et de polyphénols (67,52 mg GAE/g) comparativement à d'autres souches d même type [48]. L'optimisation de la production de substances polymériques extracellulaires ou exo-polysaccharides (EPS) par cette spiruline et l'extraction de sa phycocyanine ont fait l'objet de plusieurs études [49-51]. Cette souche, non toxique, de cyanobactérie est actuellement cultivée dans plusieurs fermes en Algérie.

Dans ce contexte, la présente thèse a pour objectif de mettre en valeur cette cyanobactérie et ce en commençant par sa caractérisation génomique et l'exploration de son génome pour arriver à la classer d'un point de vue taxonomique puis étudier la composition biochimique de la spiruline sèche cultivée sur milieu de culture Hiri. Aussi, une optimisation de l'extraction de la phycocyanine par solutions salines à base de chlorure de sodium (NaCl) en utilisant la méthodologie de réponse en surface (*Responce Surface Methodology*) (RSM) a été réalisée ainsi qu'une évaluation de quelques caractéristiques fonctionnelles et structurantes de la PC extraite.

Cette thèse est structurée en trois chapitres :

Un premier chapitre : réservé à une analyse bibliographique présentant les différents aspects abordés dans cette thèse, à savoir, des généralités sur la cyanobactérie étudiée, sa protéine majoritaire, la phycocyanine, et les méthodes d'extraction de cette dernière ainsi que ses différentes propriétés.

Un deuxième chapitre décrivant le matériel utilisé et les différentes méthodes d'analyse effectuées.

Un troisième chapitre où les résultats obtenus sont présentés et discutés, commençant par l'identification génétique de l'espèce étudiée et de ses contaminants de culture, puis une caractérisation biochimique de la souche *Limnospira sp. AlgLouSa11*, suivie de l'optimisation et la modélisation par planification par méthodologie de réponse en surface (RSM) de l'extraction de la phycocyanine avec des solutions salines.

L'étude de quelques propriétés structurantes et fonctionnelles de la phycocyanine extraite de la souche de spiruline algérienne a également été réalisée.

CHAPITRE 1



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités La cyanobactérie (*Arthrospira* ou *Limnospira*)

Les cyanobactéries (cyanoprokaryotes : organismes dépourvus de membrane nucléaire) constituent un groupe particulièrement difficile à classer. Elles constituent sans doute l'un des groupes d'organismes les plus anciens de la planète [52 ; 53]. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires [54].

L'appareil photosynthétique des cyanobactéries est formé de trois systèmes principaux de récolte de la lumière : deux photosystèmes principaux (comme la majorité des organismes photosynthétiques) et un phycobilisome (PBS), un complexe protéique supramoléculaire [55]. Le PBS est très caractéristique de ces organismes et est principalement composé de phycobiliprotéines (PBPs) qui absorbent les radiations dans les régions du spectre visible, où la chlorophylle a une faible absorption, principalement dans les zones vertes et jaunes du spectre lumineux [56]. Cependant, la composition du phycobilisome varie d'une espèce à l'autre [57].

D'un point de vue quantitatif, la phycocyanine (PC ou PCY) est la phycobiliprotéine la plus abondante chez les cyanobactéries, suivie de la phycoérythrine et de l'allophycocyanine [58].

La cyanobactérie *Arthrospira*, anciennement appelée Spiruline, et récemment appelée *Limnospira* est la microalgue économiquement la plus exploitée [5 ; 59]. Elle fait partie des micro-organismes, et elle appartient au domaine des bactéries (*Bacteria*) et se classe parmi les bactéries gram négatif [60]. À noter que cette appartenance à la classe des cyanobactéries est plus ou moins récente. En effet, elle est longtemps restée classée parmi les « algues bleu-vert » [54].

C'est une espèce photoautolitotrophe qui se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines, contenant du carbonate de sodium ou du bicarbonate de sodium, et riches en nutriments azotés et phosphorés [61 ; 62]. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins des régions tropicales et semi-tropicales [63]. Outre ses habitats naturels, la spiruline peut être cultivée dans des photo-bioréacteurs

ou des bassins de culture utilisant des milieux de culture artificiels [61]. Dans ces cas *Arthrospira* pousse idéalement à 35 - 37°C : elle meurt à 43°C., sa croissance est pratiquement nulle à 20°C avec un pH optimal de 9,5 à 10,5 [64]. La lumière étant indispensable, naturelle ou artificielle : la spiruline exposée à un fort ensoleillement (plus de 120000 lux) est décomposée [61]. Une agitation discontinue énergétique est préférable [64].

I.1. Taxonomie

La classification taxonomique des cyanobactéries a été radicalement modifiée, notamment avec l'introduction de la microscopie électronique et des méthodes de biologie moléculaire pour la caractérisation des taxons de cyanobactéries [6]. Selon la classification taxonomique actuelle, *Arthrospira* est l'un des dix-neuf genres de la famille des Microcoleaceae qui est une des plus grandes familles au sein de l'ordre des Oscillatoriales [11 ; 6].

Différentes souches d'*Arthrospira* ont été identifiées ; mais, en raison de leurs qualités (morphologie, couleur, taux de croissance, adaptation ...), elles ne sont pas toutes commercialement exploitables [65 ; 12]. Différentes études ont essayé d'établir les caractères phylogéniques communs des souches commercialisées en se basant sur différentes séquences.

En effet, la conservation des séquences d'ARNr 16S dans le genre *Arthrospira* est remarquable [9] ; les séquences ITS (*internal transcribed spacer*) montrent une grande conservation au niveau de l'espèce [10]. Ainsi, l'opéron *cpcHID* (C-phycoyanin rod linker polypeptide H, I et D) est un type de gène ancien qui code pour les peptides de liaison des bâtonnets du phycobilisome, impliqués dans l'assemblage et la fonction du PBS qui affecterait l'efficacité de la photosynthèse et donc la productivité finale, le *cpcHID* présente une plus grande divergence entre les souches d'*A. platensis* que l'ITS et l'ARNr 16S [66 ; 67].

Une combinaison des données phénotypiques et moléculaires, notamment l'ARNr 16S, l'espace transcrit interne (ITS), le locus de la phycocyanine (séquences *cpcBA-IGS*) et les groupes de gènes de la vésicule gazeuse (*gvp*) a donc été adopté pour la classification de ce genre [9-14 ; 68].

Plus récemment, une comparaison, en termes de morphologie cellulaire, ultrastructure, écologie et le gène de l'ARNr 16S ; a montré que l'espèce type du genre

Arthrospira, « *A. jenneri* » diffère des espèces utilisées commercialement *A. platensis*, *A. maxima* et *A. fusiformis* (et autres enregistrements d'*Arthrospira* provenant de *GenBank*). Ceci a mené à l'établissement d'un nouveau genre, *Limnospira*, qui englobe trois espèces, à savoir *L. fusiformis* et *L. maxima* et *L. indica*, avec l'espèce type *Limnospira fusiformis* [16].

I.2. Étymologie.

Le nom générique *Limnospira*, fait référence à la morphologie des trichomes et à leur habitat typique à savoir les lacs et à leur morphologie :

- *Límni*- [vient du grec, λίμνη], lac, lagune ;
- *-speíra* [en grec, σπείρα] - spirale [16].

I.3. Morphologie

La spiruline est une cyanobactérie du genre *Limnospira* qui se présente sous la forme d'un filament cylindrique, pluricellulaire appelé « trichome » (Figure 1.1), avec des parois transversales facilement visibles [69 ; 70].

Le trichome est ramifié, plus ou moins effilé vers les extrémités, légèrement rétrécis aux parois transversales, vert bleu ou vert foncé. Les cellules sont toujours plus courtes que larges avec des cellules terminales arrondies (Figure 1.1) et une paroi cellulaire externe épaisse ou calyptra [16].

Cette géométrie de l'hélice est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat [61] dont la température, les conditions physiques et chimiques [71].

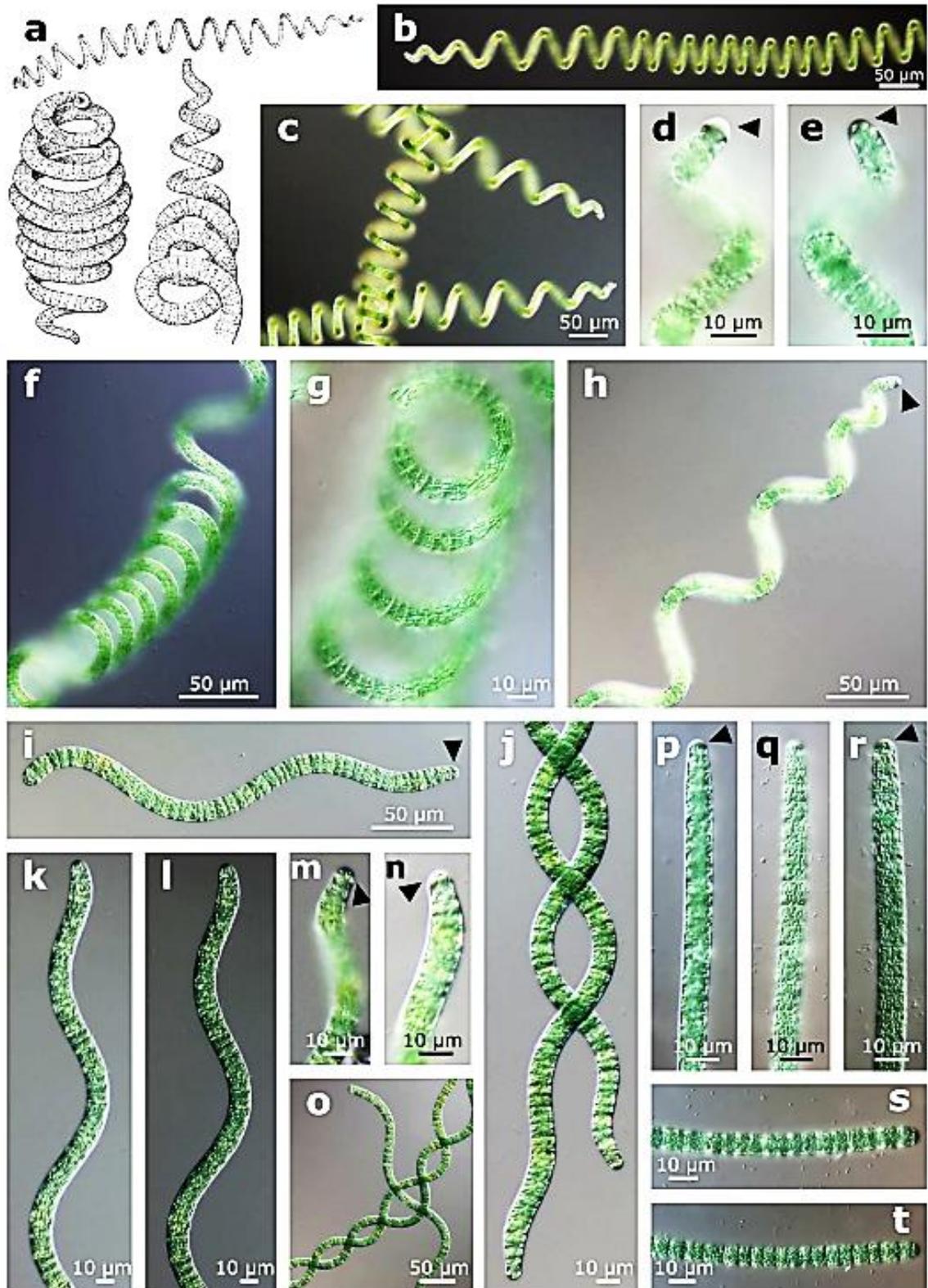


Figure 1.1: Les différentes morphologies de *Limnospira* [16]

(a) Dessin original de *L. fusiformis* (*Spirulina fusiformis*) par Voronichin 1934 [72], (b-h) morphologie de la souche de référence de *L. fusiformis* SAG 85.79 en LM (i-o) morphologie de la souche de *L. fusiformis* SAG 84.79 en LM, (p-t) morphologie de la souche de *L. fusiformis* SAG 257.80 en LM ; les triangles noirs indiquent la paroi cellulaire épaissie (calyptra).

I.4. Reproduction

La multiplication des trichomes d'*Arthrospira* / *Limnospira* à maturité se produit par fragmentation du trichome, à travers le biais d'une cellule nécrodiale. Le mécanisme a été décrit en détail pour *A. maxima* et *A. fusiformis* [4]. Il consiste en la destruction d'une cellule intercalaire (necridium ou nécrédie) qui devient d'abord incolore (Figure 1.2) et finalement biconcave en raison de l'effondrement des septa latéraux et segmentation des filaments [70].

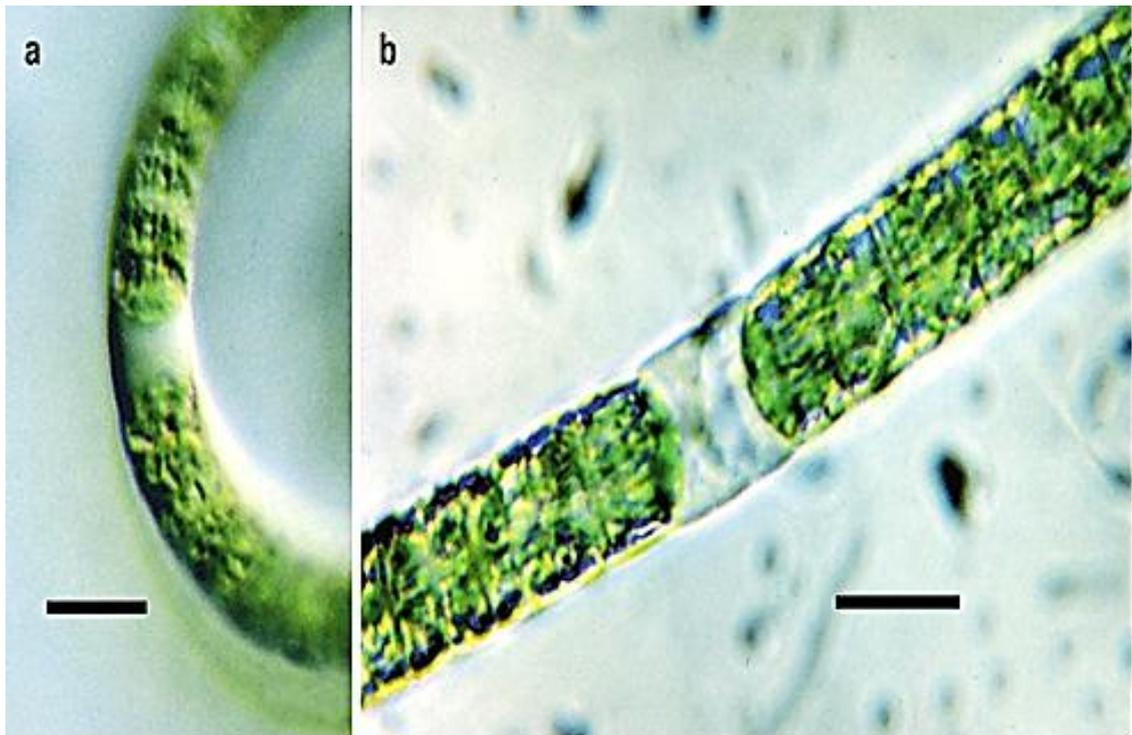


Figure 1.2 : Formation de cellules nécridentes dans les clones [70]

(a) *Arthrospira fusiformis* trichome enroulé ; (b) *A. maxima* trichome droit.
Barre de repérage = 10mm

Le trichome se fragmente donc pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies (Figure 1.3). Les hormogonies vont croître en longueur par division binaire et prendre la forme typique hélicoïdale [54]. Sous conditions favorables, le temps de génération est très court (7 heures) [73].

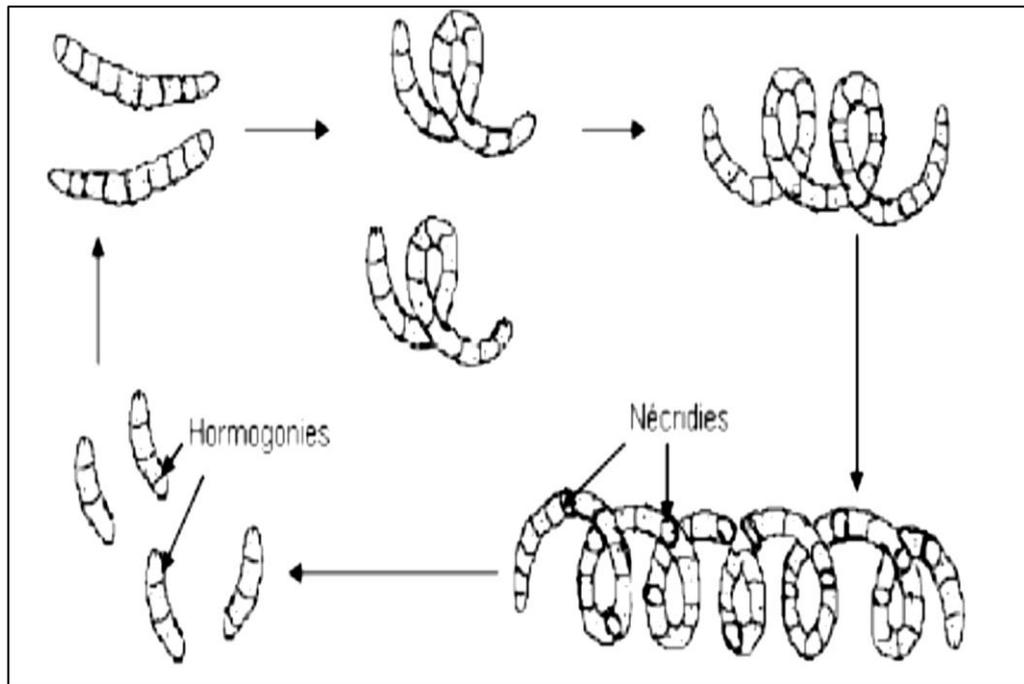


Figure 1.3 : Cycle biologique de la Spiruline [54]

I.5. Production et culture

La spiruline pousse naturellement dans les lacs mais elle est aussi cultivée en bassins ou en bioréacteurs dans un milieu de culture liquide. Pour assurer la croissance de la spiruline son milieu de culture doit contenir de l'azote, du phosphore et du potassium. De même, le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés.

Le milieu doit en outre contenir tous les oligo-éléments nécessaires à sa croissance : zinc, acide borique, manganèse, cuivre, chrome, cobalt, molybdène, etc. [64]. Il est nécessaire de dire que lors de la culture des spirulines, il faut prendre en compte deux types de consommation : La première consommation correspond à la préparation du milieu liquide dans lequel on introduit la souche de spiruline que l'on veut voir croître et la deuxième consommation qui est une consommation d'entretien.

Chaque fois qu'on récolte de la spiruline, il faut remettre dans le bassin une quantité d'intrants en rapport avec ce qui vient de sortir du bassin sous forme de spiruline [64 ; 74].

Le milieu proposé par Zarrouk, (1966), est un milieu standard très souvent cité comme référence (Appendice 1). Il présente l'intérêt de s'adapter à presque toutes les souches de spiruline [73].

Par ailleurs, il faut savoir que tant que la spiruline est en croissance active, bien nourrie, récoltée, agitée, à $\text{pH} > 9,5$, d'une belle couleur vert foncé et que le milieu est régulièrement purgé, aucune espèce d'algue concurrente ne réussit habituellement à envahir le bassin. Cependant, l'apparition d'algues étrangères est toutefois possible [64]. Les bassins de culture doivent être entretenus et la culture doit être surveillée. L'observation au microscope permet aussi de constater si les filaments sont cassés (faute d'une agitation trop vive, d'une lumière accrue ou d'un manque de potassium), s'ils sont de petite taille (vitesse de croissance trop rapide, salinité ou pH trop élevés) ou à l'inverse, anormalement longs (manque de fer) [74].

I.6. Récolte et conservation

Une fois la culture prête pour la récolte, il est possible de prélever au moins 25 % de la culture par jour.

Aussi, pour récolter une spiruline aussi pure que possible, il est conseillé de la faire passer à travers une toile de $150\mu\text{m}$ avant celle de 30 ou $60\mu\text{m}$ de manière à recueillir les débris sur la première et la spiruline sur la deuxième toile et laisser passer le filtrat qui pourra être réutilisé dans le bassin de production. La pâte verte de spiruline qui s'accumule sur le filtre peut être récupérée [61] et un lavage à l'eau douce potable avant le pressage et le séchage peut être envisagé [64].

Une biomasse non lavée et pressée avec un taux de matière sèche (MS) de 20 à 30 % ne se conserve pas plus de quelques heures à température ambiante. Réfrigérée à 4°C , elle peut être conservée deux à trois jours.

La congélation de la biomasse de spiruline est possible [64].

Le séchage est le seul moyen sûr de conserver et de distribuer la spiruline sans chaîne de froid. La spiruline est séchée au soleil, ou dans un séchoir solaire indirect, ou électrique. La plupart des cultivateurs commerciaux de spiruline, utilisent le séchage par atomisation. Le séchage au tambour est également pratiqué et la lyophilisation demeure la meilleure méthode de séchage [61].

Seul un conditionnement opaque et sous vide peut garantir la conservation à longue durée de la spiruline et les sachets aluminisés multicouches thermoscellables sont fortement recommandés.

Une spiruline de bonne qualité, emballée sous vide dans ces sachets, et conservée à une température inférieure à 30°C se conserve pendant cinq ans [64].

II. Composition biochimique de la spiruline

Limnospira est une cyanobactérie filamenteuse commercialement importante qui est utilisé comme additif alimentaire et comme aliment pour les poissons, la volaille et les animaux d'élevage dans le monde entier. C'est une riche source de protéines, de minéraux, de vitamine B12, de β -carotène et d'acides gras essentiels, tels que l'acide α -linoléique [75].

II.1. Protéines

Les protéines de la spiruline représentent 10 à 11% de sa masse humide. Dans la spiruline sèche, les teneurs en protéines oscillent entre 50 et 70% [61]. Il est préférable de pratiquer la récolte de la spiruline le matin, car la teneur de la spiruline en protéines y est généralement plus élevée que le soir [61 ; 64].

La valeur biologique des protéines de la spiruline semble être très haute à la suite de sa composition en acides aminés essentiels [76]. Ses protéines majeures sont les phycocyanines [77]. La spiruline ne nécessite ni cuisson ni traitements spéciaux pour rendre ses protéines accessibles, elle ne contient pas de parois cellulosiques ce qui explique sa très bonne digestibilité 75 à 92% (caséine pure 95.1%) [77-79].

En termes d'acides aminés, les protéines de la spiruline contiennent des acides aminés qui représentent 47% du poids total des protéines [80].

La méthionine et la cystéine sont les acides aminés essentiels les moins représentés avec le tryptophane, la lysine et l'histidine (Tableau 1.1). Les plus fortes teneurs sont celles de la leucine, la valine, et l'isoleucine [77 ; 81].

Tableau 1.1 : Pourcentage moyen des acides aminés de *Spirulina platensis* selon différents auteurs [61 ; 82 ; 83] et de *Spirulina mexican* [84].

Acides aminés	Fox, 1999 [61]	Clément, 1975 [82]	Jacquet, 1974 [83]	Borowitzka, 1988 [84]
Acides aminés essentiels (%)				
Isoleucine	5,98	6,40	5,60	5,70
Leucine	8,71	9,00	8,00	8,70
Lysine	5,28	4,80	4,20	5,10
Méthionine	2,85	2,60	2,25	2,60
Phénylalanine	5,09	4,60	4,40	5,00
Thréonine	5,58	5,50	4,70	5,40
Tryptophane	1,48	1,60	1,00	1,50
Valine	7,72	6,90	5,70	7,50
Acides aminés non essentiels (%)				
Alanine	8,24	7,90	7,25	7,90
Arginine	7,92	6,70	6,60	7,60
Acide aspartique	9,50	9,20	9,30	9,10
Cystéine	0,93	0,90	0,95	0,90
Acide glutamique	13,20	12,90	N. C.	12,70
Glycine	5,07	5,00	4,80	4,80
Histidine	1,50	1,60	1,60	1,50
Proline	4,32	3,90	3,60	4,10
Sérine	5,46	5,60	5,00	5,30
Tyrosine	N. C.	4,90	4,30	4,60

II.2. Glucides

La spiruline sèche contient 13,6 à 25% de glucides [77 ; 85] et la paroi des Spirulines est formée de glucosamine.

L'essentiel des glucides assimilables est constitué de polymères à savoir des glucosannes aminés (1.9%) et des rhamnosannes aminés (9.7%) ou encore de glycogène (0.5%) [77].

Les glucides simples (glucose, fructose, saccharose) ne sont présents qu'à l'état de traces. On trouve aussi des polyols (glycérol, le mannitol et le sorbitol) [77].

Des polysaccharides sont aussi présents dans la spiruline. Le calcium-spirulan (Ca-Sp), est un polysaccharide caractéristique de la spiruline composé de résidus sulfatés avec essentiellement du rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, acide glucuronique et galacturonique, ainsi que d'ions sodium et calcium [86 ; 87]. Un autre polysaccharide, « *Immulina* », structurellement complexe et fortement hydrosoluble, représente entre 0,5% et 2% du poids sec de *Arthrospira platensis* [88 ; 89].

II.3. Lipides

La spiruline, à l'état sec, contient un taux de lipides qui oscille entre 5.6 et 13% [5 ; 62 ; 90] répartie entre une fraction saponifiable (83%) et une fraction insaponifiable (17%) [64]. La fraction saponifiable, représente 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la spiruline [61] ; Elle est essentiellement composée de diglycérides. Les triglycérides ne sont présents qu'à de très faibles taux (0,3%). Les phospholipides ne sont pas présents en quantité appréciable [82 ; 91].

La spiruline figure parmi les meilleures sources d'acide gamma-linolénique, un oméga 6 (ω -6), qui constitue 10 à 20% des acides gras chez *Arthrospira maxima* (soit 1-2% du poids sec) et jusqu'à 40% chez *A. platensis* (soit 4% du poids sec) [5 ; 92]. L'absence d'acide alpha-linolénique (oméga-3) a été bien établie [93]. *A.platensis* contient un sulfolipide, le sulfoquinovosyl-diacyl-glycerol (SQDG), qui a démontré par expérience *in vitro* sa capacité à inhiber la transcriptase inverse1 du hiv-1 et du hiv-2 [94].

La fraction insaponifiable est composée essentiellement de stérols, de terpènes, d'hydrocarbures saturés (paraffines) et de pigments. Cette fraction représente 1,1% à 1,3% de la matière sèche de la Spiruline [61].

II.4. Vitamines

Parmi les vitamines hydrosolubles, la vitamine C n'existe qu'à l'état de trace dans la Spiruline [77]. Cependant, on note la présence des vitamines du groupe B. Une teneur exceptionnelle en vitamine B12 (cobalamine) qui peut être expliqué par la possibilité de présence d'analogues de la vitamine B12 [95].

Parmi les vitamines liposolubles, la vitamine E est présente dans la spiruline à des taux supérieurs à 13 mg/Kg [96].

A noter que la méthode de séchage de la spiruline affecte ce taux [77].

Pour ce qui est le cas du β -carotène, elle représente une teneur élevée soit 40 à 80% des caroténoïdes de la spiruline, Les autres caroténoïdes, par ordre décroissant, sont : les xanthophylles, les cryptoxanthines, les échinénones, les zéaxanthines et la lutéine [97]. On trouve entre 700 et 2000 mg de β -carotène et environ 100 à 600 mg de cryptoxanthine par kilogramme de spiruline sèche [98].

Tableau 1.2 : Teneur en vitamines en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de Spiruline [77].

Vitamine	Teneur ($\mu\text{g/g}$)
B1 (thiamine)	34 - 50
B2 (riboflavine)	30 – 46
B3 (niacine)	130
B5 (pantothénate)	4,6 -25
B6 (pyridoxine)	5 – 8
B8 (biotine)	0,05
B9 (folate)	0,5
B12 (cobalamine)	0,10 – 0,34*
C (acide ascorbique)	Traces
Provitamine A (B-carotène)	700-1700
Vitamine E	50-190
Cryptoxanthine	100

* Hors pseudo vitamine B12.

II.5. Minéraux et oligoéléments

La teneur de *Arthrospira* en minéraux varie en fonction du milieu de culture [77]. Elle est très riche en fer, zinc, magnésium, calcium, phosphore et potassium (Tableau 1.3).

Les spirulines naturelles ont rarement des teneurs en fer dépassant 500 mg/kg mais des teneurs avoisinant 1000 mg/kg ont été enregistrées [99]. Elles ne contiennent généralement que des traces de zinc (21-40 $\mu\text{g/g}$) [100] et pratiquement pas de sélénium [101].

Enfin, la Spiruline ne semble concentrer l'iode qu'en présence de cobalt qui s'avère carcinogène [102 ; 103].

Tableau 1.3 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche [77].

Minéraux	Teneur de la spiruline sèche (mg/kg)
Calcium	1300-14000
Phosphore	6700-9000
Magnésium	2000-4000
Fer	600-6000**
Zinc	21-6000**
Cuivre	8-2000**
Chrome	2,8
Manganèse	25-37
Sodium	4500
Potassium	6400-15400
Sélénium	0,01-50**

**Valeurs obtenues par enrichissement spécifiques

II.6. Pigments

La Spiruline contient des chlorophylles (115mg/10g) dont la chlorophylle *a* (61 à 75 mg/10g), des caroténoïdes (orange) (37mg/10g) pour lesquels, la majeure partie est représentée par le β-carotène, précurseur de la vitamine A. Elle contient aussi des phycobiliprotéines telles la phycocyanine (bleu) (1500-2000 mg/10 g) et la phycoérythrine (rouge) (2900-10000 mg/10g) [104].

Les teneurs en phycocyanine et phycoérythrine varient selon la souche et les conditions de culture.

En effet, les teneurs en phycobiliprotéines (qui captent l'énergie lumineuse vers les photosystèmes) sont régulées par l'intensité de l'éclairement. La cyanobactérie *Spirulina*

platensis est une excellente source de phycocyanine. D'après Vonshak (1997), la fraction protéique pourrait contenir jusqu'à 20 % de phycocyanine [75]. En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel.

II.7. Toxicité de la spiruline

II.7.1. Toxicité par les métaux lourds

La spiruline est un chélateur des métaux lourds, elle a une forte capacité à fixer certains poly-cations (cadmium, plomb, chrome, cuivre) ce qui nécessite d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à la consommation humaine, des normes sont imposées à ce propos (Tableau 1.4). Cependant, la spiruline, possède une propriété de réduire les métaux lourds de l'organisme humain : arsenic, cadmium et mercure [105-108].

Les métaux lourds s'accumulent subrepticement, pour finir par atteindre des seuils toxiques. Les contaminants de métaux lourds les plus courants sont le mercure (Hg), l'arsenic, le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le chrome (Cr), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu). Ils sont non biodégradables donc, ils restent dans l'environnement et les systèmes biologiques [109].

Tableau 1.4 : Normes imposées en France pour la contamination des spirulines alimentaires en métaux lourds (Arrêté du 21/12/1979) [61].

Métal lourd	Norme admise (Sur poids sec, en ppm (mg/Kg))
Arsenic	≤ 3
Plomb	≤ 5
Etain	≤ 5
Cadmium	$\leq 0,5$
Mercure	$\leq 0,1$
Iode	≤ 5000

II.7.2. Toxicité par les microorganismes

La spiruline peut être contaminée par différents microorganismes dont les salmonelles et des germes anaérobies (tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Normes imposées par la normalisation française pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries (Arrêté du 21/12/1979) [61].

Type d'agent contaminant	Norme admise (Sur produit frais ou sec (germe/g))
Germes aérobie (30°C)	$\leq 100\ 000$
Coliformes fécaux (44,5°C)	< 10
Anaérobies sulfito-réducteurs (46°C)	< 100
<i>Clostridium perfringens</i>	≤ 1
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 100

II.8. Spiruline et réactions allergiques

Au niveau métabolique, la spiruline est très bien tolérée. Il n'a jamais été signalé d'allergies [110], en 2010, Pétrus et ses collaborateurs ont signalé la première manifestation allergique de la spiruline chez un enfant atopique de treize ans, après six heures de l'ingestion de spiruline, des troubles digestifs à type de diarrhée et érythème diffus. L'allergène responsable, la phycocyanine C, a été identifié [111].

III. Généralités sur la phycocyanine

Les cyanobactéries sont réputées pour leurs substances bioactives et nutriments, tels que les glucides dont fibres, les protéines dont phycobiliprotéines et peptides, les lipides, les minéraux, les vitamines et autres composés bioactifs [112].

III.1. Les phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines sont des pigments hydrosolubles, photosynthétiques accessoires agrégés dans la cellule sous forme de phycobilisomes attachés à leur tour à la membrane thylakoïde du chloroplaste [113].

Ce sont des molécules comportant une partie protéique liée de façon covalente (liaison thio-ether) à des chromophores ou bilines. Ces derniers sont composés de groupes tétra pyrroliques non cyclisés. On connaît quatre types de chromophores dans les biliprotéines des Cyanobactéries et de Rhodophycées : un chromophore bleu

(phycocyanobiline - maximum d'absorption dans le spectre visible à 660 nm), deux chromophores rouges (phycoérythrobiline, à 550 nm, et cryptoviolette ; à 590 nm), ainsi qu'un chromophore orangé (phycourobiline - maximum d'absorption à 495 nm) [114].

Sur ce, les phycobiliprotéines cyanobactériennes peuvent être divisées en trois classes principales :

- La phycoérythrine (PE – de coloration rose vif à rouge) ;
- La phycocyanine (PC - bleu foncé) ;
- L'allophycocyanine (AP-bleu plus clair) [115-117].

Ces phycobiliprotéines sont largement utilisées pour la fabrication de médicaments, aliments, cosmétiques et matériaux fluorescents [118 ; 119].

III.2. Les phycobilisomes

Chez les cyanobactéries, les phycobiliprotéines localisées à la surface des thylakoïdes (Figure 1.4) sont assemblées de façon superposée dans une même unité appelée phycobilisomes.

L'assemblage de façon géométrique des pigments est fait de manière à optimiser la capture de lumière et le transfert d'énergie [120].

Toutes les phycobiliprotéines absorbent directement la lumière incidente, mais elles participent également à une chaîne de transfert d'énergie dans le phycobilisome (le transfert d'énergie provient de la phycoérythrine → phycocyanine → allophycocyanine → chlorophylle) [31].

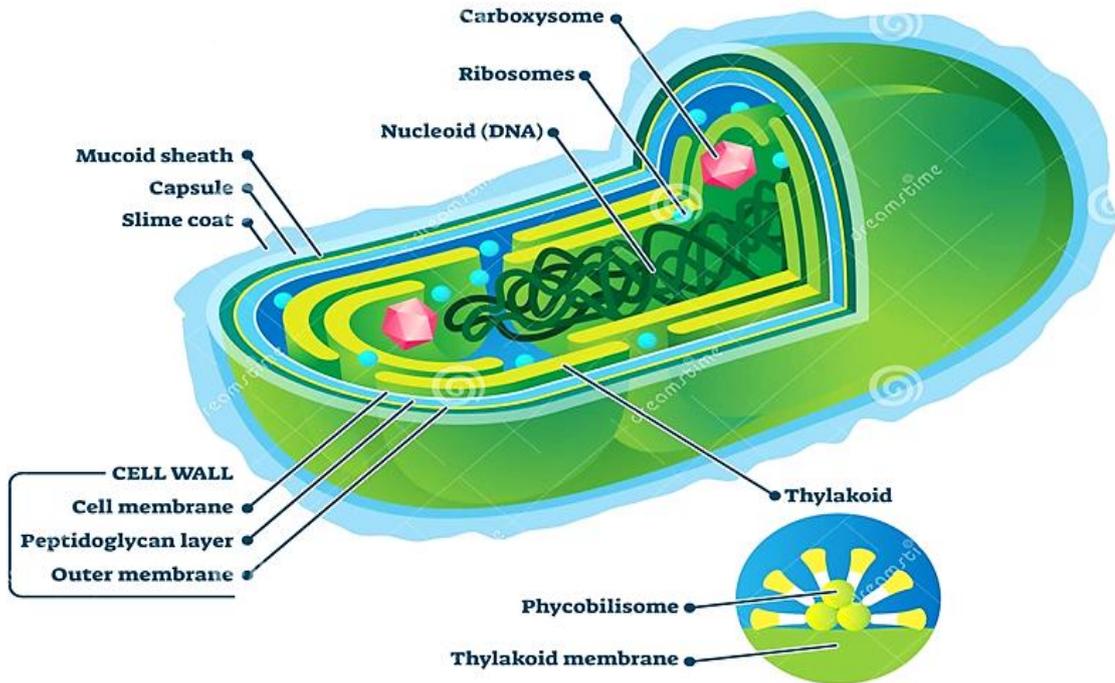
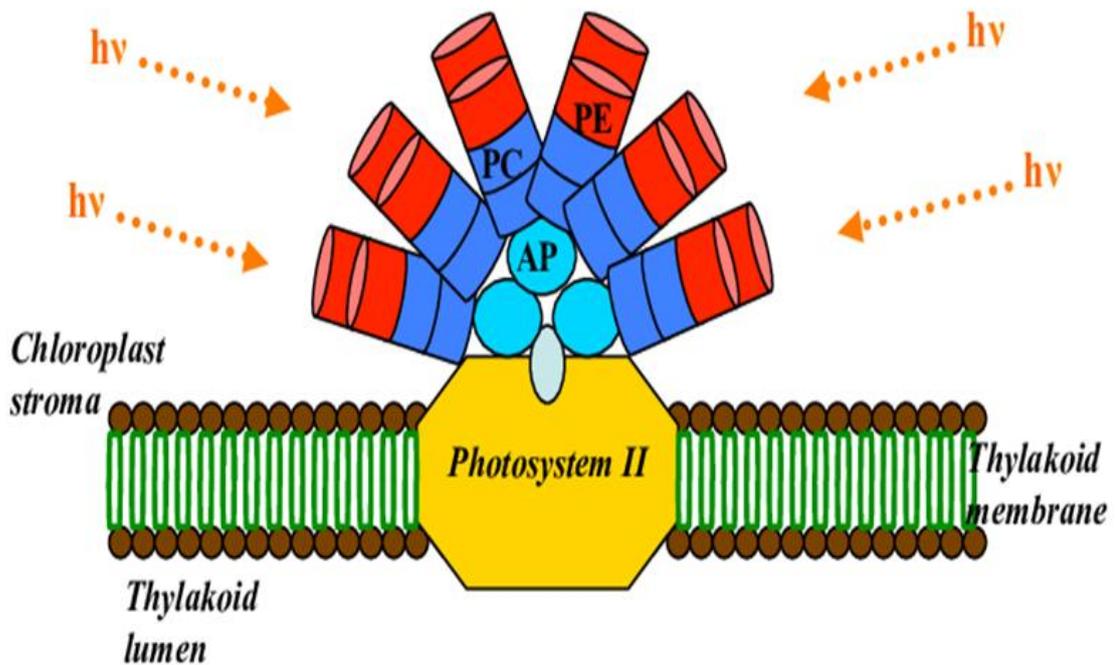


Figure 1.4 : Schéma de la structure interne d'une cyanobactérie

[\[https://www.dreamstime.com, 2024\]](https://www.dreamstime.com, 2024).

Le phycobilisome (Figure 1.5) est le complexe majeur, collecteur d'énergie lumineuse de l'appareil photosynthétique des Cyanobactéries.

Figure 1.5 : Organisation du Phycobilisome chez *Arthrospira platensis* [121].

(AP = APC) : Allophycocyanine ; (PE) : Phycoérythrine ; (PC) : Phycocyanine.

III.3. La phycocyanine

Les espèces du genre *Limnospira* sont une source considérable de pigments naturels, principalement la phycocyanine et l'allophycocyanine avec un rapport de 10 :1 [99]. Le groupe prosthétique de C-PC et A-PC est appelé phycocyanobiline (PCB) ou chromophore.

La masse moléculaire de la phycocyanine est comprise entre 44 et 260 kDa [34]. La phycocyanine est composée d'une protéine (composante apoprotéique), liée à un chromophore, appelé phycocyanobiline [122].

D'un point de vue structural, la phycocyanine consiste en un monomère formé de deux sous-unités en forme d'hélice, appelées alpha (α) et bêta (β), de type globuline, dont la masse moléculaire est comprise entre 12 et 20 kDa et entre 15 et 22 kDa, respectivement ; avec un chromophore bilinique attaché à la sous-unité α et deux d'entre eux à la sous-unité β . Les monomères se rassemblent pour former un trimère en forme d'anneau $(\alpha\beta)_3$, ce qui donne des structures hexamériques $[(\alpha\beta)_3]_2$ [38 ; 123 ; 124].

Le chromophore, appelé phycocyanobiline, est responsable de la couleur bleue de la molécule et consiste en des groupements prosthétiques linéaires isomériques de type tétrapyrrole à chaîne ouverte qui lie les protéines par une liaison thioéther (via la cystéine sur la (Figure 1.6) [125-127].

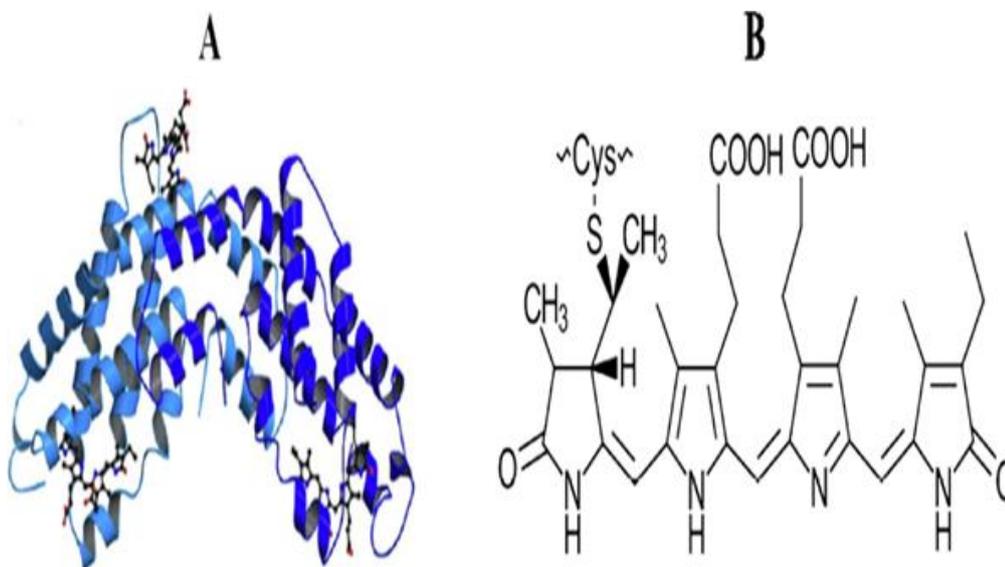


Figure 1.6 : Structure chimique du chromophore phycocyanobiline de la phycocyanine d'*Arthrospira platensis* [39]

(A) Représentation schématique des sous-unités α (couleur plus claire) et β (couleur plus foncée) de la phycocyanine ; (B) Structure chimique de la phycocyanobiline

En solution, la phycocyanine se présente sous la forme d'un mélange complexe de monomères, de trimères, d'hexamères et d'autres oligomères [34]. Le monomère $\alpha\beta$ n'est pas la forme stable, ni *in vivo*, ni dans les conditions habituelles d'extraction.

Selon le type de phycobiliprotéine, c'est l'état trimérique ($\alpha\beta_3$), ou hexamérique ($\alpha\beta_6$) qui est l'agrégat oligomérique stable. Les propriétés spectrales (absorption, fluorescence) sont liées à la composition chromophorique, aux interactions chromophore- chaînes polypeptidiques, mais aussi aux interactions entre les polypeptides d'un monomère, entre monomères d'un agrégat oligomérique [45 ; 128 ; 129].

La séquence complète en acides aminés a été déterminée pour les sous-unités (α , β) de l'allophycocyanine et de la phycocyanine des cyanobactéries [128]. La mesure de ces phycobiliprotéines par spectrophotométrie a été évaluée par différents auteurs [32 ; 129].

III.4. Extraction et purification de la phycocyanine

La teneur en C-PC dépend de plusieurs paramètres à savoir : la souche de spiruline, l'intensité de l'éclairage, la composition du milieu de culture, conditions de la culture...etc. L'utilisation d'une lumière rouge pour l'éclairage de la culture à la place d'une lumière ordinaire augmente la teneur et la pureté de C-PC [130 ; 131]. Des spirulines particulièrement riches en phycocyanine (environ 20 % du poids sec) existent [64].

III.4.1. Extraction de la phycocyanine

Plusieurs techniques conventionnelles ou traditionnelles ont été rapportées pour extraire la phycocyanine de la biomasse de la cyanobactérie *A. platensis* sous ses différents états physiques (sèche, humide et congelée) (Tableau 1.6). Les méthodes d'extraction de la C-PC s'avèrent être généralement longs tout en nécessitant l'utilisation massive de solvants organiques [132 ; 31].

L'extraction de la phycocyanine est difficile car la paroi cellulaire de cette cyanobactérie est très résistante [133], composée de quatre couches quatre couches : fibrille, peptidoglycane, protéines, et analogue aux bactéries gram négatives [134].

Plusieurs méthodes ont été signalées pour désagréger la paroi cellulaire, notamment l'homogénéisation, la sonication, les micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique, et la désintégration du lysozyme [45 ; 135-138]. L'extraction et la purification

de la phycocyanine peut être catégorisée en trois processus principaux, y compris la désintégration des cellules, l'extraction et la purification [139]. Le processus d'extraction doit être efficace en termes de rendement d'extraction élevé et doit être respectueux de l'environnement. Diverses méthodes d'extraction ont été optimisées pour maximiser le rendement et la pureté de la phycocyanine.

Tableau 1.6 : Les différentes méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines [31 ; 45].

Méthodes d'extraction	Biomasse	Avantages	Limites
Congélation / décongélation	Fraîche et sèche	<ul style="list-style-type: none"> • Simple, rapide (10-12h), reproductible, ne dépend pas de la qualité de biomasse, pas de corrosion du matériel, n'affecte pas la qualité biologique des protéines • Douce et non dénaturante 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à réaliser à l'échelle industrielle
Sonication	Fraîche et sèche	<ul style="list-style-type: none"> • Grande productivité à petite échelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à réaliser à l'échelle industrielle • Utilise une forte fréquence (20 à 50 kHz)
Précipitation fractionnelle avec du sulfate d'ammonium	Fraîche et sèche	<ul style="list-style-type: none"> • Pas cher, précipitation facile des protéines sans dénaturation 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à réaliser à l'échelle industrielle
Chromatographie échangeuse d'ions	Fraîche et sèche	<ul style="list-style-type: none"> • Utiliser pour une purification élevée des phycobiliprotéines 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile à réaliser à l'échelle industrielle
Homogénéisation	Fraîche	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide (10 à 12h) 	<ul style="list-style-type: none"> • Risque de contamination
Extraction à l'eau	Fraîche	<ul style="list-style-type: none"> • Non toxique 	<ul style="list-style-type: none"> • Très lente
Extraction à l'acide	Fraîche	<ul style="list-style-type: none"> • L'extraction d'acide serait utile pour l'extraction directe du pigment phycocyanobiline à partir de la phycocyanine 	<ul style="list-style-type: none"> • Dénaturation des phycobiliprotéines

III.4.1.1. Extraction par sonication

Il s'agit d'une méthode très efficace pour extraire la phycocyanine de la biomasse humide et sèche. Une ultrasonication (US) de 10 minutes a permis d'obtenir la concentration et la pureté les plus élevées à partir de la biomasse humide de *Arthrospira platensis* [140]. De même, l'ultrasonication avec un rapport biomasse/solvant de 1 :50 et des cycles de congélation/décongélation a été efficace pour la biomasse sèche, avec un rendement de 54,65 mg/g [46].

Les bains de nettoyage à ultrasons ou les systèmes de sonde sont principalement utilisés pour briser la paroi cellulaire des bactéries [141]. Les bains ultrasoniques à l'échelle du laboratoire permettent d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés que le système à sonde [142].

Appliquée à l'extraction de C-PC, l'ultrasons peut extraire des composés interférents, tels que des débris cellulaires, des chlorophylles et des protéines indésirables, nécessitant une étape de purification supplémentaire [41 ; 143]. Par conséquent, la pureté de l'extrait doit être évaluée lorsque cette technologie est utilisée.

III.4.1.2. Extraction avec des cycles de congélation-décongélation

Les cycles répétés de congélation-décongélation sont une méthode courante, particulièrement efficace pour extraire la phycocyanine d'*Oscillatoria quadripunctulata*, avec un taux de pureté de 3,31 [144]. Cette méthode est également fréquemment utilisée en combinaison avec d'autres techniques telles que l'ultrasonication [145].

III.4.1.3. Extraction chimique

Le chlorure d'ammonium a été identifié comme un solvant efficace et peu coûteux pour l'extraction de la phycocyanine car offrant une plus grande pureté que le phosphate de sodium [146]. En outre, le sulfate d'ammonium est utilisé pour une purification partielle, améliorant la pureté à près de 1 [46].

En effet, l'utilisation de solutions salines pour l'extraction (également appelée *salting-in*) et la purification (également appelée *salting-out*) des protéines [139] semble être une des méthodes les plus efficaces.

L'eau et le tampon phosphate sont des solvants couramment utilisés pour l'extraction de la C-PC. Le pH optimal pour l'extraction est d'environ 7,5, ajusté à 6,0-6,5 après l'extraction pour des raisons de stabilité [41].

III.4.1.4. Extraction enzymatique

Le traitement au lysozyme a été utilisé pour extraire la phycocyanine de *Calothrix* sp., s'en est suivie une purification à l'aide de techniques de chromatographie [147].

III.4.1.5. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

L'extraction assistée par micro-ondes s'est révélée plus efficace que l'extraction par ultrasons, avec une concentration et une pureté plus élevée de la phycocyanine extraite de *Arthrospira platensis* [148].

III.4.1.6. Méthodes d'extraction combinées

Des méthodes innovantes combinant les ultrasons et des solutions salines (sulfate d'ammonium) ont été développées pour rationaliser le processus d'extraction et de purification, permettant d'obtenir des degrés de pureté élevés directement à partir de la biomasse fraîche [149]. Ces méthodes et conditions (Figure 1.7) garantissent une extraction efficace et une grande pureté de la phycocyanine, ce qui permet de l'utiliser pour diverses applications commerciales.

Cependant, il s'agit d'une molécule coûteuse et compliquée à extraire. Après extraction et en cas de contamination bactérienne, cette molécule se dégrade très rapidement. Sous forme liquide, dans l'eau, cette molécule doit être extraite dans des conditions stériles et de préférence conditionnée en mono-doses (par exemple des ampoules en verre) car après ouverture le milieu n'étant plus stérile. La phycocyanine est détruite [34 ; 131].

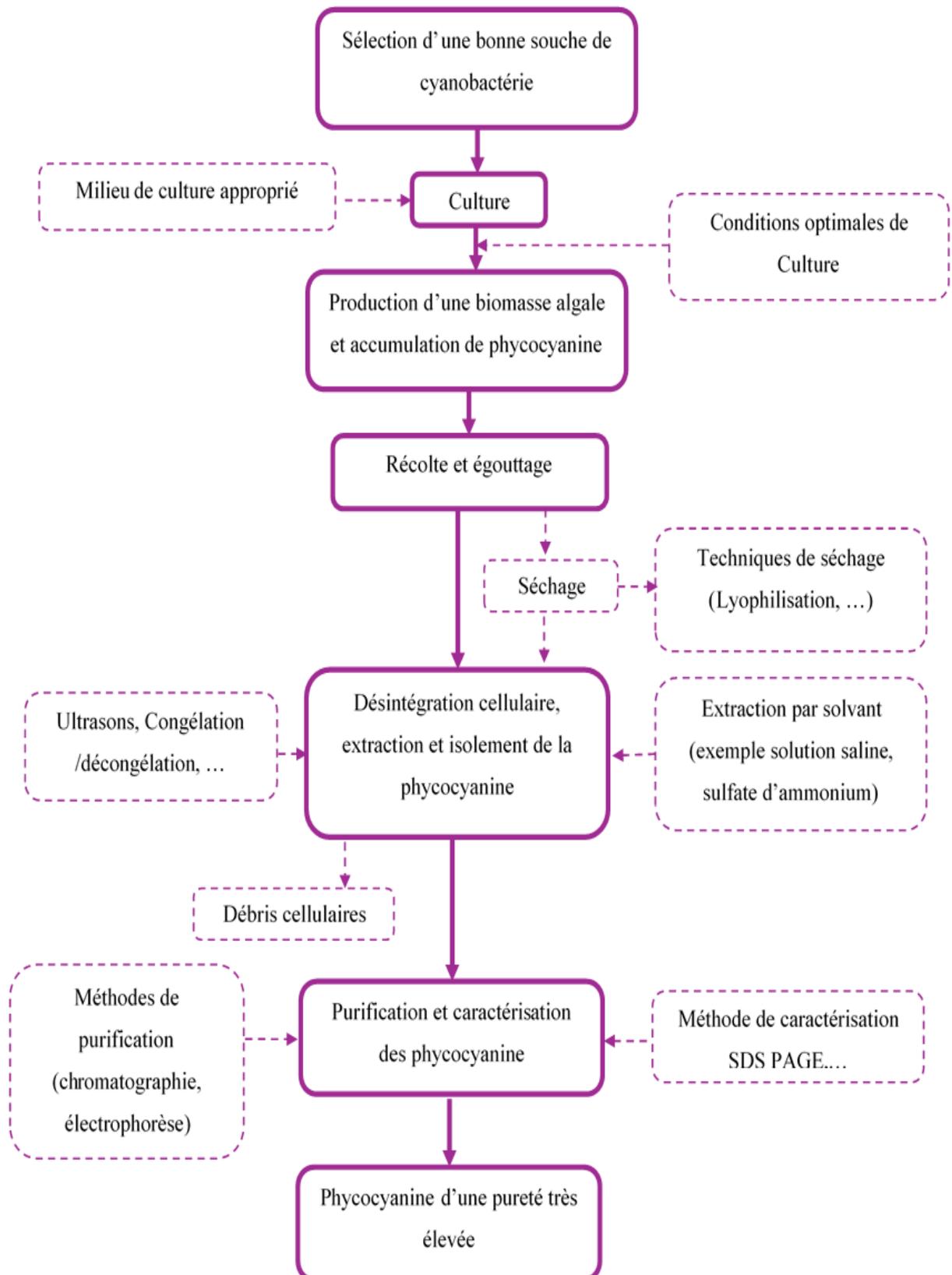


Figure 1.7 : Processus d'extraction et de purification de la phycocyanine [31 ; 45] modifié.

III.4.2. Purification de la phycocyanine

Pour les applications industrielles, biomédicales et pharmaceutiques, de la Phycocyanine pure doit être utilisée. Une séquence d'étapes comprenant la précipitation, la dialyse, techniques chromatographiques sont couramment appliquées même si elles présentent certains inconvénients, notamment un coût élevé, un traitement de longue durée, un faible rendement et un durcissement [150].

La qualité de la phycocyanine est mesurée par l'indice de pureté qui décrit le rapport entre l'absorbance de la phycocyanobiline à 620 nm et celle de toutes les protéines de l'échantillon à 280 nm à l'aide d'un spectromètre UV [151]. Les phycocyanines dont l'indice de pureté est de 0,7 ; 3,9, et supérieur à 4,0 sont considérées comme étant de qualité alimentaire, de qualité réactive et de qualité analytique, respectivement [120 ; 130]. Les fractions qui manifestent une pureté supérieure à 4 sont considérées comme très pures [122 ; 152].

Récemment, certaines études ont suggéré l'utilisation de solutions salines comme solvant (Figure 1.7) pour augmenter le degré de pureté des C-PC [31 ; 146 ; 153].

La précipitation de la phycocyanine avec une solution saturée de sulfate d'ammonium (Figure 1.7) est une étape de purification primaire [130] et est couramment utilisée comme première étape dans la purification des protéines. L'extraction de précieux composants actifs (par exemple, la phycocyanine) avec une grande pureté est encore coûteuse [154]. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des méthodes efficaces et économiques (peu coûteuses) pour la purification des protéines qui contribuent à la pureté élevée et au rendement de récupération de la phycocyanine présentant diverses caractéristiques et activités biologiques.

III.5. Stabilité de la phycocyanine

La phycocyanine est sensible à divers facteurs environnementaux tel le pH, la température et la lumière, qui affectent considérablement sa stabilité.

Ainsi, sous sa forme aqueuse, elle se dégrade rapidement en cas de contamination bactérienne et doit donc être conservée par différentes techniques. Toutefois, il est connu qu'en milieu aqueux, la stérilisation par la chaleur ou les ultraviolets dégrade la phycocyanine et elle perd toute son efficacité après ouverture du conditionnement,

impliquant de ce fait un conditionnement en monodose [131].

III.5.1. Le pH

La phycocyanine présente une stabilité maximale à un pH allant de la neutralité à une légère acidité, soit entre 7 et 5. Le pH optimal pour la stabilité se situe autour de 5,5-6,0 [32 ; 155 ; 156]. À des niveaux de pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 7, la stabilité diminue de manière significative [157 ; 158].

III.5.2. Température

La phycocyanine est stable à des températures allant jusqu'à 45°C. Cependant, sa stabilité diminue rapidement à des températures plus élevées, une dégradation significative étant observée à des températures supérieures à 60°C [32 ; 155 ; 156 ; 159]. La dégradation suit un modèle cinétique de premier ordre, les températures plus élevées accélérant le taux de dégradation [155 ; 160].

III.5.3. La lumière

L'exposition à la lumière peut également dégrader la phycocyanine. La phycocyanine reste plus stable dans l'obscurité [156 ; 157 ; 161].

III.5.4. Agents stabilisateurs

L'ajout de sucres tels que le glucose, le saccharose et le fructose peut améliorer la stabilité de la phycocyanine. Par exemple, 20 à 40 % de glucose ou de saccharose peuvent maintenir la stabilité à des températures plus élevées [32 ; 157].

Le chlorure de sodium est un stabilisateur efficace, qui maintient la stabilité de la phycocyanine à un pH neutre et à de faibles concentrations [32 ; 156 ; 159].

Les techniques d'encapsulation utilisant des matériaux tels que l'alginate, le chitosane et l'isolat de protéines de lactosérum peuvent améliorer de manière significative la stabilité de la phycocyanine dans diverses conditions.

III.6. Propriétés structurantes des protéines

Les protéines forment et gèrent la constitution structurelle de la majorité des aliments.

Les structures d'autres aliments sont habituellement stabilisées par les polysaccharides et des protéines alimentaires [162].

Les fonctions structurantes d'une protéine doivent assurer la formation de la structure nécessaire, la texture et les propriétés technologique d'un aliment. Elle détermine la possibilité de varier la composition, les propriétés physico-chimiques, organoleptiques et autres qualités d'un aliment formulé. Pour qu'un additif alimentaire protéique soit efficace il doit avoir de bonnes propriétés fonctionnelles. Généralement cela signifie que la protéine est soluble et possède de bonnes propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes [162].

Chapitre 2



Matériel et Méthodes

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel biologique

Dans notre partie expérimentale, La cyanobactérie utilisée est une souche originaire de l'Algérie, Tamanrasset. Connue sous le nom commun de *Spirulina Htam*. Deux formes de cette souche ont été utilisées. La forme séchée et la forme fraîche en culture.

La spiruline fraîche, cultivée sur le milieu Zarrouk a été utilisée pour son identification génétique.

La forme séchée, cultivée dans milieu Hiri (Appendice A) a été utilisée pour la caractérisation biochimique, l'optimisation de l'extraction de sa protéine majoritaire et l'extraction de la C-PC pour sa caractérisation structurante.

II. Caractérisation génomique de la cyanobactérie de Tamanrasset et des bactéries associées à sa culture

II.1. Isolement de la cyanobactérie

La souche de cyanobactérie utilisée a été obtenue de la ferme de culture du Dr. Hiri. Elle a été isolée pour la première fois en 2004 d'une « *guelta* » située dans la région de Taguemart près du massif cristallin du Hoggar, Tamanrasset, Algérie (22°58'35" N 5°25'17"E) (Figure 2.1). Les gueltas, qui constituent l'une des principales caractéristiques du Hoggar (également appelé « Aguelmane »), sont de vastes puits profonds alimentés par les eaux de ruissellement (les précipitations sont rares et irrégulières) et les réserves souterraines stockées dans des roches perméables et poreuses (grès ou roches volcaniques). Ce sont des sols carbonatés (calcimagnésiens) pauvres en matière organique et salino-alcalins.

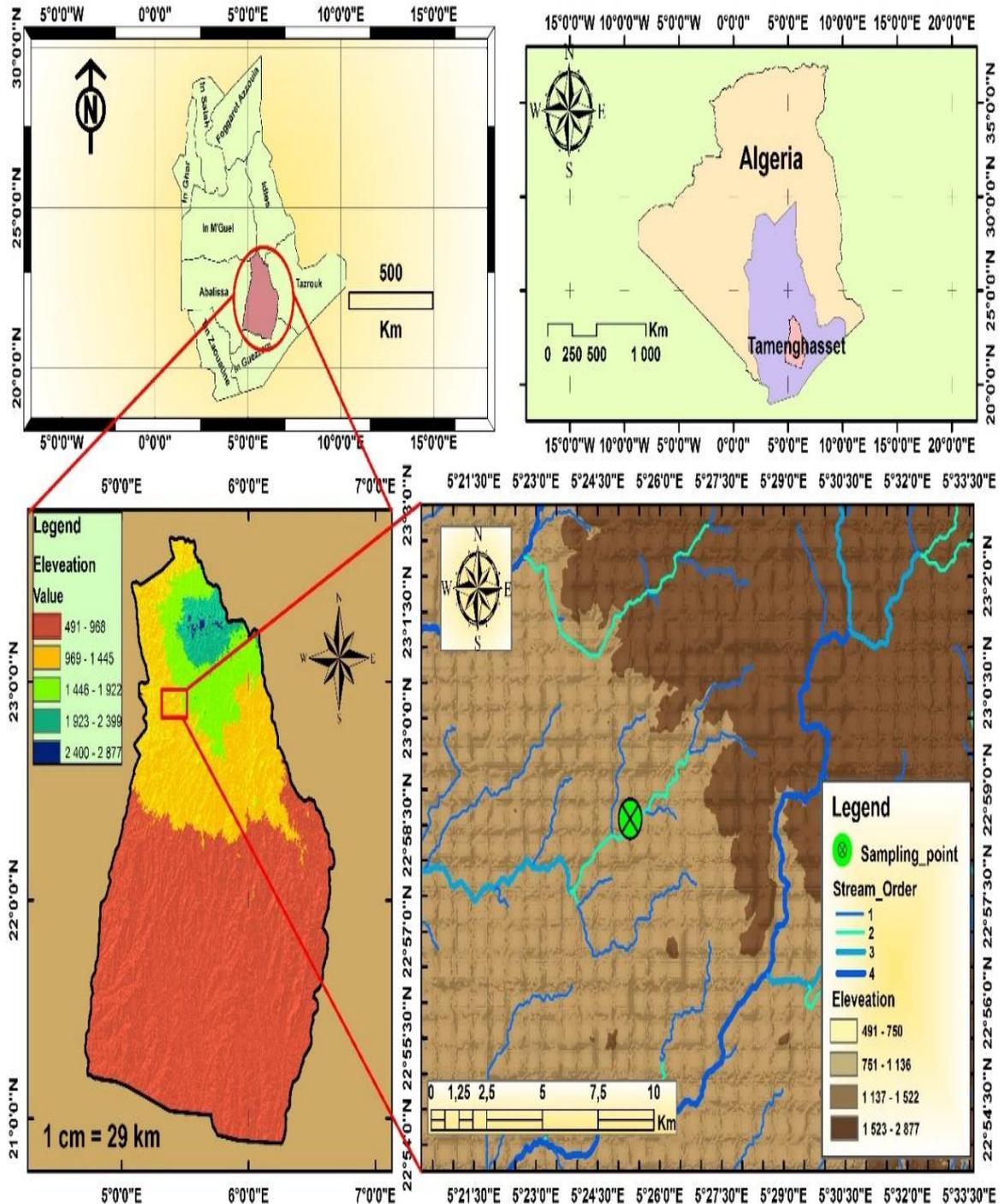


Figure 2.1. Cartographie du site d'isolement de la spiruline *Limnospira sp AlgLouSa11* [163]

II.2. Conditions de culture de la cyanobactérie

Des cultures de la souche de la spiruline isolée ont été maintenues dans des flacons de culture cellulaire de 250ml (Type Greiner) contenant 100 ml du milieu de culture Zarrouk sous une atmosphère ambiante normale (Figure 2.2.).

Les cultures ont été maintenues à 25°C, sous agitation (128 rpm) et lumière continue.

Le milieu Zarrouk utilisé est un milieu de référence pour la culture de la spiruline [73] et sa composition détaillée est donnée en (Appendice B).



Figure 2.2. Cultures de la souche de la spiruline (Photo originale)

Lors de la réalisation des expérimentations et après plusieurs extractions et séquençage de l'ADN, la qualité des acides nucléiques a toujours été mauvaise, nous avons opté donc pour l'étude de la stérilité de la culture puis l'identification génétique des bactéries associées à la culture, ou contaminants, de la cyanobactérie de Tamanrasset.

II.3. Isolement et purification des bactéries associées à la culture de la *Limnospira sp.* *AlgLouSal1*

Un aliquote de 100µl de la culture de spiruline a été prélevé et additionné à 900µl de solution saline stérilisée (contenant 0.85% NaCl). Des dilutions décimales ont été préparés. Puis, 100µl de chaque dilution ont été étalé en boîte de Pétri sur 2 milieux solides : le milieu *Lysogeny broth* (LB) ; et le milieu Zarrouk + 10% LB (ZLB). Une incubation de 5 à 10 jours a été réalisé à 30°C. En se basant sur l'aspect morphologique des colonies, quatre types de colonies ont été isolés. Le nombre d'unités formant les colonies (ufc) sur trois dilutions successives ont été compté et ont fait l'objet d'une moyenne.

La purification des contaminants a été faite sur milieux *Lysogeny broth* et *Zarrouk-Lysogeny broth*.

Des culture liquides pures ont été ainsi préparé dans un bouillon ZLB dans des flacons de culture cellulaire de 40 ml (Type Greiner).

II.4. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN de l'*Arthrospira* et ceux des quatre bactéries associées à sa culture a été faite à partir de cellules récoltées au début de la phase de croissance exponentielle (D.O. \approx 0.8 à 1). Les cellules ont été collectées après centrifugation de 6 ml de culture liquid (10 min, 8000 x g).

L'ADN a été extrait selon le protocole proposé par Morin et ses collaborateurs [164]. Les procédures d'extraction ont été répétées 3 fois.

Les cellules ont été mises en suspension dans 0,5 ml de 0,15M NaCl et 0,1 M de EDTA, et versées dans des flacons cryogéniques de 2 ml. Trois cycles de congélation décongélant, alternant congélation dans l'azote liquide et décongélant à 37 °C dans un bain-marie, ont été utilisés pour endommager les parois cellulaires et les faire éclater pour optimiser la lyse enzymatique ultérieure. Les cellules ont été collectées par centrifugation (10 min, 8000 rpm), remises en suspension dans 0,5 ml de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, avec pH = 8.0) puis transférées dans de nouveaux tubes de 2 ml pour la lyse enzymatique des parois cellulaires avec 100 μ l de 50 mg/ml de lysozyme pendant 30min à 37°C. Ensuite, les protéines ont été dégradées avec 5 μ l de 50 mg/ml de protéinase K et dans une concentration finale à 2 % de SDS, pendant 1 heure à 37 °C.

Les polysaccharides, les protéines et les débris de la paroi cellulaire ont ensuite été éliminés par précipitation sélective avec du CTAB en présence de NaCl : 150 μ l de NaCl à 5 M ont été ajoutés aux tubes, suivis de 0,1 volume d'une solution mère de CTAB à 10 %.

Les échantillons ont été doucement mélangés par inversion, puis incubés à 65 °C pendant 10 min pour optimiser la formation de complexes CTAB-protéines et polysaccharides. La purification des acides nucléiques a été réalisée par extraction dans 1 volume de chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1).

Les tubes ont été placés dans un bain d'acide pendant 30 minutes pour permettre la précipitation des complexes CTAB avant d'être centrifugés (10 minutes, 8000 rpm).

Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube, mélangé doucement avec 0,6 volume d'isopropanol jusqu'à ce que l'ADN précipite. Les culots d'ADN ont été récupérés par centrifugation (10 min, 4 °C, 15 000 rpm) et lavés avec 1 ml d'éthanol 70 % glacé pour éliminer tout sel résiduel. Après une dernière centrifugation (5 min, 4 °C, 15 000 rpm), le surnageant a été éliminé et les culots ont été récupérés avant d'être remis en suspension dans 100 µl de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Les échantillons ont été traités avec 1 µl d'ARNse (10 mg/ml) pendant 1 h à 37 °C

La quantité et la pureté ont, par la suite, été déterminées par spectrophotométrie. Les ADN ainsi extraits, ont été stockés à -20 °C avant d'être utilisés.

L'extraction de l'ADN des contaminants, ou bactéries associées à la culture de la souche de spiruline, a été faite en utilisant le kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit (A1125)*. En effet, 3ml d'une culture liquide de chaque contaminant, ont été centrifugés (2 min, 14100 rpm) pour récupérer les cellules puis l'extraction a été faite conformément aux instructions du fabricant (<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>).

II.5. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

II.5.1. Amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S chez *Limnospira sp.*, et séquences d'espacement intergénique (ITS) entre le gène de l'ARNr 16S et le gène de l'ARNr 23s.

Des réactions d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été réalisées pour la région de l'ARNr 16S et pour les deux clusters (CI I R et CI II R) et les quatre sous-clusters (CL I SUB A R ; CL I SUB B R ; CL II SUB A F et CL II SUB B F) caractérisant les variations ITS des espèces d'*Arthrospira / Limnospira* (tableau 2.1).

Dans un volume total de 50 µl, 1 µl d'extrait d'ADN a été ajouté à 1 µl d'amorce Forward, 1 µl d'amorce R, 1 µl de dNTPs 0,2 mM, 1 µl de Dream Taq polymérase (5M/µl), 5 µl de PCR Bufer, 5 µl de BSA (1mg/ml), et 35 µl d'eau milli-Q.

Le programme de cyclage final appliqué pour l'amplification de l'ADNr 16S (Figure 2.3.) , utilisant 16S3' F et 23S5' R, a été fait selon Sheldman [9].

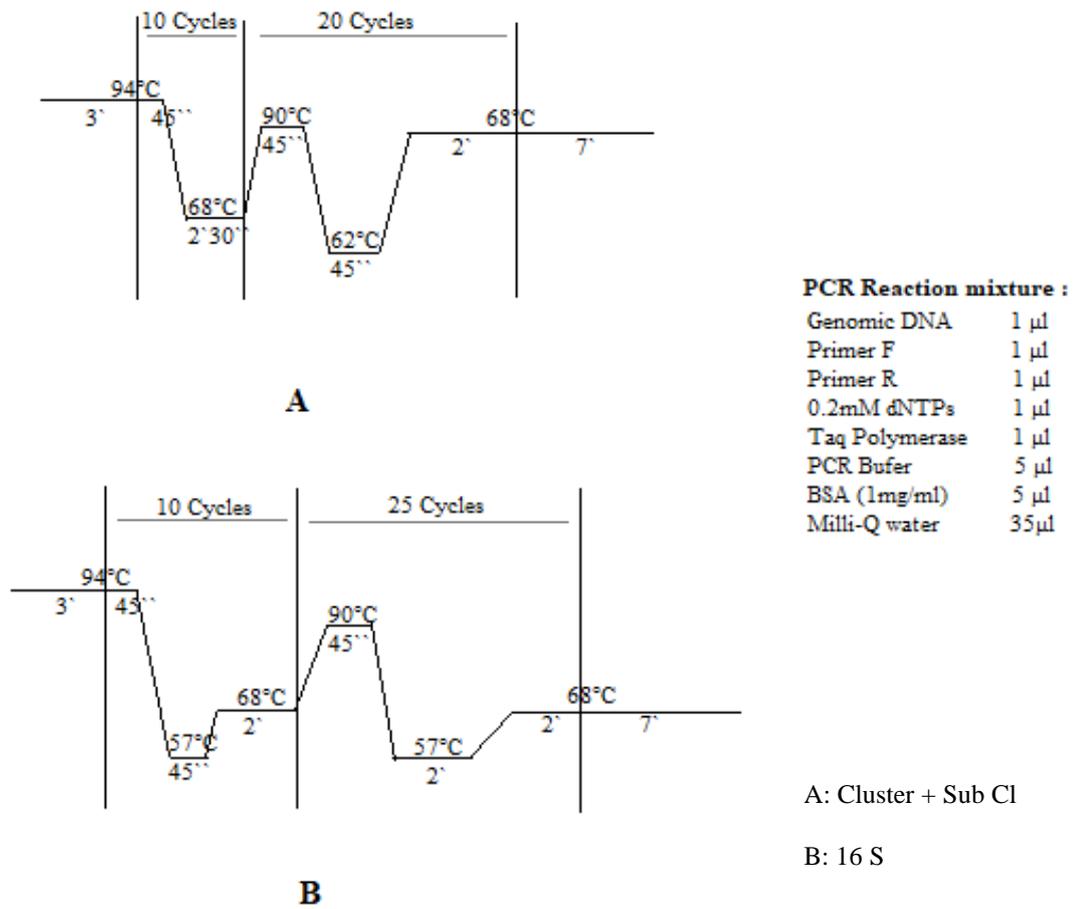


Figure 2.3. : Programme de cyclage final appliqué pour l'amplification de l'ARNr 16S, utilisant 16S3' F et 23S5' R.

Les programmes PCR pour les clusters et les subclusters ont été sélectionnés conformément aux protocoles décrits dans Bourain et *al.* [10].

Tableau 2.1 : Liste des amorces PCR, orientation et séquences de nucléotides (sens 5' à 3') [10].

Amorce	Orientation	Sequence
CL I	Reverse	CAG-TCA-CCA-ACT-CTC-AAT-TTC-TCA-A
CL II	Reverse	CTC-ACC-CCA-ACT-AGC-ACC-ATC-ACA-A
CL I SUB A	Reverse	CTC-ACC-CCA-ACT-AGC-ACC-TAA-TTC-T
CL I SUB B	Reverse	CTC-ACC-CCA-ACT-AGC-ACC-TAA-TTA-A
CL II SUB A	Forward	AGT-TGG-GGT-GAG-ATG-AGA-TGA-GAT-G
CL II SUB B	Forward	AGT-TGG-GGT-GAG-ATG-AGA-TGA-GGT-T
16S3' F	Forward	TGY-GGC-TGG-ATC-ACC-TCC-TT
Long 23S5' R	Reverse	TCT-GTG-TGC-CTA-GGT-ATC-CAC-CGT-T

II.5.2. PCR pour les gènes de l'ADNr 16S des contaminants.

Dans le cadre de notre travail de recherche, le thermocycleur GenAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) a été utilisé pour les réactions PCR dans un volume réactionnel de 50µl sur des quantités de matrice de 1µl.

Le mélange réactionnel contenait : 1 µl d'extraction d'ADN, 2 µl d'amorce F, 2 µl d'amorce R, 2 µl de dNTPs 10mM, 0,5 µl de Dream Taq (5M/µl), 5 µl de Buffer 10x et 37,5 µl d'eau milli-Q.

Des amorces universelles d'eubactéries 8 F et 1492 R ont été utilisées.

II.5.3. Quantification et détermination de la pureté de l'ADN

Afin de pouvoir mesurer la concentration de l'ADN extrait et son degré de pureté, un NanoDrop 2000 « Thermo Scientific » a été utilisé (Figure 2.4).

La pureté d'un échantillon d'ADN est définie par les ratios 260/280 et 260/230 [165].

Cette opération est suivie d'une analyse par électrophorèse.



Figure 2.4 : Photographie du *NanoDrop* utilisé (Photo originale)

II.5.4. Analyse de l'ADN par électrophorèse.

Les produits de la PCR ont été visualisés par la suite avec électrophorèse sur gel d'agarose (1% agarose avec éthidium bromide à 100 V durant 1h30 min).

Cinq μl d l'ADN isolé ont été chargé sur le gel ainsi qu'un marqueur approprié (100pb).

L'observation des gels a été faite à l'aide d'un Biorad Gel Doc XR+ Imaging System (Figure 2.5).



Figure 2.5 : Photographie montrant la migration sur gel électrophorèse (a) et le bio-rad de lecture des gels (b) (Photo originale)

II.6. Purification des produits de la PCR

Les produits de la PCR sont déposés sur gel d'agarose avant que l'électrophorèse soit réalisée.

Les bandes du fragment d'ADN d'intérêt ont été excisées des gels sur un transilluminateur UV (Figure 2.6), et l'ADN a été extrait par centrifugation et traité à l'aide du Wizard® SV Gel et PCR Clean-Up System (A9282) conformément aux instructions du fabricant

(<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technicalbulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/>).



Figure 2.6 : Photographie de l'électrophorèse de purification (Photo originale)

Le séquençage a été fait selon la méthode Sanger par le laboratoire *MacroGen*.

II.7. Séquençage du génome entier, annotation et analyse phylogénomique

Le séquençage Illumina a été réalisé sur la plateforme *Illumina HiSeq 2500* à l'aide d'un séquençage à extrémités appariées (BaseClear, Leiden, Pays-Bas). Les reads traités ont été assemblés *de novo* à l'aide de Spades v3.15.5 [166] avec le drapeau meta. L'assemblage a été regroupé avec MetaBinner [167] et les différents regroupements ont été évalués avec CheckM v1.2.1 [168] et GTDB-Tk v2.1.1 [169].

Les contigs dans le bin de *Limnospira sp. AlgLouSa11* ont été réordonnés sur la base du génome de *Limnospira fusiformis KN01* (GCF_014489865.2) pour être enfin disponibles dans la NCBI Sequence Read Archive sous le numéro d'accès PRJNA926371.

La phylogénie a été construite avec *PhyloPhlAn* v3.0 en utilisant le pipeline supermatrix et *Planktothrix tepida* PCC 9214 comme outgroup [170].

Le génome de *Limnospira sp. AlgLouSa11* a été annoté avec Prokka 1.14.6 [171] et les séquences CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ont été prédites à l'aide de CRISPRCasTyper 1.8.0 [172].

Les régions prophages ont été identifiées à l'aide de l'outil PHASTER [173] sachant que AntiSMASH a été utilisé pour examiner la présence de groupes de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires [174].

III. Caractérisation de la cyanobactérie *Limnospira sp. AlgLouSall*

III.1. Caractérisation microscopique

Une simple observation sous un microscope optique à l'objectif 40 (G×400) de la souche de la cyanobactérie fraîche sujet d'étude, a été réalisé.

III.2. Caractérisation biochimique et physico-chimique

Afin d'évaluer la composition biochimique de la souche de spiruline *Limnospira sp. AlgLouSall*, nous avons considéré la spiruline séchée cultivée sur le milieu Hiri en poudre, conditionnée dans des sachets de 25g. La spiruline a été achetée de chez le Docteur HIRI qui produit cette microalgue dans des bassins de culture à Tamanrasset puis récoltée, et séchée dans un séchoir solaire, à l'ombre et à température ambiante.

Pour chaque paramètre trois répétitions ont été effectuées. D'autres répétitions ont été menées dans le cas où les résultats des analyses statistiques montrent la nécessité d'essais supplémentaires.

III.2.1. Détermination de la teneur en humidité

La détermination de la teneur en humidité (ou en eau) a été faite par dessiccation à $103\pm 2^\circ\text{C}$, selon la norme (NF V 04-282/ ISO 5534), dans une étuve ventilée, à la pression atmosphérique jusqu'à stabilité du poids.

La teneur en eau est égale à la perte de masse subite dans ces conditions (équation 2.1).

$$H (\%) = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100 \quad \text{Equation (2.1)}$$

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

P0 : masse, en grammes, de la capsule vide ;

P1 : masse, en grammes, de la capsule et de la prise d'essai ;

P2 : masse, en grammes, de la capsule et le résidu sec.

III.2.2. Détermination de la teneur en matière grasse

Le dosage de la matière grasse a été réalisé après une extraction à chaud de la matière grasse par entraînement avec l'hexane dans un extracteur *Soxhlet* à partir de la poudre de spiruline, suivi d'une concentration dans l'évaporateur rotatif.

Les résultats, exprimés en pourcentage du poids de gras par rapport au poids initial, sont donnés par l'équation (2.2) noté ci-dessous.

$$MG (\%) = \frac{B1-B0}{Pe} \times 100 \quad \text{Equation (2.2)}$$

Avec :

MG (%) : Taux de la matière grasse, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

B1 : Masse, en grammes, du ballon plein (après extraction) ;

B0 : Masse, en grammes, du ballon vide ;

Pe : Masse, en grammes, de la prise d'essai initiale.

III.2.3. Détermination de la teneur en protéines

Le principe de ce dosage consiste en la transformation de l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral puis le titrage de l'ammoniaque par un dosage acido-basique.

La méthode de *Kjeldahl* passe par 3 étapes principales à savoir la minéralisation, la distillation et le titrage.

Le titrage a été effectué aussi rapidement après la distillation par une solution d'acide chlorhydrique (HCL) 0,25 N jusqu'à persistance du point de virage.

Les résultats sont donnés par l'équation (2.3).

$$P (\%) = \frac{(V1-V2) \times C \times 1.4}{m} \times 6.25 \quad \text{Equation (2.3)}$$

Où :

P : Le taux de protéine, en pourcentage.

C : concentration de l'acide chlorhydrique (0.25N).

V1 : volume de titrage en ml.

V2 : volume de titrage de l'essai à blanc en ml. *m* : masse de la prise d'essai de l'échantillon.

1,4 : masse atomique de l'azote.

6,25 : est le facteur de conversion de la protéine

III.2.4. Détermination de la teneur en sucres totaux

La méthode de *Dubois* [175], utilisée, permet de doser les oses et les hexoses en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré. En présence de ces deux réactifs, les oses donnent une couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides.

La lecture des densités optiques à 490 nm contre un blanc a été effectuée dans un lecteur microplaque *Multi Scan GO*.

Les résultats sont obtenus en se référant à une courbe d'étalonnage (Appendice C).

III.2.5. Détermination de la teneur en fibres

La teneur en fibres alimentaires a été déterminée à l'aide de la méthode décrite par Van-Soest (1963) (figure 2.7) [176]. Ainsi, la teneur en fibres, ou *neutral detergent fiber* (NDF), est calculée par l'équation suivante :

$$NDF (\%) = \frac{\text{Poids du résidu (Portion Insoluble)}}{\text{Poids de la matière sèche}} \times 100 \quad \text{Equation (2.4)}$$

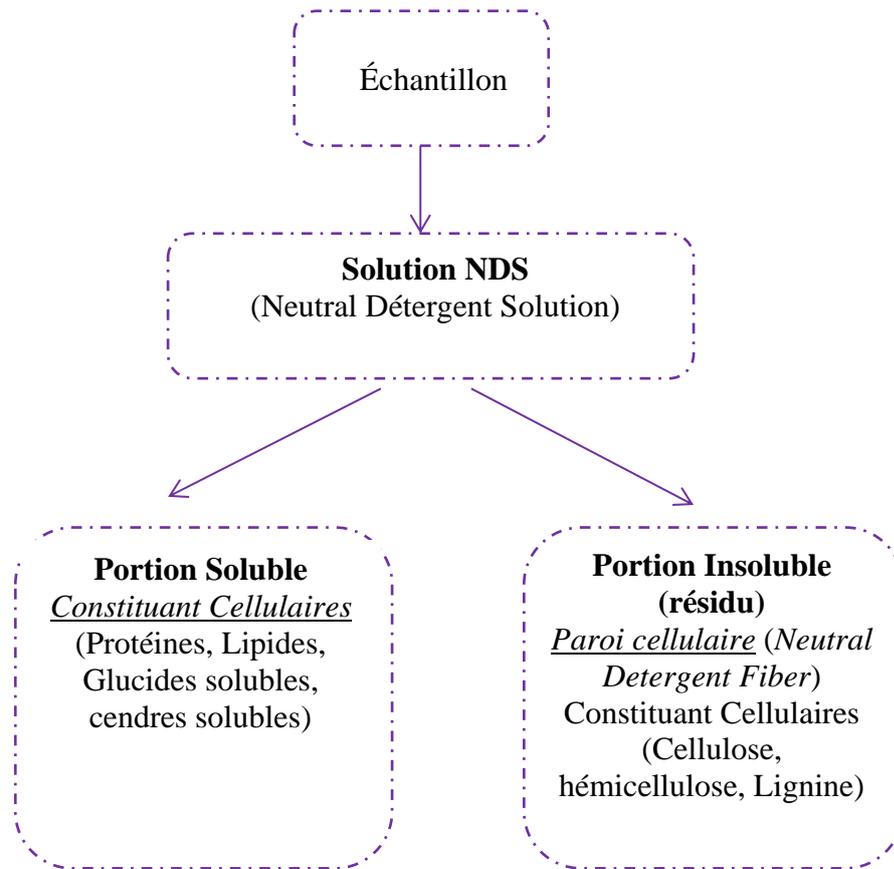


Figure 2.7. Procédure de dosage des fibres [176].

III.2.6. Détermination de la teneur en amidon

La méthode utilisée comprend une double détermination. Dans la première, l'échantillon est traité à chaud par l'acide chlorhydrique dilué. Après défécation et filtration, on mesure par polarimétrie le pouvoir rotatoire de la solution, en se référant à la méthode 1999/79/CEE.

Dans la seconde, l'échantillon est extrait à l'éthanol (40%). Après acidification du filtrat par l'acide chlorhydrique, défécation et filtration, on mesure le pouvoir rotatoire dans les mêmes conditions que lors de la première détermination.

La différence entre les deux déterminations, multipliée par un facteur connu (équation 2.5) donne la teneur en amidon de l'échantillon.

$$A (\%) = \frac{2000 (P-P_0)}{[\alpha]_D^{20}} \quad \text{Equation (2.5)}$$

Où :

P : Pouvoir rotatoire total en degré d'angle.

P' : Pouvoir rotatoire optique en degré d'angle des substances solubles dans l'éthanol.

$[\alpha]_D^{20}$: Pouvoir rotatoire spécifique de l'amidon pur (+184°).

III.2.7. Valeur énergétique

L'énergie métabolisable (EM) peut être facilement calculée, selon la méthode MO.CPH-86, après que les différents dosages précédents, et ce en appliquant l'équation 2.6.

$$EM \text{ (Kcal/100g)} = (P \text{ (\%)} \cdot 4) + (MG \text{ (\%)} \cdot 9) + (G \text{ (\%)} \cdot 4) \quad (\text{Equation 2.6})$$

III.2.8. Détermination du taux de la matière minérale

Les matières minérales sont obtenues par incinération des échantillons à 550 C°, selon AOAC 939.03. Les résultats s'expriment en pourcentage en masse (équation 2.7).

$$MM \text{ (\%)} = \frac{(Pp - Pv)}{Pe} \times 100 \quad (\text{Equation 2.7})$$

Où :

MM (%) : Taux de minéraux, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

Pp : Poids, en grammes, du creuset et de la prise d'essai, après incinération ;

Pv : Masse, en grammes, du creuset vide ;

Pe : Poids, en grammes, de la prise d'essai

III.2.9. Dosage des minéraux et des métaux lourds

III.2.9.1. Dosage des métaux lourds et certains oligoéléments

Le dosage des métaux lourds : Mercure (Hg), Cadmium (Cd), Plomb (Pb), Arsenic (As) ; et le dosage de certains éléments minéraux tels le Sodium (Na) et le Magnésium (Mg) et des oligo-éléments Fer (Fe) et Zinc (Zn), a été effectué par spectroscopie d'absorption atomique à flamme (SAAF) « Shimadzu ».

Pour chaque métal, une gamme d'étalons à différentes concentrations a été préparée à partir d'une solution mère de 1000 ppm.

Après une incinération des échantillons à 550°C, une préparation de solutions a été

effectuée avec de l'acide chlorhydrique concentré et l'acide fluorhydrique [177]. Cette préparation a aussi été réalisé pour le dosage du phosphore et du Calcium.

La lecture des échantillons s'est effectuée dans les mêmes conditions analytiques utilisées pour l'établissement des courbes d'étalonnage. La concentration de l'échantillon est directement lue sur les courbes respectives.

III.2.9.2. Dosage du phosphore total

Pour le dosage du phosphore total, une méthode spectrophotométrique a été utilisée (NA 657/ISO 6491 :1998E). Le principe consiste tout d'abord à la minéralisation d'une prise d'essai par voie sèche et mise en solution dans l'acide chlorhydrique concentré (aliment organique); un traitement de la solution par le réactif vanadomolybdique est suivie d'une lecture de l'absorbance de la solution jaunâtre obtenue à 430nm.

Les résultats sont obtenus par application de l'équation 2.8.

$$Wp = \frac{50 \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot Wpc \cdot V}{m} \quad (\text{Equation 2.8})$$

Où :

f_1 : est le facteur de dilution réciproque pour la portion aliquote

f_2 : est le facteur de correction des unités, en grammes par milligramme ($f_2 = 10^{-3}$ g/mg);

wpc : est la teneur en phosphore, en microgrammes par millilitre, de la portion aliquote diluée de la solution d'essai, lue sur la courbe d'étalonnage

V : est le volume, en millilitres, de chacune des solutions d'étalonnage (V = 10 ml);

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

III.2.9.3. Dosage du Calcium

La méthode de dosage du calcium est une méthode complexiométrique à l'EDTA [178].

En effet, le sel bisodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) forme des complexes avec les métaux bi- et trivalents. Il donne avec l'ion Ca^{2+} un complexe très instable en milieu alcalin. Le titrage se fait en présence d'un indicateur le

murexide qui fait virer la solution du rose en violet à la fin du titrage.

Comme la plupart de ces cations sont ainsi complexés dans la même condition, il est nécessaire de les éliminer du milieu réactionnel par le triéthanolamine. Les résultats sont obtenus par application de l'équation 2.9.

$$CaO (\%) = V_{CaO} (\text{ml}) \times 5.608 \quad (\text{Equation 2.9})$$

Avec :

$$V_{CaO} = V1 - V2$$

V1 : nombre ml pour la solution ;

V2 : Nombre ml pour les réactifs.

III.3. Analyse phytochimique

III.3.1. Dosage des pigments chlorophylliens

Les pigments chlorophylliens, à savoir la chlorophylle a (Chla) et la chlorophylle b (Chlb), ont été déterminés selon la méthode décrite par El- Sheekh et Fathy, (2009). Après une extraction dans l'acétone à 90% ; les surnageants (Figure 2.8) obtenus après centrifugation à 4000 (xg) pendant 10 minutes ; ont été utilisés pour déterminer la concentration en chlorophylle a et b par lecture des absorbances à 649nm et 664 nm) [45 ; 179].



Figure 2.8. : Photographie des surnageants obtenus utilisés pour la détermination de la teneur en pigments (Chla et Chlb) (Photo originale).

Le contenu en (mg/g) de chaque pigment a été calculé avec les équations 2.10 et 2.11 [180].

$$Chl_a \text{ (mg/g)} = (13.75 \cdot A_{664}) - (5.19 \cdot A_{649}) \quad (\text{Equation 2.10})$$

$$Chl_b \text{ (mg/g)} = (27.43 \cdot A_{649}) - (8.12 \cdot A_{664}) \quad (\text{Equation 2.11})$$

III.3.2. Dosage des phycobiliprotéines

Le dosage des différentes phycobiliprotéines de la *Limnospira sp. AlgLouSa11*, à savoir l'Allophycocyanine (APC), la Phycoerythrine (PE) et la C-Phycocyanine (C-PC), a été effectué selon la méthode décrite par Bennett et Bogorad [181]. La densité optique des surnageant est lue à 562nm, 615nm, 620nm et 652nm [129 ; 181].

Le contenu de chaque composante a été mesuré en utilisant différentes équations (2.12-2.14).

$$[A-PC] \text{ (mg/g)} = [A_{652} - (0.208 \cdot A_{615})] / 5.09 \cdot DIL / C \quad (\text{Equation 2.12})$$

$$[PE] \text{ (mg/g)} = [[A_{562} - (2.41 \cdot C - PC) - (0.849 \cdot APC)] / 9.62] \cdot DIL / C \quad (\text{Equation 2.13})$$

$$[C-PC] \text{ (mg/g)} = [A_{620} - (0.474 \cdot A_{652})] / 5.34 \cdot DIL / C \quad (\text{Equation 2.14})$$

La teneur en phycocyanine brute, a été déterminé par mesure de la densité optique des surnageants obtenus après centrifugation des solutions à 4 g de spiruline dans 100 mL d'eau distillée [64]. L'équation, 2.15 a été utilisée pour estimer la teneur en Phycocyanine brute (PC):

$$PC \text{ (\%)} = 1.873 \cdot [A_{615} - (0.474 \cdot A_{652})] \cdot DIL / C \quad (\text{Equation 2.15})$$

Où:

DIL : Facteur de dilution

C : Le % de la poudre de spiruline utilisé, soit 4%.

III.4. Étude statistique

Le logiciel " IBM SPSS Statistics version 25 " (SPSS Version 25, Spss Inc. Chicago, Illinois, USA, 2017) a été utilisé pour les analyses statistiques. Une statistique descriptive a été appliquée pour mesurer la moyenne et l'écart-type de toutes les teneurs en minéraux, métaux lourds et composition générale de la spiruline étudiée.

IV. Optimisation de l'extraction de la phycocyanine

IV.1. Optimisation des conditions d'extraction de la C-phycocyanine de la *Limnospira sp. ALgLouSa11*, par solutions salines.

L'extraction par solutions salines a été testée en association avec d'autres facteurs pour pouvoir déterminer les meilleures conditions d'extraction de la C-PC à partir de la cyanobactérie de Tamanrasset.

Comme facteurs d'entrée nous avons choisi certains facteurs pouvant avoir un effet sur les réponses tels la concentration initiale de spiruline, le temps d'extraction, la température d'extraction. La réponse étudiée est le rendement d'extraction, exprimé en la concentration en C-PC extraite.

La méthode utilisée est celle de l'optimisation par planification par méthodologie de réponse en surface (*Response Surface Methodology*) (RSM) pour pouvoir optimiser l'extraction de la phycocyanine.

IV.1.1. Facteurs de variations sur le rendement d'extraction de la C-phycocyanine

Le choix des facteurs essentiels testés pour avoir une concentration maximale en phycocyanine dans l'extrait à partir de la *Limnospira sp. ALgLouSa11*, ont été choisis sur la base d'une étude bibliographique. La concentration des solutions salines utilisés a été fixée, en choisissant un sel moins couteux et non dangereux (Pas de résidus toxiques) et aussi en se basant sur les travaux ayant utilisés autres sels à différentes concentrations pour l'extraction de la C-PC à partir de cyanobactéries [47].

Au total, quatre facteurs (facteur $k = 4$), (tableau 2.2) ont été choisis pour cette étude. Chaque variable représentant deux niveaux, un maximum (+) et un minimum (-) (tableau 2.2). L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide d'un logiciel de conception statistique *Design-Expert* 11.01. Les niveaux des paramètres évalués sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.2 : Facteurs, avec leurs niveaux, utilisés pour l'optimisation de l'extraction de la C-PC.

Code	Facteur	Min (-)	Max (+)
<i>X1</i>	Concentration initiale en <i>Limnospira sp. AlgLouSa11</i> (%)	0.1	4
<i>X2</i>	Concentration de la solution saline utilisée (g.L ⁻¹)	0.1	60
<i>X3</i>	Intensité des ultrasons (kHz)	37	80
<i>X4</i>	Temps de macération (h)	1	24

X1–*X4* : Codes des différents facteurs sélectionnés ; Min (-): niveau bas des facteurs; Max (+): niveau haut des facteurs.

IV.1.2. Optimisation du rendement d'extraction de la C-PC par méthodologie de réponse en surface (RSM)

Les plans de surface de réponse sont classés selon le type de plans expérimentaux qui sont principalement utilisés à des fins de criblage et optimisation factoriel à la fois [182].

L'optimisation et la maximisation des réponses sont les principaux objectifs de la RSM, en tenant compte des interactions ainsi que de la corrélation entre les facteurs. Pour cela, un design RSM expérimental formulé sur la base d'un plan de composite centré (*Central Composite Design*) à l'aide du logiciel *Design-Expert* 11.01.

Vingt-six (26) essais ont été effectués et chaque variable représentant différents niveaux. Chaque ligne représente un essai et chaque colonne représente une variable indépendante (tableau 2.3).

L'analyse statistique et les représentations graphiques sont réalisées par le même logiciel.

Tableau 2.3 Matrice du plan composite centré de RSM.

Essai	X1	X2	X3	X4'
1	+1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+	-1
4	-1	+1	-1	-1
5	0	0	0	a
6	0	A	0	0
7	+1	+1	+1	-1
8	+1	-1	-1	-1
9	-1	-1	+1	-1
10	0	0	0	0
11	0	a	0	0
12	-1	+1	+1	+1
13	-1	+1	+1	-1
14	-1	-1	+1	+1
15	-1	+1	-1	+1
16	0	0	A	0
17	0	0	0	A
18	-1	-1	-1	+1
19	0	0	a	0
20	+1	+1	-1	-1
21	+1	+1	-1	+1
22	0	0	0	0
23	A	0	0	0
24	a	0	0	0
25	+1	-1	+1	+1
26	-1	-1	-1	-1

+1 : niveau haut du facteur ; -1 : niveau bas du facteur. 0 : point centrale ; $\pm\alpha$ (1,42) ; A : + α ; a : - α .

IV.2. Méthodologie de l'extraction de la C-PC

La méthode d'extraction de la phycocyanine adoptée est l'extraction par solutions salines, à partir de la biomasse sèche de la cyanobactérie, en se référant à la matrice du plan composite centré (Tableau 2.3) et différents essais ont été réalisés.

Les ultrasons ont été appliqués dans un bain à ultrasons Almasonic P « Elma », pendant 15 minutes en mode pulsé (20 s on/off) et à l'obscurité.

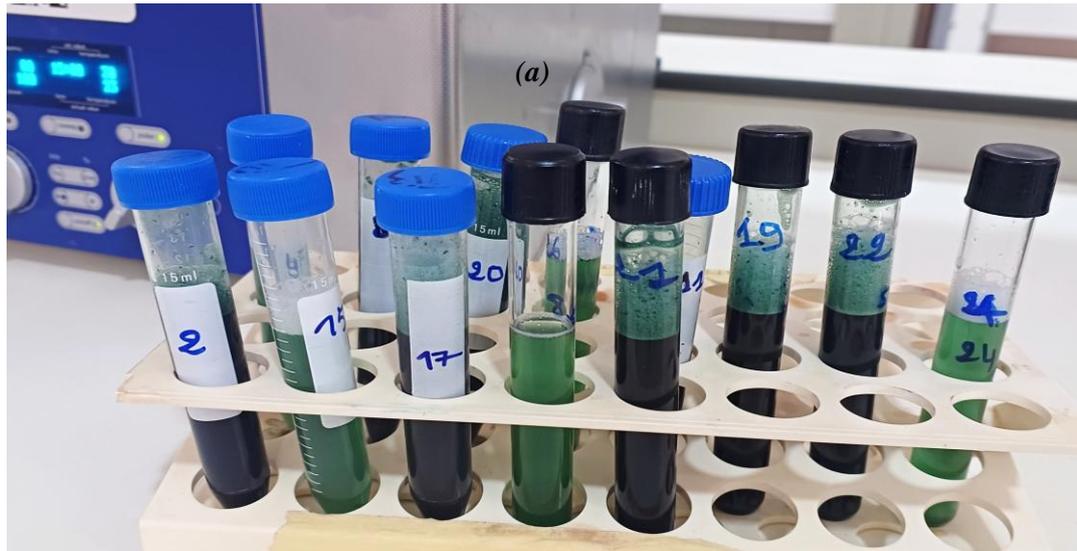


Figure 2.9 : Photographie de quelques essais appliqués pour l'optimisation de l'extraction de la C-PC (Photo originale)

Après le processus d'extraction, sous agitation et à l'obscurité, les échantillons ont été immédiatement centrifugés (12000 rpm, 20 min à 4°C) dans une centrifugeuse 3-30KS « Sigma ». Les surnageants (Figure 2.10) ont été récupérés et analysés pour déterminer concentration de la C-PC.

A noter que toutes ces manipulations ont été effectuées à l'obscurité.



Figure 2.10 : Photographie de quelques surnageants récupérés après l'extraction de la C-PC et séparation de la biomasse (Photo originale)

VI.2.1. Dosage de la concentration en C-PC

La détermination de la concentration en C-phycoyanine extraite à partir de la *Limnospira sp. AlgLouSa11* des différents essais, a été effectuée suivant la méthode décrite par Bennett et Bogorad, 1973 [181]. La méthode est basée sur une lecture des absorbances des surnageants à 615 nm et 652 nm grâce à un spectrophotomètre «UV-Visible UV – 1900 » a été utilisé.

L'équation 2.16 a été utilisée pour le calcul de la concentration en C-PC et l'équation 2.17 pour le rendement [46 ; 181]. Si nécessaire, il est possible de procéder à une dilution 1/100.

$$C - PC \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{(A_{620} - 0.474 (Abs_{652}))}{5.34} \quad (\text{Equation 2.16})$$

Ainsi, le rendement d'extraction est déduit comme suit :

$$\text{Rendement d'extraction}_{C_{PC}} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{C-PC \times Volume}{Biomasse} \quad (\text{Equation 2.17})$$

Où:

Volume = 100ml

Biomasse = X_I (voir Tableau 2.3, page 58)

IV. Etude des propriétés structurantes de la C-phycoyanine.

Afin d'étudier les propriétés structurantes et fonctionnelles de la C-PC, nous l'avons extraite de la *Limnospira sp. AlgLouSa11* avec un mélange glycérol/eau (40/60). Le glycérol est en effet, un ingrédient alimentaire (E422), très sûr et autorisé *quantum satis*. Il est également halal ayant un gout sucré et peu calorique [131].

L'extraction a été réalisée avec 80 grammes de spiruline après une macération de 5 jours à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$), sous agitation et à l'obscurité. Après ce temps, nous avons procédé à une centrifugation (12000 rpm, 20 min à 4°C) dans une centrifugeuse 3-30KS « Sigma »; les surnageants ont été filtré à $0.22 \mu\text{m}$.

Les échantillons subis par la suite une lyophilisation, à 0.6mbar, dans un Alpha 2-4 LSCbasic « Christ », après une surgélation jusqu'à -31°C à l'azote liquide (figure 2.11 (b)).

La lyophilisation des extraits est une méthode particulièrement utile pour conserver des substances sensibles à la chaleur ou à l'oxydation, telle la phycoyanine, car elle permet de préserver leur structure et leur activité biologique.

Cette phycoyanine a servi à l'étude de certaines propriétés fonctionnelles et structurantes, telles les propriétés émulsifiantes et rhéologiques.

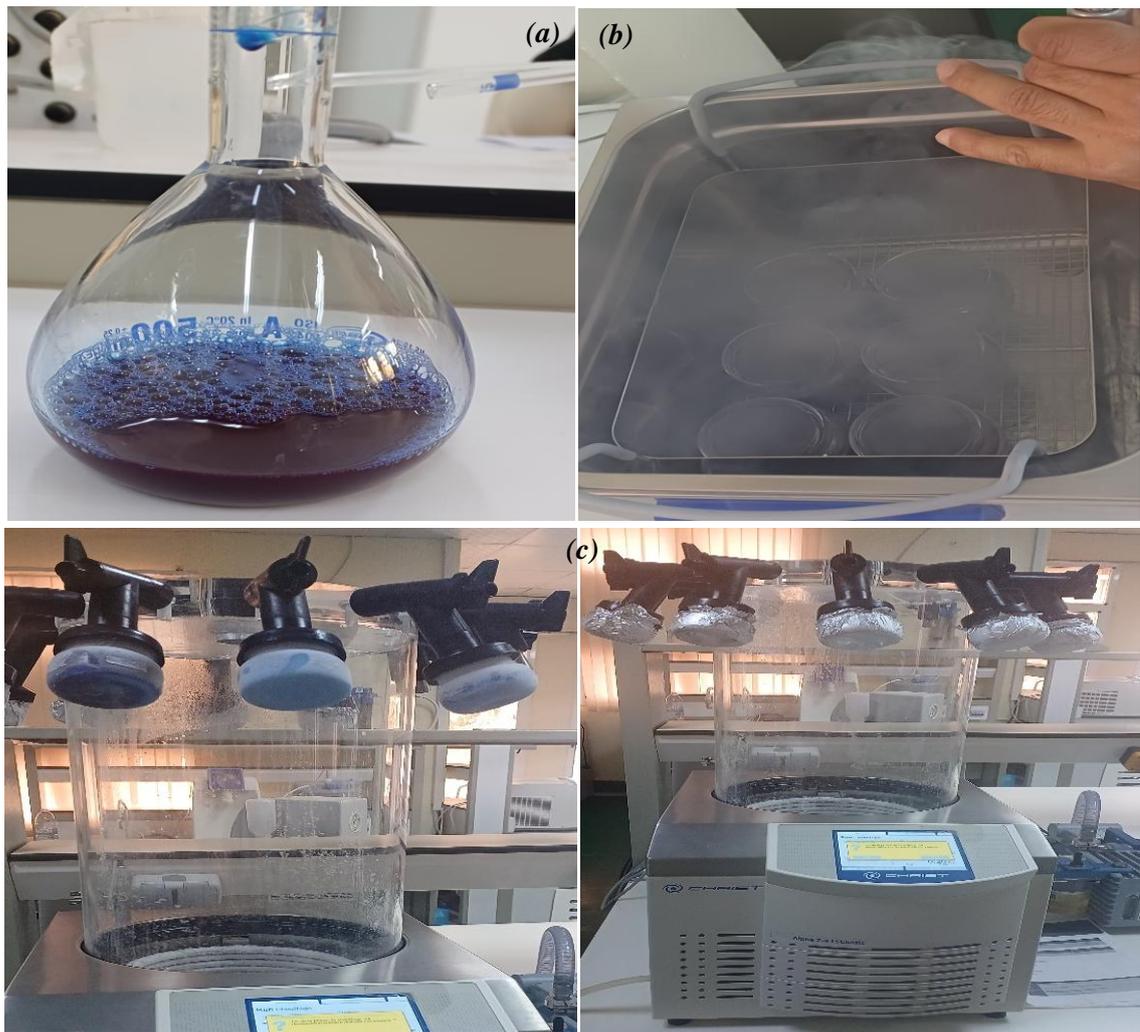


Figure 2.11 : Photographie montrant les étapes de la lyophilisation de la C-PC extraite (Photo originale)

(a) Filtrat de phycocyanine ; (b) Surgélation par azote liquide ; (c) montage dans le lyophilisateur.

IV.1. Propriétés de surface

IV.1.1. Détermination de la surface spécifique

La détermination de la surface spécifique de la phycocyanine a été réalisée suivant la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET). L'appareil utilisé est constitué d'un dispositif de dégazage et de l'analyseur BET (figure 2.12).

Cette méthode permet de déterminer la surface spécifique et la taille des pores de la phycocyanine. Elle est basée sur la mesure de la quantité d'azote gaz adsorbé en fonction de sa pression relative sous une pression atmosphérique normale.

Elle met en jeu l'adsorption physique en multicouches du gaz sur la molécule analysée. Le résultat est donc des isothermes de sorption connues sous la dénomination de courbes d'adsorption et désorption.



Figure 2.12 : Photographie du BET utilisé (Photo originale)

IV.1.2. Mesure de la tension superficielle / interfaciale

Une des propriétés de surface des protéines est la propriété émulsifiante, déduite à partir de la tension superficielle ; afin de mieux comprendre et d'optimiser les formulations émulsifiantes et les processus industriels, cette propriété a été évaluée. La tension interfaciale entre deux fluides non miscibles, à savoir une solution aqueuse de phycocyanine d'une part et l'huile de table et l'air, de l'autre part a été mesurée.

L'appareil utilisé est un tensiomètre *MiniTec*, de «Teclis» instruments (figure 2.13); qui peut déterminer la tension superficielle et interfaciale en analysant le profil d'une goutte ou d'une bulle.

La mesure de la tension superficielle/interfaciale par cette méthode appelée méthode de la goutte pendante est basée sur l'analyse du profil d'une goutte laplacienne. Cela signifie que le contour de la goutte suit une forme spéciale.

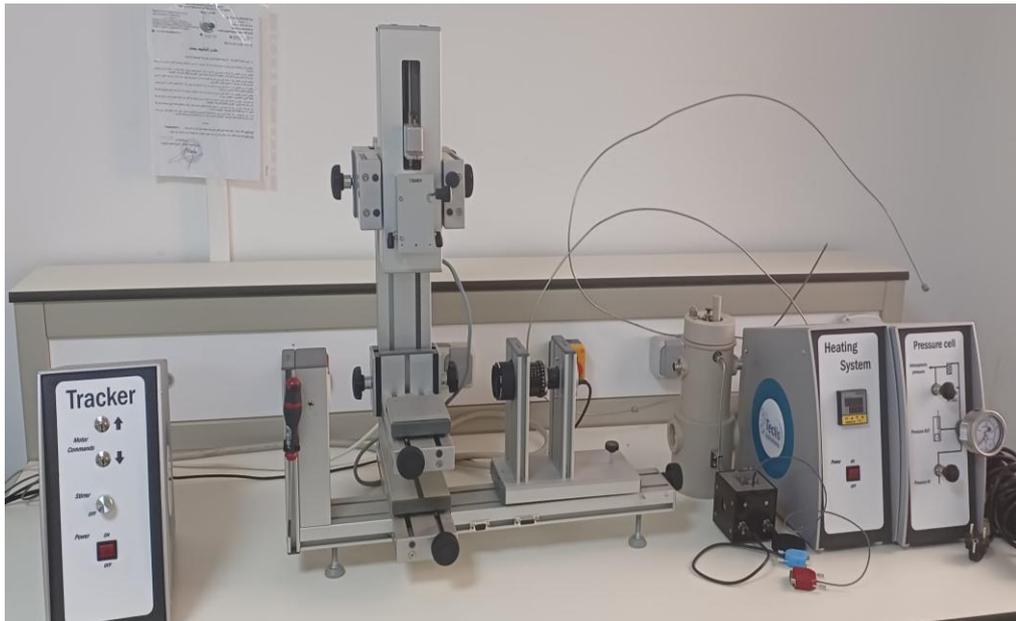


Figure 2.13 : Photographie du tensiomètre utilisé (Photo originale)

IV.2. Mesure de la viscosité

La viscosité d'une solution aqueuse de phycocyanine, de concentration connue a été mesurer, à l'aide d'un viscosimètre de type *RhéolabQC* de « Anton Paar » (figure 2.14). La température de l'analyse était fixée à quatre niveaux.



Figure 2.14 : Photographie du viscosimètre utilisé (Photo originale)

Les résultats ont été obtenus par lecture directe sur l'afficheur du viscosimètre.

IV.3. Propriétés de structures et texture :

Les différentes propriétés de structure et de texture, ou propriétés rhéologique, de la phycocyanine, ont été évaluées à l'aide d'un rhéomètre «Anton Paar»

Le rhéomètre permet de faire la caractérisation du comportement rhéologique à l'état fondu de polymères tels la phycocyanine (figure 2.15).

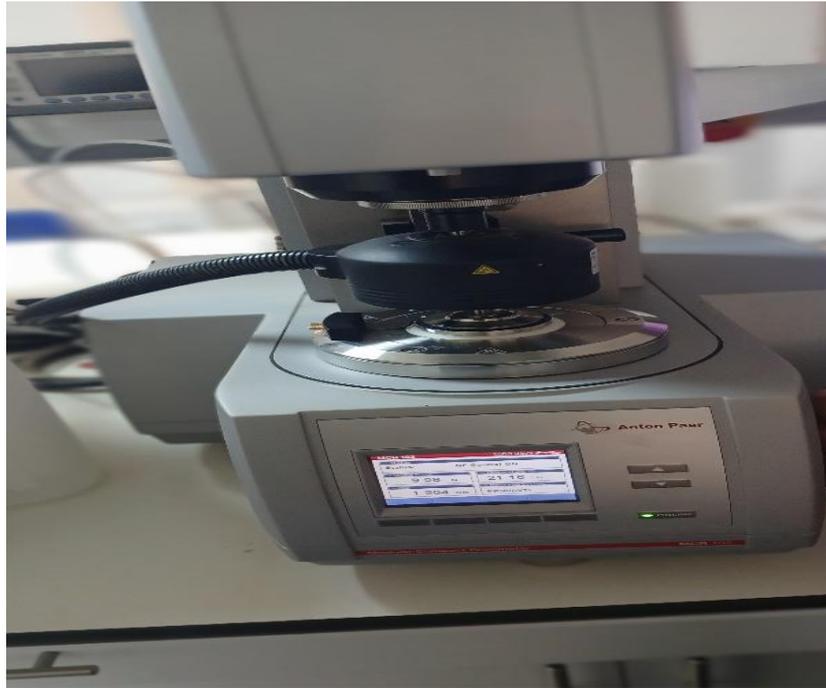


Figure 2.15 : Photographie montrant l'analyse des propriétés rhéologique de la phycocyanine (Photo originale)

Chapitre 3



Résultats et Discussion

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Caractérisation génomique de la cyanobactérie de Tamanrasset et des bactéries associées à sa culture

I.1. Position taxonomique de la cyanobactérie de Tamanrasset, *Limnospira* sp. *AlgLouSa11*

L'ébauche de génome d'*AlgLouSa11* a été comparée à 21 génomes des genres *Arthrospira* et *Limnospira* par l'intermédiaire de l'identité nucléotidique moyenne (ANI) [153] et de PaSit4 [183] (Figure 3.1).

Cette dernière est une nouvelle méthode basée sur les fréquences des oligonucléotides courts [183]. L'ANI et PaSit4 ont tous deux attribué la souche au genre *Limnospira*, *Limnospira fusiformis* KN01 étant la plus proche (99,3 %).

Corroborant les résultats de Misztak [184], les comparaisons ANI ont divisé les génomes en deux groupes principaux. Pour PaSit4, davantage de groupes ont pu être observés en utilisant le seuil le plus strict (0,22).

Ces résultats positionnent l'isolat dans le genre *Limnospira*, ce qui est également soutenu par l'analyse phylogénomique basée sur 400 marqueurs universels [170] (Figure 3.2).

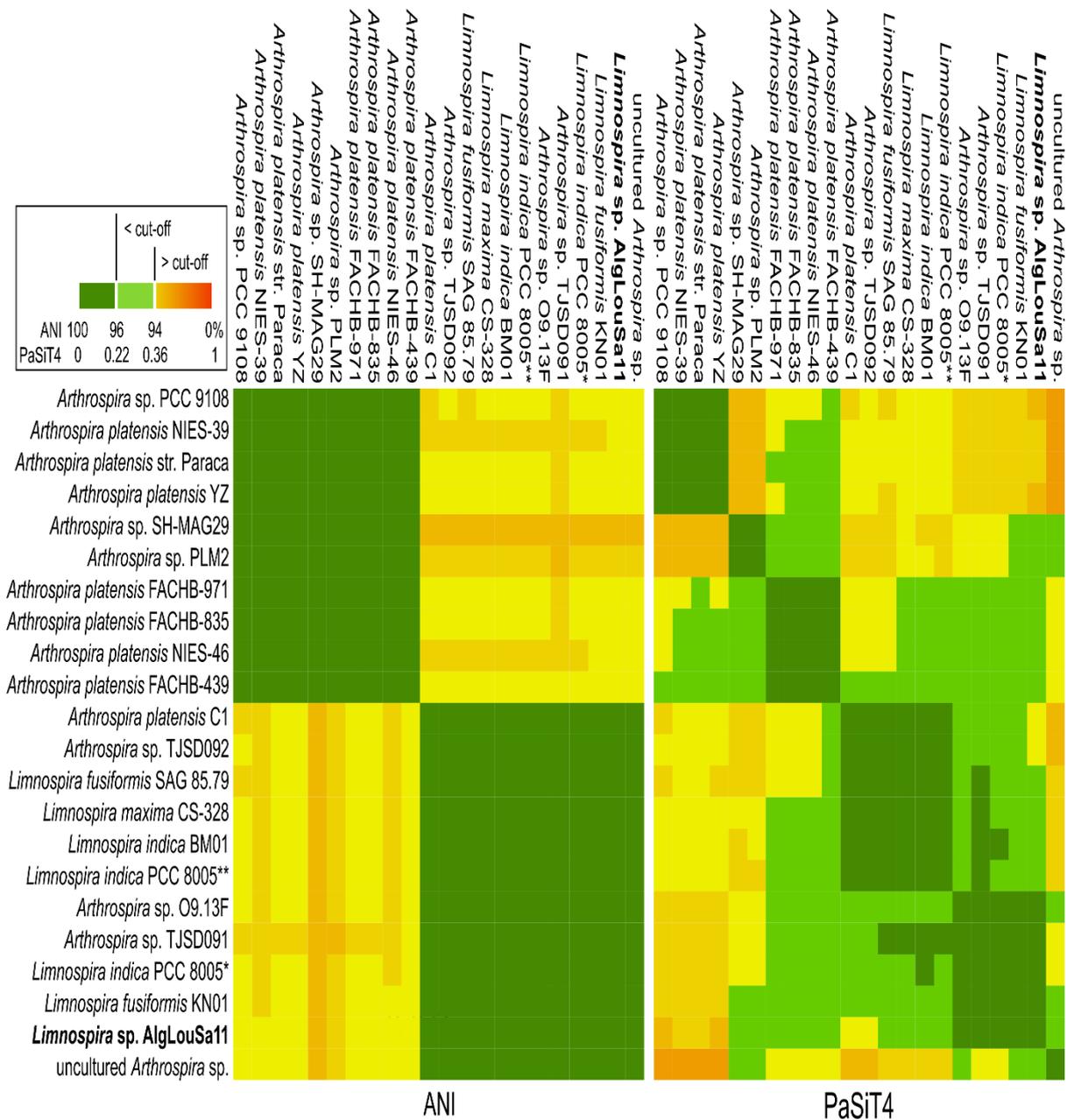


Figure 3.1 : Cohérence génomique de 22 génomes d'*Arthrospira/Limnospira* mesurée par l'identité nucléotidique moyenne (FastANI ; panneau de gauche) et la fréquence des oligonucléotides courts (PaSiT4 ; panneau de droite). * GCF_000176895.2 ** GCF_000973065.1. [163]

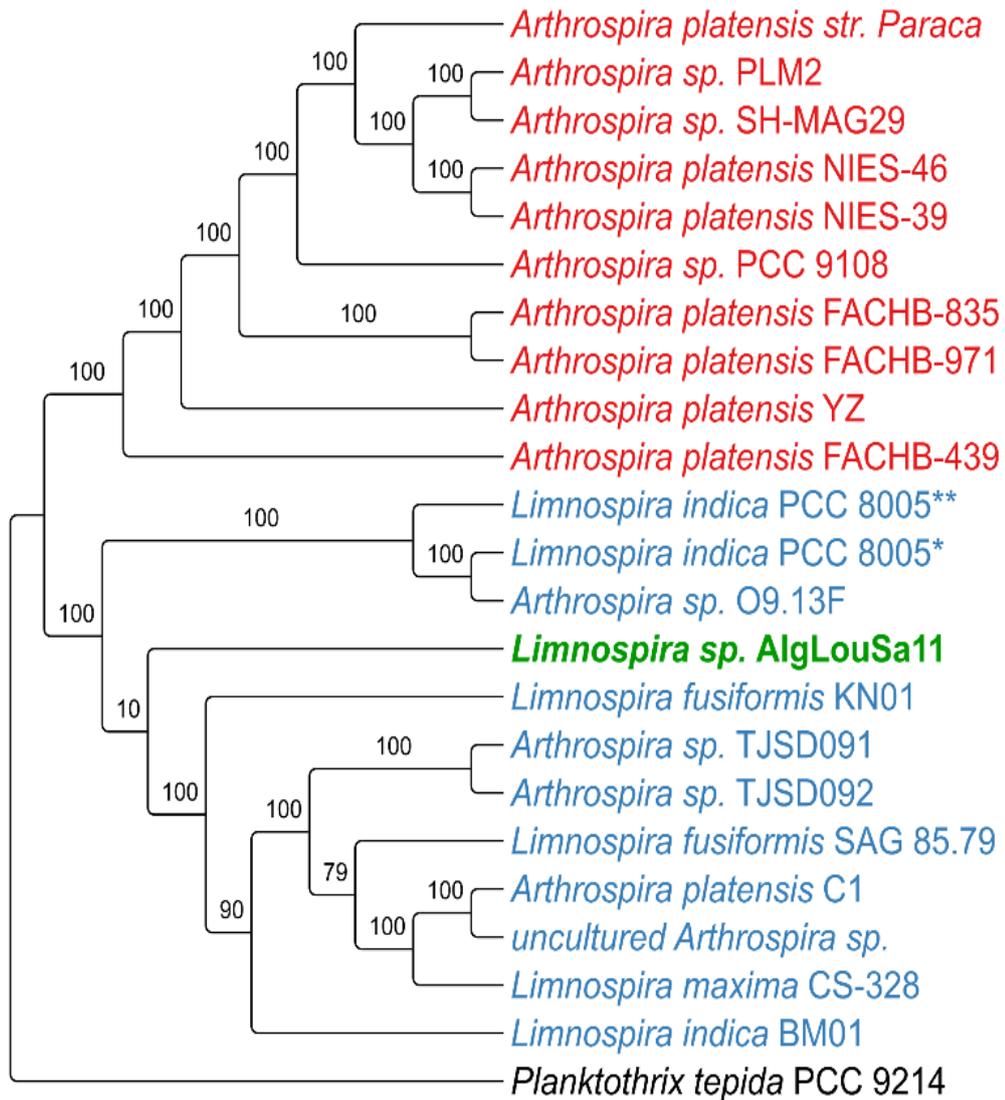


Figure 3.2 : Arbre phylogénomique montrant les relations entre la souche *AlgLouSa11* et les souches des genres *Arthrospira* et *Limnospira*.

La phylogénie a été construite avec PhyloPhlAn v3.0 en utilisant le pipeline supermatrix et *Planktothrix tepida* PCC 9214 comme outgroup. Les étiquettes des branches correspondent aux valeurs de soutien bootstrap (n=100). Les deux groupes observés avec l'ANI sont colorés en rouge et en bleu. * GCF_000176895.2 ** GCF_000973065.1. [163].

I.2. Caractéristiques générales du génome de *Limnospira sp. AlgLouSa11*

L'ébauche du génome de *Limnospira sp. AlgLouSa11* se compose de 364 contigs d'une longueur totale de 5 341 162 pb et d'un contenu en GC de 44,57 % (Figure 3.3).

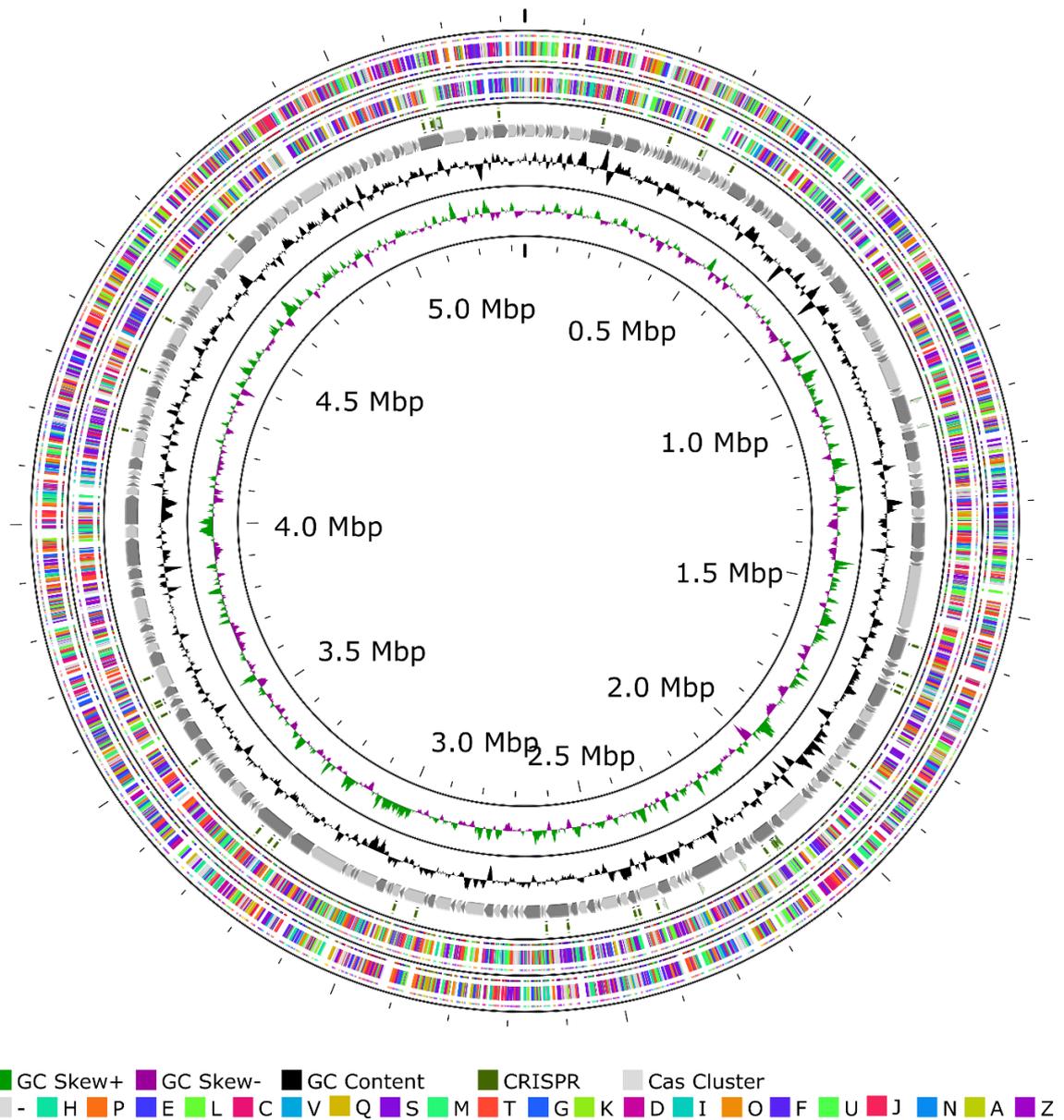


Figure 3.3 : Représentation circulaire du génome de *Limnospira sp. AlgLouSa11*. [163]

La distribution des séquences codantes (CDS) des gènes de *Limnospira sp. AlgLouSa11* dans les COG (Figure 3.4) a montré que la majorité des CDS des gènes ont des fonctions inconnues (1024).

Les autres sont impliqués dans différentes fonctions, à savoir les mécanismes de défense (80), la réplication, la recombinaison et la réparation (303), la biosynthèse, le transport et le catabolisme des métabolites secondaires (100), le transport et le métabolisme des acides aminés (172), le transport et le métabolisme des lipides (70), le transport et le métabolisme des ions inorganiques (166).

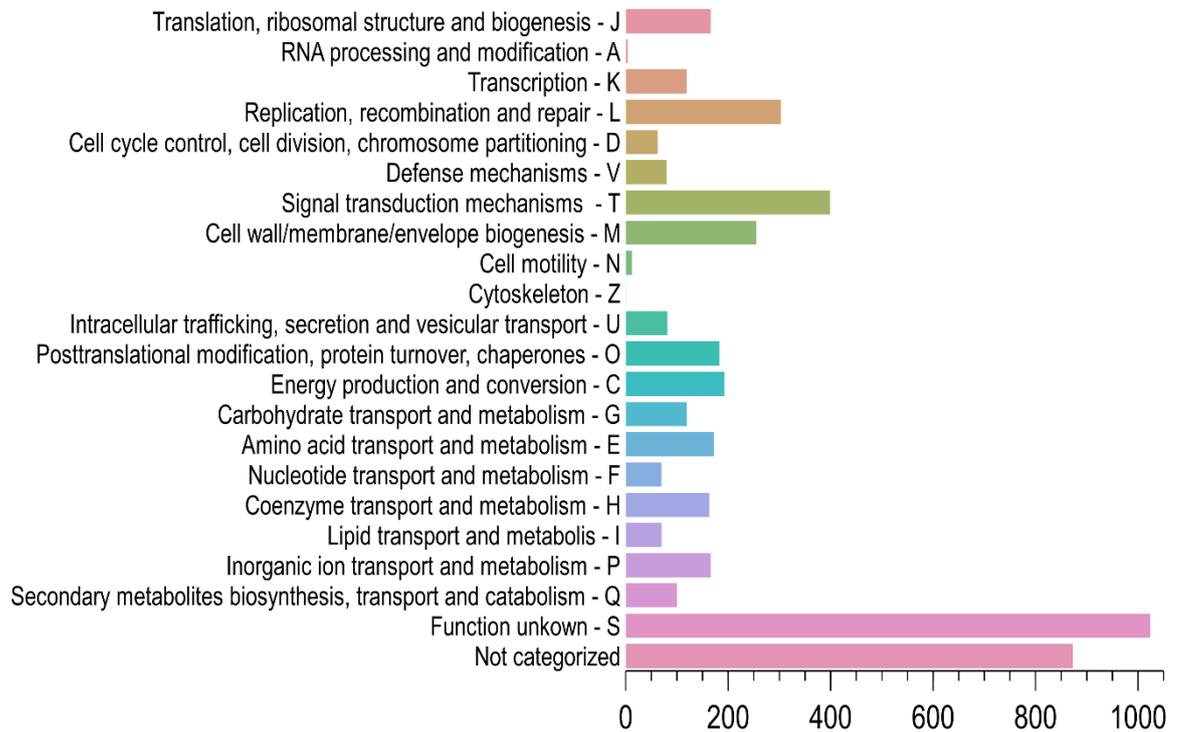


Figure 3.4 : Classification EggNOG de toutes les séquences codantes du génome de *Limnospira sp. AlgLouSa11* [163]

De multiples opérons Cas ont été identifiés, avec deux régions CRISPR-Cas (Figure 3.5). Ce nombre est comparable à celui des autres génomes utilisés dans cette étude. L'analyse BLAST des espaceurs n'a donné aucun résultat ou a permis d'identifier d'autres génomes *d'Arthrospira/Limnospira*.

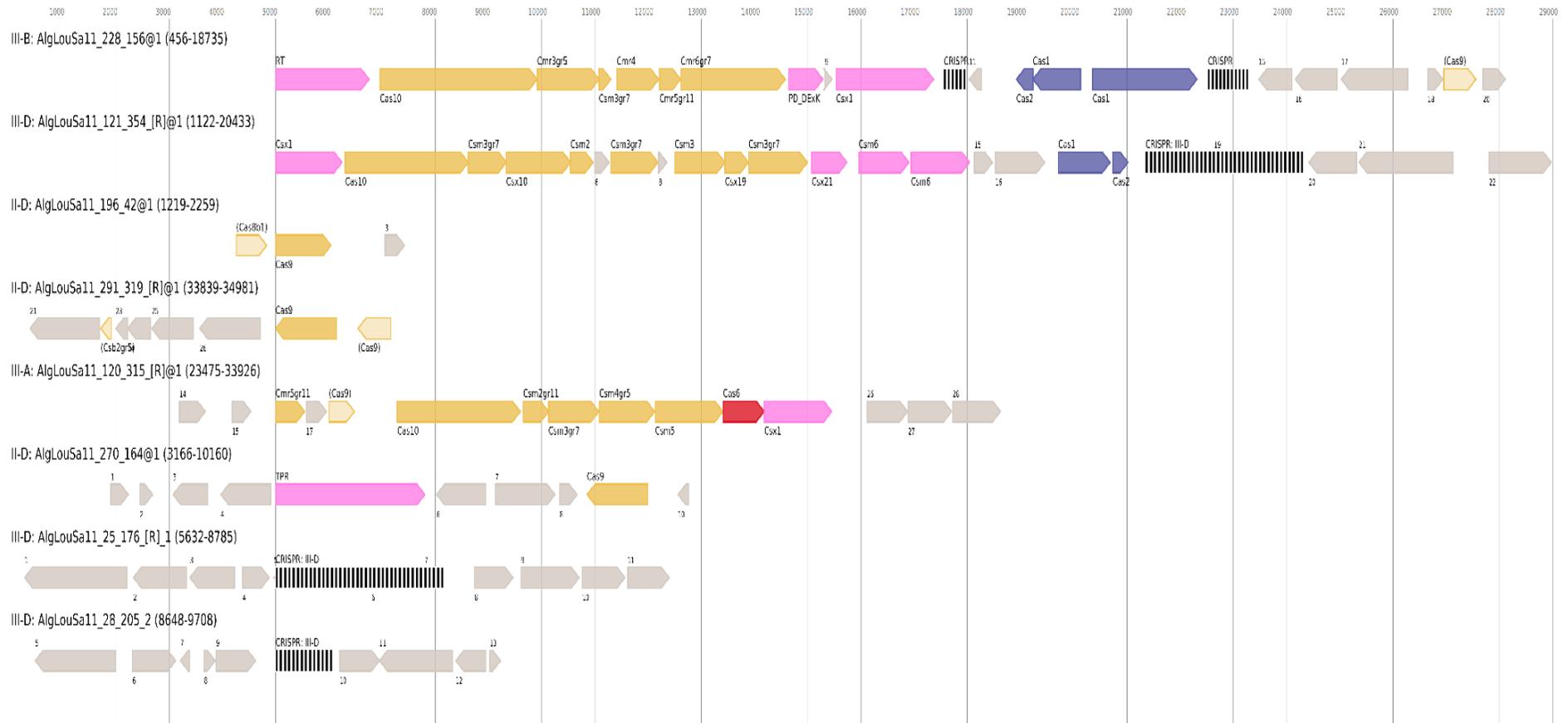


Figure 3.5. : Représentation graphique des loci CRISPR-Cas, des opérons Cas orphelins et des réseaux CRISPR orphelins.

Module d'interférence en jaune. Module d'adaptation en bleu. Gènes accessoires en violet. Cas6 en rouge. Les réseaux avec leur sous-type associé en damier noir/blanc.

Gènes inconnus en gris. Les gènes Cas dont les alignements sont de faible qualité sont en couleur plus claire et leur nom est entouré de parenthèses. Pour la topologie circulaire, la ligne verticale noire indique le début/la fin de la séquence. Les nombres autour des réseaux sont des (faux) ORFs se chevauchant avec les réseaux CRISPR prédits. Le graphique a été créé avec CRISPRCasTyper 1.8.0.

I.3. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires produits par les cyanobactéries englobent une large gamme de molécules structurellement diverses qui possèdent des propriétés bioactives et présentent un grand intérêt pharmaceutique [185 ; 186].

Limnospira sp. AlgLouSa11 héberge dans son génome environ 100 gènes responsables de la biosynthèse, du transport et du catabolisme des métabolites secondaires. Notamment, ces gènes incluent ceux impliqués dans la synthèse de la cyanobactine, des terpènes et des lanthipeptides de classe V (Tableau 3.1).

Tableau 3.1. Gènes impliqués dans les métabolites secondaires transportés par *Limnospira sp. AlgLouSa11*.

Contig	Contig length	From	To	Type
125	49,605	1	16,457	Cyanobactin
168	43,472	1	10,961	Terpene
338	16,901	1	16,901	Cyanobactin
361	19,948	1	19,948	Lanthipeptide class V

Limnospira sp. AlgLouSa11 porte des gènes CDS codant pour des protéines impliquées dans la synthèse d'enzymes appartenant à la grande famille des terpènes synthases (TPS) [187].

Les enzymes TPS jouent un rôle crucial dans la biosynthèse des terpénoïdes. Les terpènes sont des composés organiques volatils synthétisés et libérés par les microalgues et les cyanobactéries [188]. Ils ont un potentiel nutritionnel important et sont impliqués dans une variété de processus biologiques. Les microalgues utilisent les terpènes comme pigments, tandis qu'ils servent également de constituants de la chlorophylle, des caroténoïdes et de la vitamine A [189 ; 190]. En outre, les terpènes produits par les cyanobactéries exerceraient des effets allélopathiques sur le phytoplancton, influençant la croissance et le développement d'autres organismes dans leur environnement [191]. Par exemple, un extrait de *Limnospira (Arthrospira platensis)* contenant des terpènes a des propriétés antifongiques et antioxydantes [192].

La compréhension des voies génétiques et biochimiques impliquées dans la synthèse des terpènes améliore notre connaissance de ces composés et de leurs applications

potentielles dans divers domaines. En effet, plusieurs études ont démontré une relation entre la lumière et la synthèse des terpènes [193]. De plus, la viscosité du milieu de culture de *Limnospira* (*A. platensis*) peut être modifiée par les terpènes [194].

Plus de 100 cyanobactines naturelles sont connues et d'autres cyanobactines sont apparues grâce à des méthodes génétiques [195]. Elles sont présentes dans les cyanobactéries terrestres d'eau douce [196] et dans les aliments [195]. Une étude comparative entre ces cyanobactines et celles de la *Limnospira sp. AlgLouSa11* peut être menée pour voir s'il s'agit d'une éventuelle nouvelle cyanobactine.

En outre, des CDSs cryptiques de cyanobactine ont été trouvés dans les génomes d'*A. platensis NIES-39* et de la souche Paraca, et sont communs dans les genres *Oscillatoria*, *Arthrospira* et *Microcystis* [195].

Ces molécules bioactives aux activités biologiques diverses ont des propriétés médicinales [186 ; 197]. Les cyanobactines sont un groupe de composés qui englobent des peptides cycliques [198 ; 199] et linéaires [200]. Ces peptides subissent des modifications post-traductionnelles facilitées par diverses enzymes biosynthétiques, ce qui conduit à une gamme variée de composés structurellement et chimiquement distincts [201 ; 202]. Le processus responsable de la formation des cyanobactines est connu sous le nom d'hétérocyclisation, qui est catalysée par des hétérocyclases de type PatD. Cette réaction enzymatique repose sur le magnésium comme cofacteur, qui est généralement présent dans le milieu de culture de *Limnospira* [203].

En outre, il a été constaté que le zinc jouait un rôle structural dans certaines hétérocyclases à cyanobactine [204 ; 205]. Ainsi, la présence d'une séquence de reconnaissance peptidique spécifique est cruciale pour le bon fonctionnement de ces enzymes [206].

L'identification de nouveaux groupes de gènes permettra de découvrir de nouvelles activités enzymatiques et facilitera potentiellement la production *in vitro* de cyanobactines [203].

Globalement, l'interaction des réactions enzymatiques, des cofacteurs et des facteurs génétiques joue un rôle crucial dans la biosynthèse des cyanobactines. La compréhension des mécanismes et des composants génétiques impliqués dans cette synthèse

peut conduire à une meilleure compréhension de leur production, de leurs applications potentielles et à l'exploration de nouvelles activités enzymatiques en biotechnologie.

L'exploration fonctionnelle du génome de *Limnospira sp. AlgLouSa11* a également identifié la présence de gènes codant pour un lanthipeptide de classe V, qui présente un potentiel antimicrobien élevé [207 ; 208], ont également été identifiés dans *Limnospira sp. AlgLouSa11*.

Les lanthipeptides, ou lantibiotiques, sont des peptides synthétisés par le ribosome qui subissent des modifications post-traductionnelles, ce qui donne un large éventail d'échafaudages structurellement diversifiés et, par conséquent, de molécules différentes [209 ; 210]. Les lanthipeptides sont caractérisés par la présence d'anneaux, lanthionine (Lan) ou méthyllanthionine (MeLan), formés par la biréticularisation d'acides aminés β -thioéther dérivés de résidus de sérine ou de thréonine [211].

I.4. Identification génétique des bactéries associées à la culture de la *Limnospira* de Tamanrasset

Lors de l'identification génétique de la spiruline et l'extraction de l'ADN, nous avons rencontré différents problèmes ainsi qu'une contamination des extraits ce qui nous donnait à chaque fois des résultats de séquençage médiocres. De là, nous avons opté pour une recherche et un isolement des bactéries associées à la culture de la spiruline puis à leur identification génétique.

En fonction de leurs morphologies; couleur et taille, quatre (4) colonies ont été isolées : 3 du milieu ZLB (colonie rouge, orange et blanches 1) et 1 du milieu LB (Colonie blanche 2, diamètre ~ 5mm) (Appendice D).

La population bactérienne contaminante de la culture de *Limnospira sp. AlgLouSa11* Était présente à différents taux (Figure 3.6).

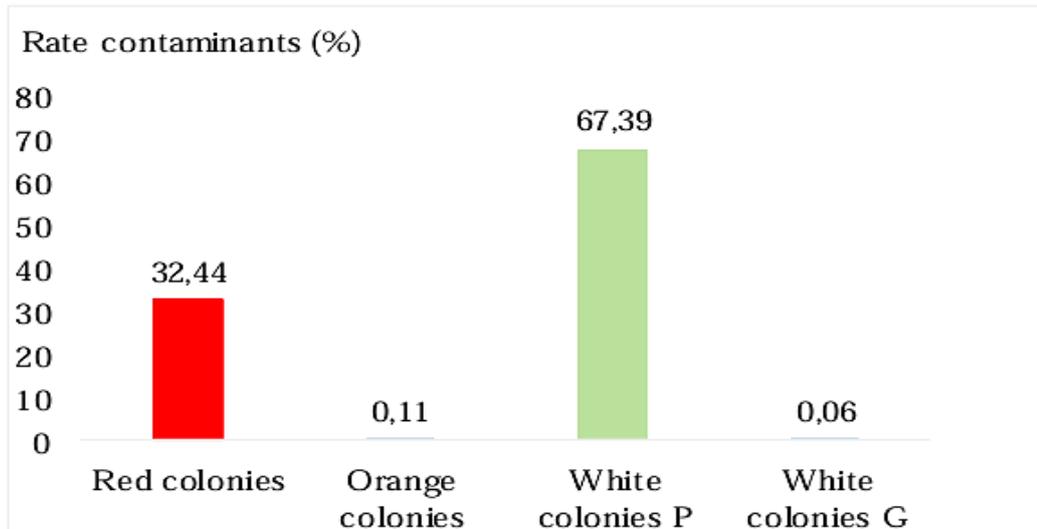


Figure 3.6 : Photographies montrant les proportions des contaminants de la culture de la *Limnospira sp AlgLouSa11*.

Les arbres phylogénétiques ont montré un fort soutien statistique pour les fasta bin 001 et bin 003 qui relient les branches avec *Oceanipulchritudo coccooides* CK1056 et *Saliniramus fredriksonii* HL-109 T, respectivement, avec une valeur de bootstrap de 100 % (Figure 3.7 (a) et (b)). La souche bin-002 était la plus étroitement apparentée à *Coraliomargarita sinensis* WN38 et *Coraliomargarita akajimensis* DSM 45221, avec une valeur de similarité de 100 % (Figure 3.7 (b)). La souche 005 était la plus étroitement apparentée à *Marinicauda pacifica* P-1 km-3 et *Marinicauda pacifica*CGMCC1.11031 avec une valeur de similarité de 100 % (Figure 3.7 d).

La présente partie vise une étude descriptive des différents contaminants de culture, ou bactéries associées à la culture, de la *Limnospira sp. AlgLouSa11*. Elle présente un grand intérêt pour le choix de méthode de purification de la souche de *Limnospira* algérienne. En effet, lors de notre étude, malgré des isolements répétitifs, nous n'avons pas pu aboutir à la purification de la souche, ce qui a nécessité un choix de méthodes plus poussées en fonction de la nature des contaminants présents.

Les bactéries associées à la culture de la *L. sp. AlgLousa11*, se trouvent principalement dans des environnements marins, *Oceanipulchritudo coccooides* est une bactérie coccicoïde qui a été isolée de sédiments marins et décrite pour la première fois en

2020 par Feng et son équipe [212]. *Saliniramus fredriksonii* HL-109 T, qui a été isolée la première fois à partir de la matrice photosynthétique d'un lac ; est une espèce de bactérie halophile, hétérotrophe, et elle obtient sa nourriture en consommant d'autres organismes ou substances organiques [213].

Coralimargarita akajimensis DSM 45221 a été isolée à partir de l'eau de mer entourant le corail dur au Japon, Cette bactérie a une croissance optimale à une température de 25°C et un pH de 8 ; Elle est également halophile, prospérant dans des environnements avec une concentration de NaCl de 2,5 % [214]. *Coralimargarita sinensis* WN38 à son tour est une bactérie Gram-négative, aérobie obligatoire, a une croissance optimale à une température de 33°C et un pH de 7-7,5 et une concentration en NaCl de 3 à 4%, c'est une bactérie halophile [215].

Marinicauda pacifica P-1 km-3 est une souche bactérienne Gram-négative, aérobie, isolée à partir de l'eau de mer, Cette bactérie a une croissance optimale à 30°C, pH 7, halophile et tolère une concentration de NaCl de 2 % [216].

Donc, toutes ces bactéries isolées originaires de sédiments et d'eau de mer, sont halophiles hétérotrophes, Ceci signifie qu'elles prospèrent dans des environnements riches en sel tel le milieu de culture de la *Limnospira* sp. AlgLouSa11. Son origine d'une *guelta* de Tamanrasset où des roches salines existent peut en partie expliquer cette variété de bactéries associées à sa culture de même que la contamination pourrait provenir de l'eau.

Une culture axénique, exempte de bactéries et de contaminants, est en effet nécessaire pour les études génétiques et taxonomiques. Ces cultures sont généralement initiées par l'isolement des cyanobactéries à partir d'une seule cellule [217] suivie de différents traitements dont la centrifugation, le rinçage, irradiation UV, filtration ou traitement aux antibiotiques [218-220] et autres produits chimiques germicides [221 ; 222].

Choi et al., (2008), ont trouvé que la diversité des bactéries isolées des cultures d'*Arthrospira platensis* était relativement simple. Parmi les bactéries contaminantes qu'ils ont trouvés: *Leucobacter* sp., *Aeromicrobium* sp. et *Staphylococcus* spp. et *Halomonas* spp. Cette équipe a proposé un traitement par lavage et traitement antibiotique [223].

La contamination par différentes espèces d'algues peut constituer un problème très grave pour les cultures de microalgues cultivées dans des étangs ouverts en plein air.

Vonshak et ses collaborateurs ont déjà décrit un ensemble de conditions qui permettent d'éviter la contamination par des espèces d'algues différentes [224].

Hicks et son équipe [68], ont constaté que le pH relativement élevé qui caractérise les cultures de *Limnospira* entraîne une lyse des espèces contaminantes (*Microcystis spp.*). Ainsi, une culture axénique de *A. fusiformis* a été établie dans des conditions alcalines avec des antibiotiques. *A. fusiformis*, ou *L. fusiformis* tolère des conditions alcalines élevées et des antibiotiques spécifiques ; contrairement à certaines espèces comme *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria spp.* et *Nostoc spp.*, qui contaminent souvent les suppléments de « spiruline » [225-229].

Outre ces bactéries, Vonshak et ses collaborateurs ont remarqué que les amibes brouaient la *Chlorella*, et des amibes broueuses de *Arthrospira* ont également été observées dans certains bassins commerciaux mal entretenus. L'ajout d'ammoniaque, comme principale source d'azote, a arrêté le développement de ces broueurs [224].

En conclusion, il est possible de contrôler la contamination des cultures des *Limnospira* en plein air par d'autres organismes. L'expérience nous a montré qu'en règle générale, les organismes contaminants ne posent pas de problème sérieux tant qu'une bonne croissance est maintenue dans une culture monoalgue. Il convient de noter qu'aucun cyanophage s'attaquant à la spiruline n'a été observé jusqu'à présent comme indiqué dans les travaux de Vonshak (1997) [224].

En 2021, Hicks et son équipe, ont fourni un génome de référence précis et une méthode d'axénicité rapide pour *Limnospira fusiformis* et ont proposé l'optimisation des méthodes de génie génétique comme prochaine étape pour faire progresser la recherche sur *L. fusiformis* [68].

II. Caractérisation de la cyanobactérie *Limnospira sp. AlgLouSa11*

II.1. Observation microscopique

A l'état frais, les cellules de la souche *Limnospira sp. AlgLouSa11* observées au microscope ont montré une structure multicellulaire et filamenteuse avec des trichomes cylindriques bleu-vert (Figure 3.7), formant une hélice ouverte qui est la caractéristique du genre *Arthrospira* [61]. D'après Tomaselli, (1997), le degré de spiralisation montre une grande variation et les cellules de *Spirulina* apparaissent parfois comme des trichomes droits dans la culture [230]. En outre, d'autres chercheurs, ont montré que les spirulines présentaient une morphologie variable sous l'effet des changements des conditions environnementales ou de culture [9]. Les droites sont génétiquement de vraies spirulines mais possèdent l'inconvénient d'être difficiles à récolter [64].



Figure 3.7 : Photographie de la *Limnospira sp. AlgLouSa11* observée au microscope photonique (x40)

II.2. Composition biochimique

II.2.1. Résultats et discussions de la composition biochimique générale

Les résultats relatifs à la caractérisation biochimique de la cyanobactérie *Limnospira sp. AlgLouSa11* séchée et cultivée sur milieu Hiri, sont regroupés dans le tableau 3.2.

Pour ce qui est du taux de l'extrait sec de la poudre de spiruline, il est de l'ordre de $94,26 \pm 1,02\%$, ce qui induit un taux d'humidité inférieur à 6% ($5.73 \pm 1.02\%$). Ce taux semble être similaire à celui rapporté par Espirard, [231], qui préconise pour les poudres un

taux d'humidité allant de 4 à 6% qui est une condition recommandée pour le stockage à long terme des poudres issues de cette microalgue [232].

Tableau 3.2. Composition biochimique de la *Limnospira sp. ALgLouSa11*

Constituant	Proportion (g/100g) ± ET
Humidité	5.73 ± 1.02
Protéines	44,37± 0,78
Glucides	33.43 ± 1.77
Fibres	7.54 ± 0.43
Amidon	11.59 ± 0.31
Lipides	0.26 ± 0.05
Cendres	8,66 ± 0.09
Valeur énergétique	328.62 ± 4.29 (Kcal/100g)

Ces dernières années, les biomasses riches en protéines telles les microalgues ont suscité un regain d'intérêt en tant qu'alternative plus durable aux protéines végétales et animales [233]. *Arthrospira* est une source exceptionnelle de protéines complètes, fournissant de 46 % à 63% de son poids sec en protéines pour *L. platensis* ; et de 60 à 71% chez *L. maxima* [234]. Ces protéines sont riches en acides aminés essentiels, en particulier la méthionine, la leucine, et l'arginine et autres [235 ; 236].

Les résultats que nous avons obtenus, montrent que la souche *AlgLouSa11* cultivée sur milieu Hiri, et séchée, représente une teneur en protéine, de 44.37% ± 0,78, proche de celles notées par certains auteurs, allant de 55 à 70% de la biomasse sèche [237].

Notons par la même occasion que cette teneur dépasse toutes les sources de protéines alimentaires connues à vocation protéinique [238]. Rappartis, une variation du contenu en protéines peut être observée selon le moment de la récolte par rapport à la photopériode, les valeurs les plus fortes étant obtenues au début de la période lumineuse [61].

En termes de glucides, ou hydrates de carbone, la cyanobactérie de Tamanrasset, présente un taux en sucres totaux de 33,43% ± 1,77 avec une teneur en fibres de l'ordre de 7,54% ± 0,43 et 11,59% ± 0,31 d'amidon. Cette teneur en glucides semble être supérieurs aux résultats de Aouir, qui a travaillé sur différente souche dont celle de Tamanrasset, est de l'ordre de 13.64 à 15% [48], et proche des résultats rapportés par Quillet qui oscillent entre 15 et 25% [239]. Sinetova et al., (2024), mentionne que *Limnospira* peut contenir 15 à 20% de carbohydrates de carbone [240].

Les glucides constituent globalement 15 à 25% de la matière sèche des spirulines [5] [77]. Les sucres simples et les polyols ne sont présents qu'en très petites quantités.

Les glucides digestibles sont représentés par du rhamnosane et du glucosane aminés, respectivement environ 2% et 10%. On note aussi la présence de glycogène (0,5%) [241].

Limnospira sp ALgLouSa11 contient $7.54\% \pm 0.43$ de fibres, un taux qui représente presque le double des taux de fibres rapportés par Koru et Aouir, de l'ordre de 3% [22 ; 45]. L'amidon est une petite composante dans le pool de glucides totaux de la spiruline.

Pour les cendres, notre spiruline contient $8,66\% \pm 0,09$ de cendres. Ce résultat est conforme à celui trouvé par Aouir, (2017), de l'ordre de 9.3% [48], le contenu en cendres est en général compris entre 7 et 10 % [61 ; 242]. La valeur énergétique atteint $328,62 \pm 4,29$ (Kcal/100g).

Nous constatons que la composition de la spiruline diffère beaucoup d'une souche à l'autre, d'un milieu de culture à l'autre, mais aussi de la période de récolte et autres conditions de culture. D'un point de vue nutritionnel, les faibles salinités (5 et 10 g/L) ont entraîné une meilleure composition biochimique d'*A. platensis* [243].

Notre souche contient $0.26\% \pm 0.05$ de lipides. Les lipides représentent généralement 5,6 à 8% de *Arthrospira* [73 ; 244]; du poids sec de la Spiruline mais ce pourcentage peut atteindre 13% [62 ; 90].

La composition des principaux acides gras de 3 espèces de spiruline révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels (qui incluent les oméga-3 et des oméga-6) [245]. En effet, les espèces *Arthrospira* et *Limnospira* appartiennent au groupe 3, sous-groupe 3 γ . Ces souches possèdent des $\Delta 6$ -, $\Delta 9$ - et $\Delta 12$ -désaturases d'acides gras (FAD), qui produisent de l'acide γ -linoléinique triénoïque [245]. Lors de la culture de spiruline à des salinités plus élevées, l'accumulation d'acides gras insaturés a été observée, un fait intéressant en raison de leur haute valeur nutritionnelle [243].

II.2.2. Composition en minéraux

La teneur en minéraux de la spiruline est indiquée dans le tableau 3.3. Les oligoéléments inorganiques les plus importants dans la spiruline sont le magnésium, le calcium, le zinc et le fer. Ils sont importants pour la nutrition du corps humain.

Le fer peut contribuer à améliorer l'anémie et les troubles hypertensifs. La proportion de magnésium est très élevée $623 \pm 20,81$ (mg/100g).

Les aliments riches en fibres sont généralement riches en magnésium, ce qui explique la forte teneur en fibres de la spiruline étudiée. Le calcium est un minéral que l'on associe le

plus souvent à la solidité des os et des dents, mais il joue également un rôle crucial dans la coagulation du sang et la contraction musculaire. La proportion (zinc) de ce micronutriment est compatible avec la santé des os et contribue à la solidité du système immunitaire.

Les teneurs en fer, calcium et zinc de la spiruline sont respectivement de 11,66 mg/100g \pm 48,35 ; 93,33 mg/100g \pm 23,09 et 17,10 mg/100g \pm 2,75.

Tableau 3.3 : Teneurs en minéraux de la *Limnospira sp. ALgLouSal1*

Composition minérale	Moyenne (mg/Kg) \pm SD
Equivalent en sel (NaCl)	50.9 \pm 0.38
Fer (Fe)	116.6 \pm 48.35
Zinc (Zn)	171.0 \pm 2.75
Magnesium (Mg)	6230 \pm 20.81
Calcium (Ca)	933.3 \pm 23.09
Phosphore	05.70 \pm 0.02

Notre souche de cyanobactérie contient 50.9mg de NaCl / Kg de matière sèche. Ce taux semble être inférieur à ceux trouvés dans la littérature qui sont de l'ordre de 4500mg/Kg [77] ; 9000 mg/kg [246] et 9449 voir 38803 mg/Kg [45]. La composition des milieux de culture, la méthodologie de récolte et traitement après récolte, (rinçage ou non), sont des facteurs pouvant influencer ce taux [61].

La teneur en fer trouvée est inférieure à celles rapportées par la littérature ; de l'ordre de 4256 mg/kg [45], et même allant de 600 à 6000 mg de fer par kg de spiruline [77]. Bensehaila et son équipe ont dosé des éléments minéraux dans la spiruline de tamanrasset où ils ont trouvé des valeurs maximales arrivant à 1800 mg/kg, 14000 g/kg, et 9000 mg/kg, de Fe, Ca et P, respectivement [247]. Ces résultats sont différents comparés à ceux obtenus dans cette étude pour la même souche. Les spirulines naturelles ont rarement des teneurs en fer dépassant 500 mg/kg [99].

Ceci pourrait être dû aux différences dans les conditions de culture, sachant que les cyanobactéries accumulent les minéraux différemment lorsqu'elles sont cultivées dans différents milieux, à différentes températures, pH, salinité, etc .

Arthrospira contient environ 200 à 300 mg de calcium pour 1kg de poids sec (Ranga Rao, 2006). Bensehaila et al., (2015), ont noté un teneur en calcium de 2700 mg/100g [247]. Le phosphore peut être présent à des taux de 6700 à 9000 mg/kg. Notre piriune est

relativement pauvre en phosphore comme indiqué par Flaquet et Hunri (2006) [77]

A noter aussi que le spirulan calcique (Ca-SP), un polysaccharide sulfaté de la spiruline est composé de rhamnose, de 3-O-méthyl-rhamnose, de 2,3-di-O-méthyl-rhamnose, de 3-O-méthylxylose, d'acides uroniques, de groupes sulfates et aussi d'ions calcium chélatés avec des groupes sulfates [87].

Différents travaux ont été réalisés sur la composition en éléments minéraux et métaux lourds de la spiruline et les données sont très variables d'une étude à une autre [242].

II.2.3. Composition en métaux lourds

Les résultats de la teneur de la cyanobactérie de Tamanrasset en métaux lourds sont illustrés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Teneurs en métaux lourds de la *Limnospira sp. ALgLouSall*.

Composition en Métaux lourds	Moyenne \pm DS
Plomb	3.48 \pm 1.78 (mg/Kg)
Arsenic	1.40 \pm 0.78 (mg/Kg)
Cadmium	0.92 \pm 0.50 (mg/Kg)
Mercuré	0.52 \pm 0.29 (mg/Kg)

Nous constatons des concentrations respectivement pour le plomb, l'arsenic et le cadmium, de 3,48 mg/Kg \pm 1,78, 1,40 mg/Kg \pm 0,78 et 0,92 mg/Kg \pm 0,50. La teneur en Plomb est largement inférieure à celle trouvée par Aouir [48].

Ainsi, notre spiruline semble présentée des teneurs en Cadmium et en Mercure dépassant les seuils fixés par le conseil supérieur d'hygiène publique de France, (1989) [248].

Les microalgues doivent être conformes aux spécifications suivantes : Arsenic minéral \leq 3mg /Kg ; Cadmium \leq 0.5mg /Kg ; Mercure \leq 0.1 mg/Kg ; Plomb \leq 5 mg/Kg de matière sèche.

La teneur en métaux lourds diffère d'une souche à l'autre, mais aussi selon les conditions de culture [249].

Les cyanobactéries du genre *Arthrospira* peuvent chélater les métaux lourds ; et possèdent un pouvoir cumulatif des métaux lourds, comme la majorité des poissons et espèces de l'aquaculture. Il faut donc mettre en place des systèmes de traçabilité pour s'assurer que de la spiruline soit exempte de toute toxicité dans le cas d'une valorisation

[250].

En effet, le risque d'exposition à la toxicité des métaux lourds par l'ingestion de spiruline produite dans des conditions chargées en métaux lourds tels que le plomb, l'arsenic et le cadmium provoque des dommages aux organes vitaux tels que le foie et les reins.

II.3. Teneur en phytonutriments

II.3.1. Teneur en pigments chlorophylliens

La teneur en chlorophylle a (Chl_a) est de l'ordre de 12 mg/g. Le taux de chlorophylle b (Chl_b) descend à 8,698 mg/g.

Nos résultats semblent être proches de ceux trouvés par Kumar et ses collaborateurs, qui en cultivant la spiruline à 35 °C, ont noté la plus forte valeur de l'accumulation de Chl_a égale à 1,54 % [251]. Kent et son équipe ont aussi trouvé des concentrations de 12,33 mg/g de chlorophylles [252].

D'autres chercheurs ont trouvé des taux un peu plus bas allant de 10 mg/g [253] à 11.5 mg/g [254] pour les chlorophylles totales. Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux trouvés par Aouir [45] qui a trouvé des valeurs maximales de l'ordre de 8,49 et 7,84 mg/g.

Les chlorophylles sont quantitativement, les pigments majoritaires de la spiruline, leurs taux varie en fonction des conditions de culture [73].

Ainsi, le séchage au plein soleil ou en plein air est le plus rapide et le moins coûteux, mais il a des inconvénients : il risque de bleuir en surface par destruction de la chlorophylle par les ultra-violet ; mais après broyage ce bleuissement n'est plus perceptible [64 ; 251].

II.3.2. Teneurs en phycobiliprotéines et phycocyanine

La figure 3.8 illustre le taux des différentes phycobiliprotéines présentes chez *Limnospira sp. ALgLouSa11*.

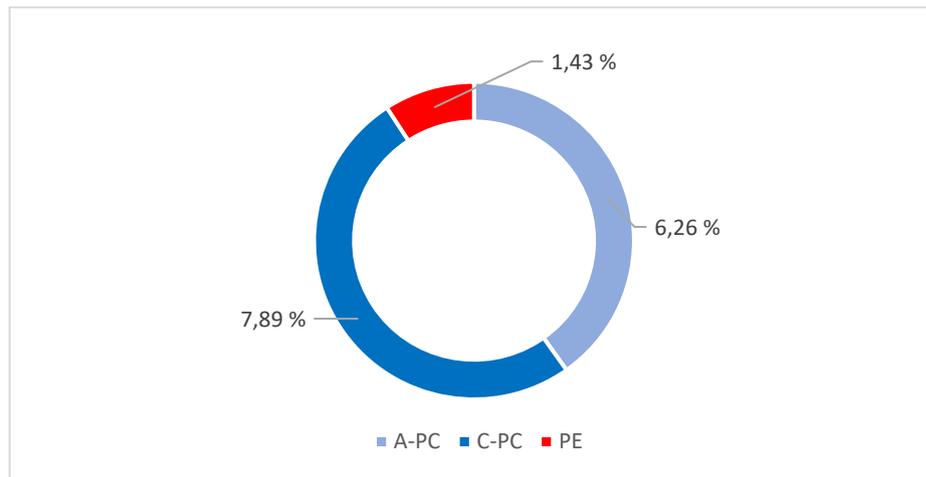


Figure 3.8 : Anneau représentatif de la teneur en les différentes Phycobiliprotéines (A-PC, C-PC et PE) de la *Limnospira sp. AlgLouSa11*

Parmi les phycobiliprotéines, la phycoérythrine (PE) représente le taux le plus faible à raison de 1.43% de la cyanobactérie étudiée. Des travaux antérieurs ont trouvé des résultats similaires ; avec 1.2% [129], 1.8% [251].

D'autres ont noté des taux légèrement supérieurs allant de 1,30 à 3,30% sur différentes souches de spiruline [45]. La PE est produite à faible taux chez *Arthrospira* ; la synthèse des PE peut ne jamais être observée [255].

L'allophycocyanine (A-PC) est par contre présente à 6.26%, un taux jugé légèrement supérieur à celui trouvé par Anamika et ses collaborateurs (2005), et Kumar et son équipe (2011), qui ont trouvé, respectivement 3,8% et 3,46% de A-PC dans la spiruline [129 ; 251].

La teneur en C-Phycocyanine (C-PC) est de l'ordre de 7.89%. Nos résultats concordent avec les résultats de Kumar qui sont de 7,73%, [251]. Mais sont inférieurs à ceux enregistrés par Anamika, de l'ordre de 17,5%, [129].

La Phycocyanine brute représente (C-PC_{brute}%) 10.66% avec une pureté de l'ordre de 0.7. Selon Rito-Palomares (2001) ; cette C-phycocyanine est de grade alimentaire, sa pureté est supérieure à 0.5 [152].

L'intensité lumineuse, la souche ainsi que les conditions de culture semblent avoir un effet sur la teneur en phycocyanine [256 ; 154].

Le nitrate de sodium NaNO₃ est nécessaire pour la synthèse des acides aminés, qui composent les protéines et d'autres composants cellulaires comme les chlorophylles et La phycocyanine [257 ; 258]. L'intensité lumineuse, la souche ainsi que les conditions de culture semblent avoir un effet sur la teneur en ces pigments.

III. Optimisation de l'extraction de la phycocyanine

III.1. Optimisation de l'extraction de la PC par méthodologie de réponse en surfaces

Afin d'obtenir un rendement optimal de l'extraction de la phycocyanine, des expériences ont été réalisées par une approche statistique nommée, méthodologie de réponse en surface selon le plan composite centré CCD.

Le plan CCD fait l'étude des interactions entre les facteurs significatifs. Il est aussi utilisé pour déterminer le niveau optimum des facteurs étudiés.

Le nombre de niveaux d'un plan composite est de cinq par facteur : le point central 0, les deux niveaux du plan factoriel (-), (+) et les deux niveaux des points en étoile a et A.

La matrice donnée par le design CCD pour la concentration de C-phycocyanine est présentée dans le tableau 3.5.

Les effets d'interaction des facteurs affectant l'extraction de la C-phycocyanine, ont été tracés sous forme de graphiques de surface en (surface de réponse) (figure 3.10).

Les résultats, des tests statistiques (ANOVA), obtenus sur les facteurs et l'interaction entre ces facteurs, ont montré que le modèle est très significatif statistiquement, suggérant que les facteurs étudiés ont un impact réel et important sur la réponse (concentration de phycocyanine) ($P < 0,05$) avec un carré moyen de 0,002; somme des carrés des écarts (SCE) de 0,0012, p-calculé de 0,005 et F- calculé de 154,5 (tableau 3.6).

La valeur de SCE élevée par rapport à la valeur du carré moyen montre une grande proportion de variance expliquée par le modèle, suggérant que le modèle est bien ajusté aux données.

La valeur de p-calculé très faible ($< 0,05$) et signifie que les résultats ne sont pas dus au hasard, ce qui renforce la validité du modèle (tableau 3.6).

Tableau 3.5 : Résultats de réalisation de la matrice du plan composite centré de RSM.

Essai	X1	X2	X3	X4'	C-PC (mg.ml ⁻¹)	C-PC (mg.g ⁻¹)
1	+1	+1	+1	+1	3,505	0,088
2	+1	-1	-1	+1	3,037	0,076
3	+1	-1	+	-1	2,839	0,071
4	-1	+1	-1	-1	0,084	0,084
5	0	0	0	a	1,606	0,078
6	0	A	0	0	1,493	0,073
7	+1	+1	+1	-1	2,971	0,074
8	+1	-1	-1	-1	3,028	0,076
9	-1	-1	+1	-1	0,068	0,068
10	0	0	0	0	1,878	0,092
11	0	a	0	0	2,292	0,112
12	-1	+1	+1	+1	0,079	0,079
13	-1	+1	+1	-1	0,069	0,069
14	-1	-1	+1	+1	0,086	0,086
15	-1	+1	-1	+1	0,071	0,0718
16	0	0	A	0	1,630	0,079
17	0	0	0	A	2,225	0,108
18	-1	-1	-1	+1	0,066	0,066
19	0	0	a	0	2,116	0,103
20	+1	+1	-1	-1	2,986	0,075
21	+1	+1	-1	+1	3,139	0,078
22	0	0	0	0	0,022	0,001
23	A	0	0	0	3,373	0,084
24	a	0	0	0	0,077	0,077
25	+1	-1	+1	+1	3,618	0,090
26	-1	-1	-1	-1	0,079	0,0793

+1 : niveau haut du facteur ; -1 : niveau bas du facteur. 0 : point centrale ; ±α (1,42) ; A : + α ; a : - α.

Tableau 3.6 : Analyse de la variance du plan de l'optimisation.

	Coefficient	Somme des carrées des écarts	Degré de liberté	Carré moyen	p-value	F-value
X₁	0,00168					
X₂	-0,00177					
X₃	-0,00016					
X₄	0,00358					
Modèle		0,0012	14	0,002	0,005	154,5

Concernant les effets principaux des facteurs, les résultats du tableau 3.6, ont montré que le temps de macération et la concentration en spiruline, ont un impact croissant significatif et légèrement croissant, avec des coefficients positifs de 0,00358 et de 0,00168, respectivement.

Cependant, la concentration saline représente une influence légèrement décroissante sur la réponse avec un coefficient négatif (-0,00177), et concernant l'intensité des ultrasons, son impact est considéré comme négligeable car la valeur de son coefficient est très faible (-0,00016).

L'équation 3.1 de régression obtenue pour la première réponse R1 (Concentration en phycocyanine) est la suivante :

$$\begin{aligned}
 R1 = & 0,0788 + 0,00168 X_1 - 0,00177 X_2 - 0,00016 X_3 + 0,00358 X_4 - \\
 & 0,000081 X_1 X_2 + 0,00103 X_1 X_3 + 0,00222 X_1 X_4 - 0,00112 X_2 X_3 - 0,00069 X_2 X_4 \\
 & + 0,00524 X_3 X_4 - 0,00456 X_1^2 + 0,00133 X_2^2 + 0,00086 X_3^2 + 0,00188 X_4^2
 \end{aligned}$$

Les interactions entre concentration de spiruline et temps de macération, ainsi que celles entre ultrasons et temps de macération, ont vraisemblablement un impact positif notable. Alors que, les autres termes d'interaction (Concentration en cyanobactérie * Concentration saline) et (Concentration saline * Intensité des ultrasons) ont des coefficients beaucoup plus faibles, indiquant une interaction limitée. Les termes X_1^2 (-0,00456) et X_4^2 (0,00188) ont les plus grands coefficients quadratiques, indiquant des effets non linéaires significatifs pour ces deux facteurs. Cela peut se traduire par une réponse optimale (pic ou vallée) pour ces deux facteurs à des niveaux spécifiques.

Les valeurs supérieures de R^2 (95,00%), de R^2 ajusté (93,00%) et R^2 prédite (90,00%) indiquent l'efficacité du modèle (tableau 3.7).

L'analyse statistique indique que le modèle proposé était adéquat avec des valeurs très satisfaisantes du de R^2 , R^2 ajusté et R^2 prédite. La valeur de R^2 signifie que 95 % de la variabilité des données est expliquée par le modèle. Cela indique que les facteurs étudiés exercent une forte influence sur la concentration de phycocyanine, et le modèle s'ajuste bien aux données expérimentales. La valeur élevée de R^2 ajusté, signifie que même en ajustant pour le nombre de facteurs, le modèle reste robuste et continue d'expliquer une grande partie de la variabilité des données. La valeur de R^2 prédite suggère que le modèle est capable de prédire avec précision de nouvelles données. Cela garantit la validité du modèle, et il peut être utilisé pour optimiser les conditions expérimentales dans de nouveaux ensembles de données ou de situations.

Selon les résultats obtenus dans le tableau 3.7, la valeur de l'écart-type très faible (0,0007) indique une variabilité faible des données. Cela montre que les mesures de concentration de phycocyanine sont très précises et cohérentes autour de la moyenne. La valeur de la précision adéquate était de 52,04 (tableau 3.7). Cette valeur montre que le rapport signal/bruit est bien supérieur à 4, ce qui est souhaitable. Cela suggère que le modèle à une précision élevée et que les effets des facteurs sont facilement discernables par rapport au bruit expérimental. Cela permet une navigation efficace dans l'espace de conception pour identifier des conditions optimales.

Tableau 3.7: Ajustement du modèle CCD par rapport à R1.

R^2	0,95
R^2 ajusté	0,93
R^2 prédite	0,90
Précision adéquate	52,04
Ecart-type	0,0007

La figure 3.10 indique que les contours concentriques ou elliptiques sont une excellente observation. Ils suggèrent une interaction significative entre les facteurs. Cela signifie que les variations dans les facteurs influencent le rendement d'extraction (R1) de manière complexe, et les zones optimales sont souvent au centre de ces courbes. Des pentes abruptes dans ces zones indiquent que de petites variations dans les facteurs peuvent entraîner des changements importants dans la réponse, ce qui est crucial pour l'optimisation fine des paramètres.

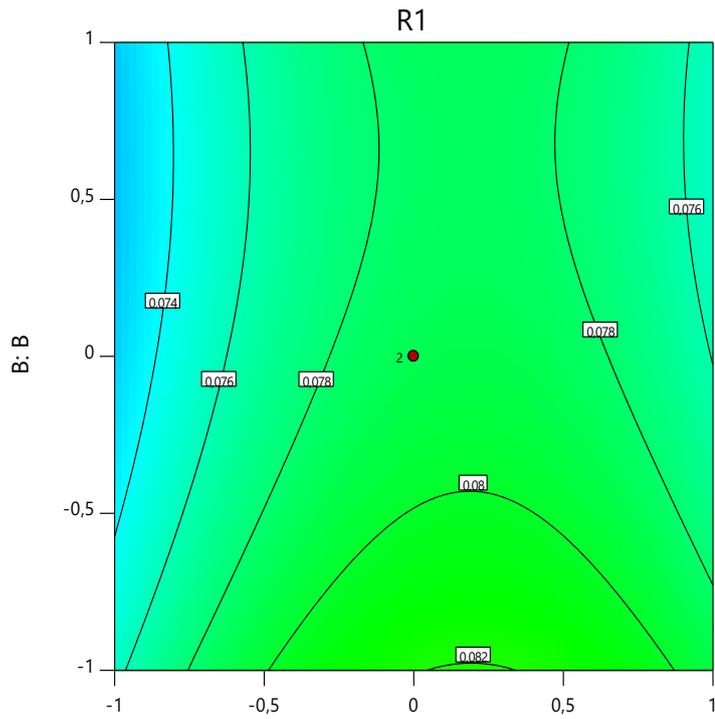
Les résultats obtenus ont montré que le temps de macération a le plus grand impact, suivi de la concentration en spiruline. L'effet combiné du temps de macération avec d'autres facteurs est également important. Les courbes ont montré une augmentation significative de la concentration de phycocyanine avec le temps de macération (X_4) et une légère courbure quadratique pour la concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11 X₁* (figure 3.9 et figure 3.10).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1
● Design Points
0,0662983 0,0960057

X1 = A: A
X2 = B: B

Actual Factors
C: C = 0
D: D = 0



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1
● Design Points
0,0662983 0,0960057

X1 = A: A
X2 = C: C

Actual Factors
B: B = 0
D: D = 0

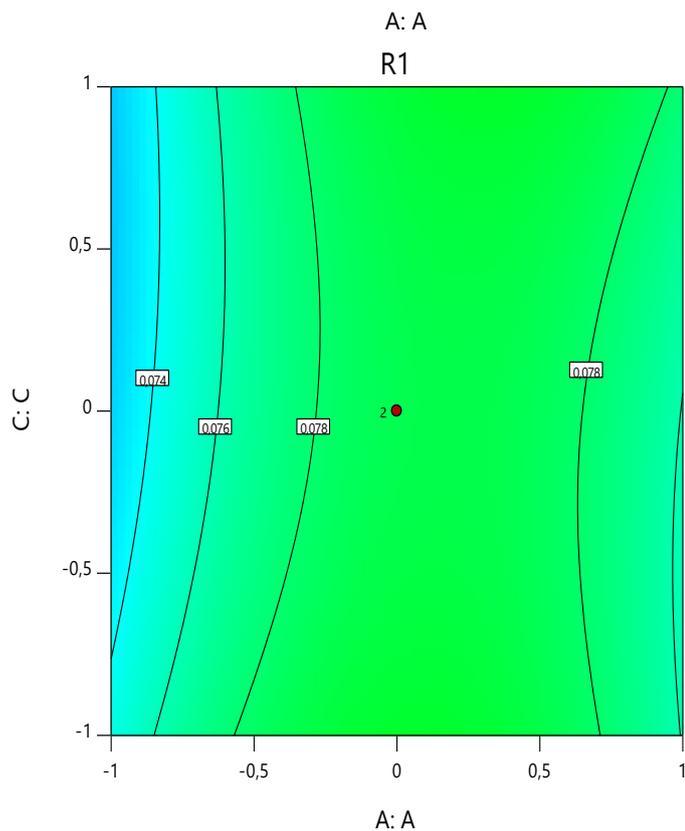


Figure 3.9 : Graphiques des contours concentriques de l'interaction entre les facteurs pour l'extraction de la phycocyanine pour chaque variable.
X1 : Concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11* (%); X2 : Concentration de la solution saline utilisée (g.L^{-1}); X3 : Intensité des ultrasons (kHz); X4 : Temps de macération (h)

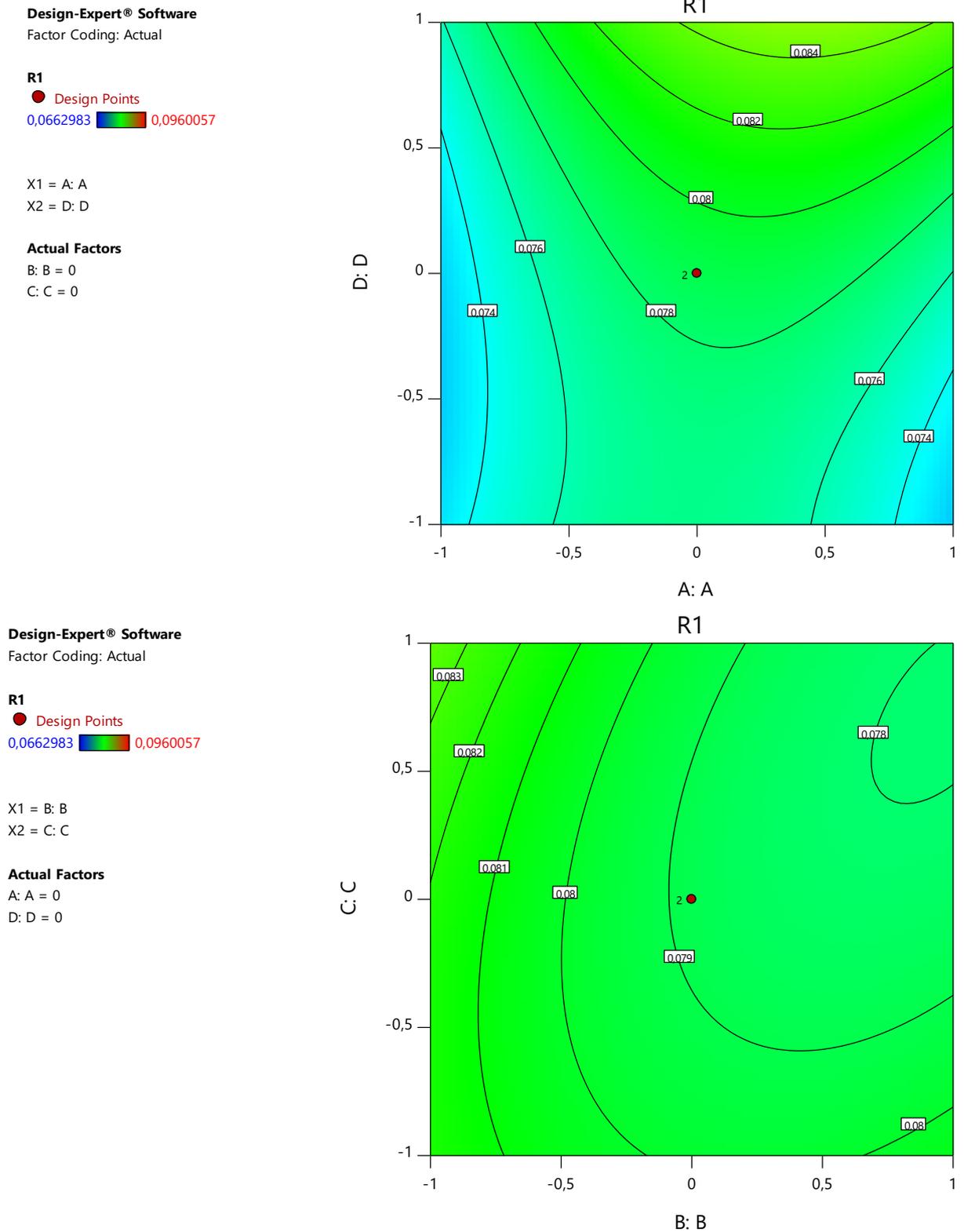


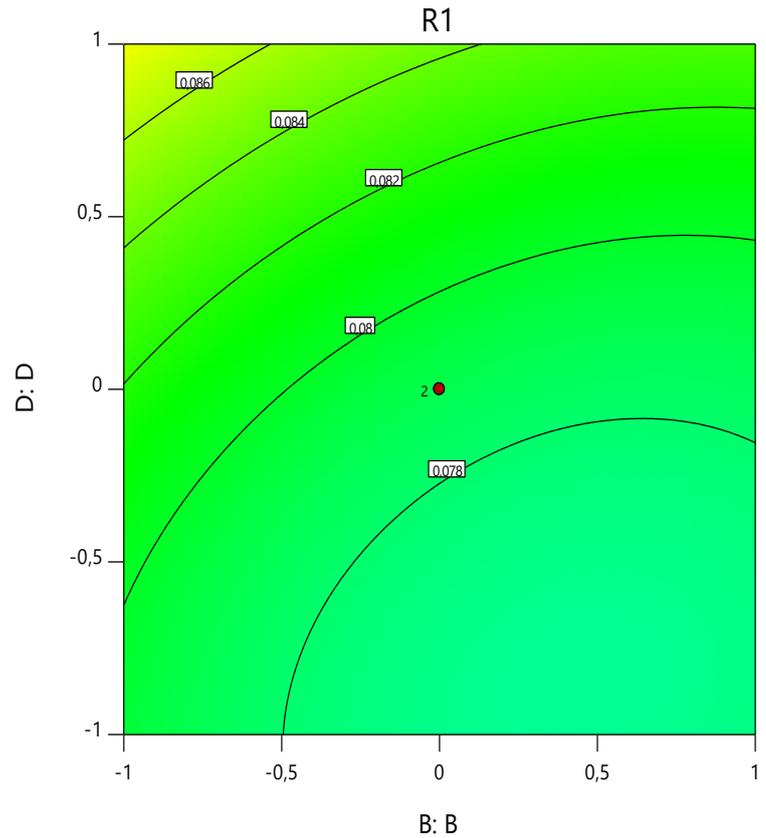
Figure 3.9 : Graphiques des contours concentriques de l'interaction entre les facteurs pour l'extraction de la phycocyanine pour chaque variable (Suite 1).
 X1 : Concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11* (%); X2 : Concentration de la solution saline utilisée (g.L^{-1}); X3 : Intensité des ultrasons (kHz); X4 : Temps de macération (h)

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1
● Design Points
0,0662983  0,0960057

X1 = B: B
X2 = D: D

Actual Factors
A: A = 0
C: C = 0



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1
● Design Points
0,0662983  0,0960057

X1 = C: C
X2 = D: D

Actual Factors
A: A = 0
B: B = 0

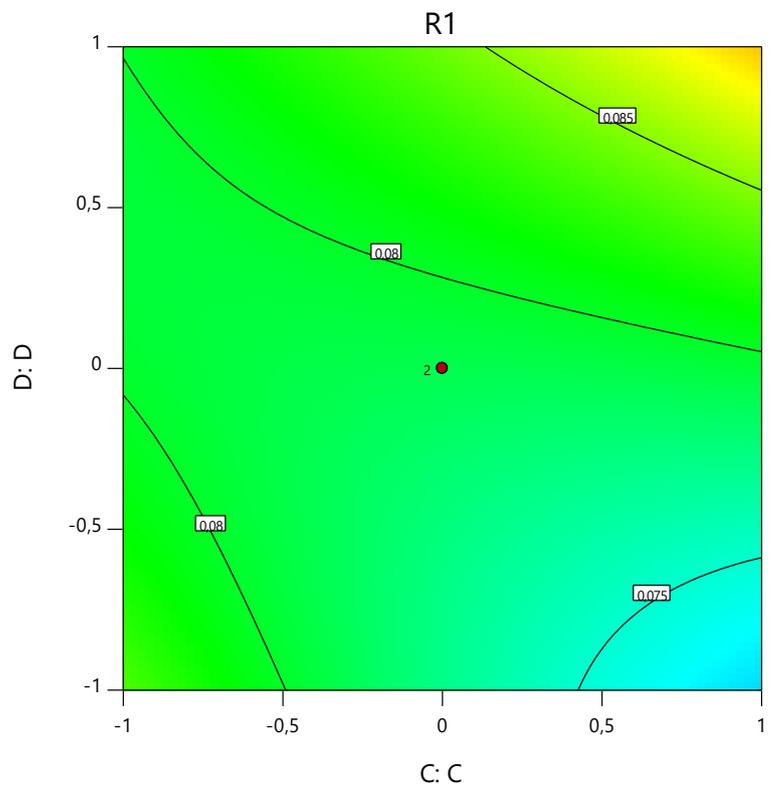


Figure 3.9 : Graphiques des contours concentriques de l'interaction entre les facteurs pour l'extraction de la phycocyanine pour chaque variable (Suite 2).

X1 : Concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11* (%); X2 : Concentration de la solution saline utilisée (g.L^{-1}); X3 : Intensité des ultrasons (kHz); X4 : Temps de macération (h)

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

R1

○ Design points below predicted value

0,0662983  0,0960057

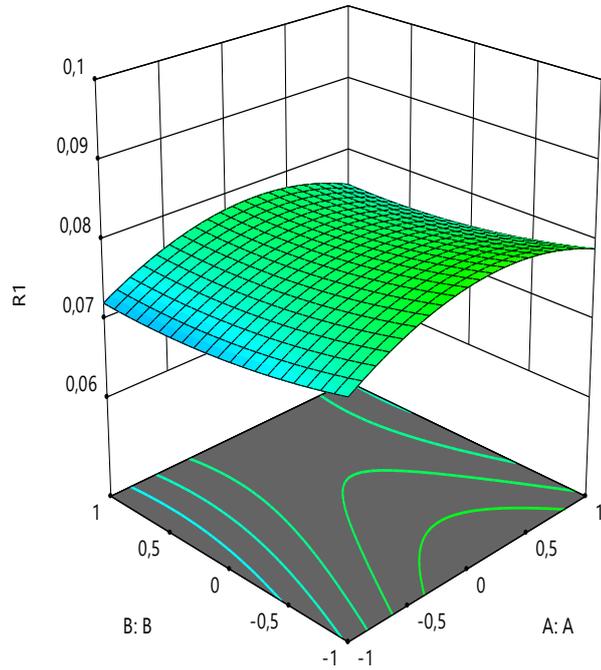
X1 = A: A

X2 = B: B

Actual Factors

C: C = 0

D: D = 0



Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

R1

○ Design points below predicted value

0,0662983  0,0960057

X1 = A: A

X2 = C: C

Actual Factors

B: B = 0

D: D = 0

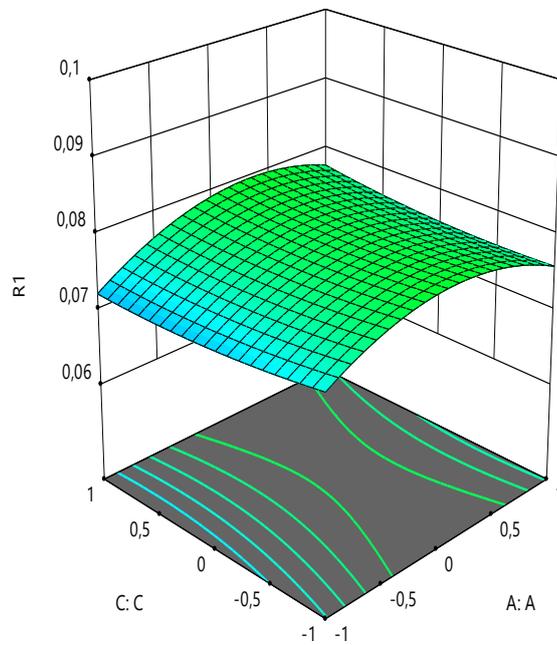


Figure 3.10 : Graphiques des surfaces de réponse obtenues par RSM montrant les effets relatifs d'interaction des facteurs affectant le rendement d'extraction de la phycocyanine

X1 : Concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11* (%); X2 : Concentration de la solution saline utilisée (g.L^{-1}); X3 : Intensité des ultrasons (kHz); X4 : Temps de macération (h)

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

R1

○ Design points below predicted value

0,0662983  0,0960057

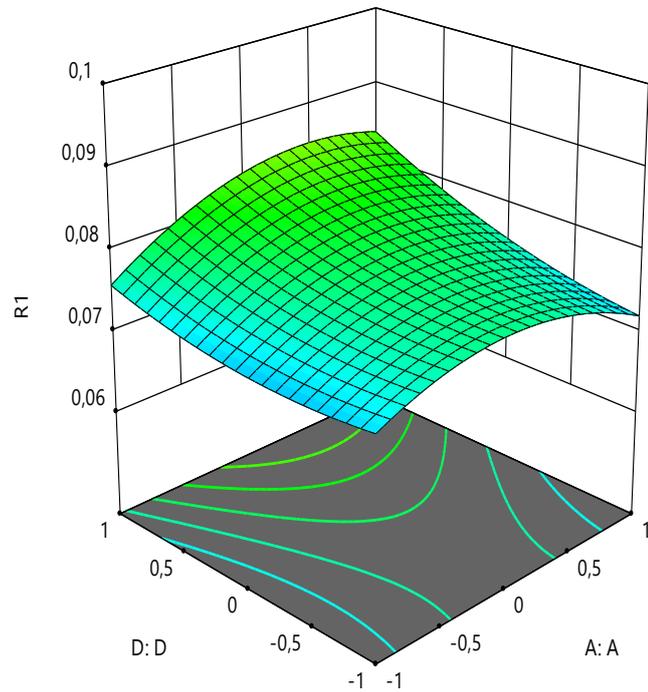
X1 = A: A

X2 = D: D

Actual Factors

B: B = 0

C: C = 0



Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

R1

○ Design points below predicted value

0,0662983  0,0960057

X1 = B: B

X2 = C: C

Actual Factors

A: A = 0

D: D = 0

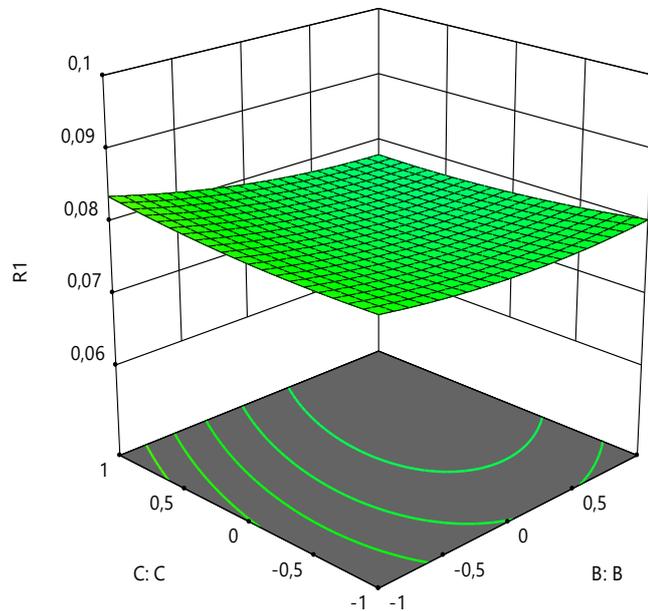


Figure 3.10 : Graphiques des surfaces de réponse obtenues par RSM montrant les effets relatifs d'interaction des facteurs affectant le rendement d'extraction de la phycocyanine (suite 1)
 X1 : Concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11* (%); X2 : Concentration de la solution saline utilisée (g.L^{-1}); X3 : Intensité des ultrasons (kHz); X4 : Temps de macération (h)

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

R1

○ Design points below predicted value

0,0662983  0,0960057

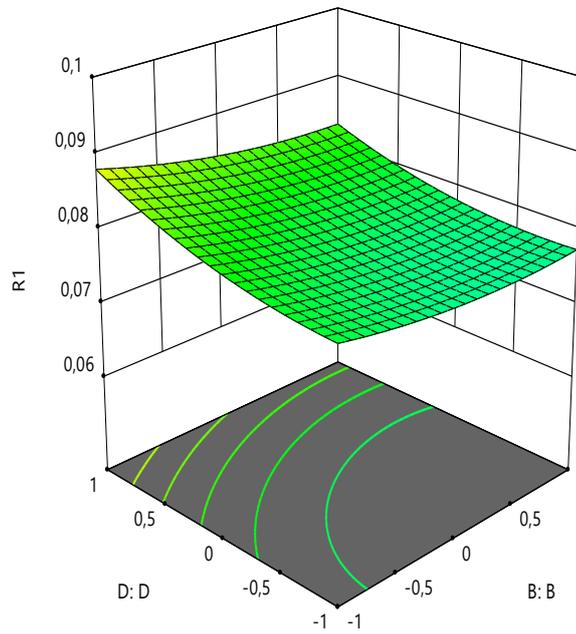
X1 = B: B

X2 = D: D

Actual Factors

A: A = 0

C: C = 0



Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

R1

○ Design points below predicted value

0,0662983  0,0960057

X1 = C: C

X2 = D: D

Actual Factors

A: A = 0

B: B = 0

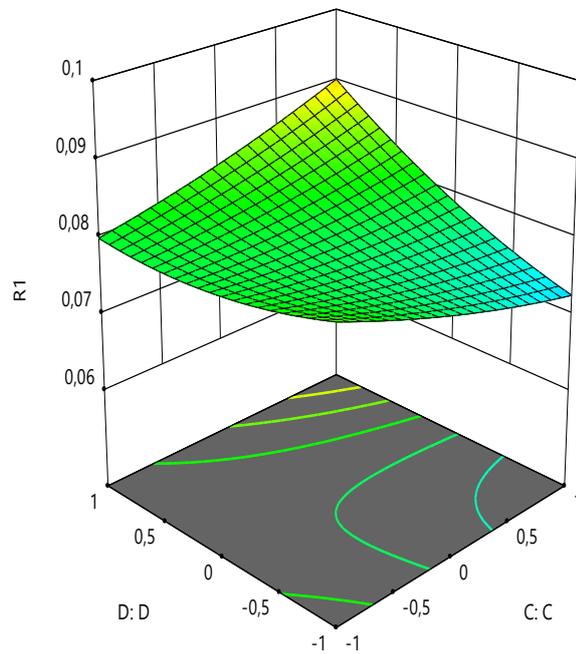


Figure 3.10 : Graphiques des surfaces de réponse obtenues par RSM montrant les effets relatifs d'interaction des facteurs affectant le rendement d'extraction de la phycocyanine (suite 2)

X1 : Concentration initiale en *Limnospira sp. AlgLouSa11* (%); X2 : Concentration de la solution saline utilisée (g.L^{-1}); X3 : Intensité des ultrasons (kHz); X4 : Temps de macération (h)

Parmi les méthodes d'extraction de la phycocyanine, l'extraction par des solutions salines (NaCl) couplé à un traitement mécanique permettrait la rupture cellulaire et l'extraction des composants intracellulaires.

La réalisation de cette étape vise l'étude de l'effet de différentes concentrations de solutions salines mais aussi l'effet d'autres facteurs sur l'extraction des composés bioactifs tel que la Phycocyanine, à partir de la cyanobactérie *Limnospira sp. AlgLouSa11*.

Aussi, nous avons évalué l'optimisation de l'extraction a été évaluée par la méthodologie de surfaces de réponse qui mène à des designs très efficaces pour l'optimisation des facteurs en considérant les effets, principaux et d'interaction, par un nombre minimal d'expérimentations, fournissant ainsi une clarté sur la relation de cause-effet entre les facteurs et les réponses [259].

L'objectif ultime de l'approche RSM est d'identifier un modèle optimal avec une importante capacité prédictive pour fournir des solutions avec une variabilité négligeable [260].

III.2. Discussions de de l'optimisation de l'extraction de la phycocyanine

Selon Minh et al. (2014), Le rendement en phycocyanine peut varier selon la méthode d'extraction [261].

En effet, les extractions à partir de matière fraîche ont permis d'avoir les rendements les plus élevés.

Les méthodes de désintégration cellulaire étant nécessaires pour la libération de la phycocyanine et considérant que les méthodes conventionnelles, nécessitent un temps de traitement relativement long, tel le broyage, la congélation/décongélation et la macération que nous avons utilisée [262].

L'utilisation de méthodes non conventionnelles nous apparue comme une alternative pour gagner en temps et en quantité de solvants d'extraction. Dans les liquides, l'effet de la propagation des ondes est principalement attribué au phénomène de cavitation, qui provoque la croissance et l'effondrement des bulles d'air, ce qui entraîne une perturbation des cellules et augmentant l'extraction des composants internes [47 ; 263 ; 264].

Wang et al. (2023) ont évalué l'effet de différentes solutions salines dont Na₂CO₃, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgCl₂, CaCl₂, NaCl and KCl, à 50g.l⁻¹ sur le rendement d'extraction et le meilleur rendement d'extraction a été obtenu avec le NaCl et le KCl [167].

De là, notre étude, a visé l'optimisation du rendement d'extraction de la C-PC avec une solution saline à base de NaCl ; Les concentrations choisies vont de 0 à 60mg.l⁻¹, pour une macération qui dure au maximum 24h, après traitement aux ultrasons de solution initiales de différentes concentrations en spiruline.

Les résultats obtenus, ont montré que le temps de macération a plus d'impact sur le rendement d'extraction de la PC, avec la concentration en spiruline comparativement aux autres facteurs.

Selon Li et al. [41], la teneur en chlorophylles des extraits est inversement proportionnelle à la concentration en sel des solutions d'extraction. A noter qu'ils ont travaillé avec des solution salines de NaCl (0 - 100g.l⁻¹ et pendant 12h).

D'après la publication de Teixeira et ses collaborateurs (2024), des extraits plus riches en C-PC et d'une plus grande pureté peuvent être obtenu avec l'extraction saline ; La force ionique des solutions salines, minimise la coextraction des chlorophylles et favorise l'extraction des phycocyanines, ce qui a donné lieu à des pics d'absorption attribués aux chlorophylles minimisés [47].

Le phénomène qui pourrait s'expliquer par l'effet de salage [41 ; 139]. En effet, les effets des sels, cas du CaCl, sur la stabilité des protéines structurales sont liés à leur capacité relative à se lier aux protéines et à modifier leurs propriétés d'hydratation [].

Aussi, la stabilité des extraits de phycocyanine est très sensible à la température de conservation et les extraits de phycocyanine conservés à 4°C, à des pH plus acides se sont révélés les plus stables et les plus concentrés [261].

IV. Etude des propriétés structurantes et fonctionnelles de la phycocyanine

IV.1. Propriétés de surface

IV.1.1. Surface spécifique de la phycocyanine

Les résultats obtenus à la suite de l'analyse de la PC extraite par BET sont regroupés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8. Résultats de la détermination de la surface spécifique de la PC par BET

Paramètre	Résultat
Surface spécifique	3.4845 m ² /g ± 0.346.
Coefficient C	8.138135
Coefficient de corrélation	0.963

Le modèle Brunauer, Emmett et Teller est utilisé pour mesurer la surface spécifique qui désigne la surface accessible de la phycocyanine dans notre cas, par unité de masse.

Les résultats obtenus montrent que la surface spécifique de la phycocyanine est estimée à 3.48m²/g ±0.346. L'estimation de ce paramètre est cruciale pour la compréhension des interactions protéiques, de l'adsorption, de la catalyse enzymatique, de la solubilité des protéines et bien d'autres propriétés biochimiques.

Cependant, il faut savoir que la surface spécifique des protéines peut varier en fonction de leur structure et de leur pureté.

En général, les protéines alimentaires ont une surface spécifique qui se situe entre 1 et 10 m²/g.

Aussi, la surface spécifique de la phycocyanine peut interagir avec des ions, des protéines ou d'autres biomolécules, et donc influencer sa stabilité, sa solubilité ou sa fonction biologique ; ce qui est important pour son utilisation dans diverses applications industrielles et biotechnologiques en agroalimentaire.

IV.1.2. Tension superficielle de la phycocyanine

La tension interfaciale et superficielle correspond à la répulsion entre l'eau et l'huile et l'eau et l'air. Les protéines peuvent réduire la tension entre ces phases en raison de leur

nature amphiphile. Les tensioactifs sont utilisés dans les produits alimentaires (émulsions, mousses) et également dans des applications non alimentaires (détergents, savons). Les résultats de la mesure de la tension interfaciale entre une solution aqueuse de phycocyanine d'une part et l'huile de table ou l'air, de l'autre part sont regroupés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Résultats de la mesure de la tension superficielle / interfaciale de la phycocyanine dans l'air (P/A) et dans l'huile (P/H).

Tension (mN/m)	MEI (mN/m)	PR (mN/m)	PI (mN/m)	Angle (degrés)	Surface (mm ²)
Phycocyanine / Air					
--.---	--.---	19.136	5.834	16.954	22.893
Phycocyanine / Huile					
-.---	-.---	1.393	0.432	17.247	41.008

MEI : Module d'élasticité isostatique (ou *Modulus*) ; PR : Partie réelle ; PI : Partie Imaginaire

Comme indiqué sur le tableau 3.9, La tension interfaciale phycocyanine dans l'air (P/A) est de --.--- mN/m. Sa partie réelle étant majoritaire, la surface d'une goutte est en moyenne égale à --.--- mm² avec un angle d'environ 16 degré.

En revanche, la tension interfaciale phycocyanine dans l'huile (P/H), a été évaluée à 2.08mN/m, donc une tension nettement inférieure à celles de la phycocyanine dans l'air.

Nous remarquons aussi que le *modulus* est important dans le cas P/A, et est de --.--- mN/m. Celui de la P/H est de -.--- mN/m. Le *modulus* est une constante qui relie la contrainte au taux de déformations d'un échantillon isotrope. Ici la solution aqueuse de phycocyanine est soumise à une compression isostatique.

Ces résultats montrent que la phycocyanine, bien qu'elle soit solubilisée dans l'eau, elle est moins résistante à l'huile comparativement à l'eau, et donc le processus de dispersion et de mélange est facile. Ce qui est aussi illustré par la grande surface d'interface phycocyanine / huile.

Les substances qui réduisent la tension interfaciale agissent souvent comme agents tensioactifs. Cela indique que notre phycocyanine peut présenter des propriétés émulsifiantes meilleures comparativement aux propriétés moussantes.

Contrairement à nos résultats obtenus, l'étude de Zhong et al., (2024), a mentionné que l'émulsibilité, relativement faible, de la PC, limite son utilisation dans l'industrie alimentaire.

Afin d'améliorer la capacité émulsifiante de la phycocyanine, un complexe phycocyanine-chitosane a été testé, il améliore efficacement la capacité émulsifiante de la phycocyanine. Ce complexe présente une faible tension interfaciale et une forte stabilité [265].

Cependant, le travail de Gong et son équipe, mentionne qu'un traitement de la phycocyanine au plasma froid a amélioré non seulement les propriétés moussantes mais aussi l'agrégation et la stabilité à l'interface huile-eau de la PC. L'application du plasma froid a induit des changements structurels dans la PC, passant d'une conformation α -hélique à un enroulement aléatoire, [266]. Ce qui peut en partie confirmer nos résultats à propos des propriétés émulsifiantes qui sont meilleures et qui peut aussi interpréter la grande surface de la goutte de phycocyanine dans l'huile.

IV.2. Viscosité de la C-PC

Les résultats obtenus par mesure de la viscosité de la phycocyanine à différentes températures a mené au tableau 3.10.

Tableau 3.10: Résultats de la viscosité de la phycocyanine

Température (°C)	V. Dyn. (η : mPa)
5	-,--
20	-,--
30	-,--
35	-,--

V.Dyn. : Viscosité dynamique.

Nos résultats montrent que la solution aqueuse de phycocyanine perd toute sa viscosité à partir de -20°C . Ce qui est en accord avec beaucoup de travaux qui ont noté la température de -20°C comme température de dégradation de la Phycocyanine.

En effet, Chentir et al., 2018 [51], a noté que la thermostabilisation d'un extrait brut de phycocyanine jusqu'à des températures dépassant les 50°C ; était réalisé avec du PEG-4000 et du sorbitol.

IV.3. Propriétés rhéologiques, de structures et de texture

Les résultats de l'analyse par le rhéomètre ont conduit aux courbes d'écoulement figurés dans la figure 3.11 et la figure 3.12.

Rappelons qu'une courbe d'écoulement représente un graphique qui indique la relation entre la contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement d'un fluide, ici de la phycocyanine dans l'eau.

Cette analyse a été effectuée à -20°C pour éviter un éventuel risque de dégradation ou de perte de fonctionnalité de la phycocyanine (en se basant sur les résultats obtenus lors de la détermination de la viscosité de la PC extraite).

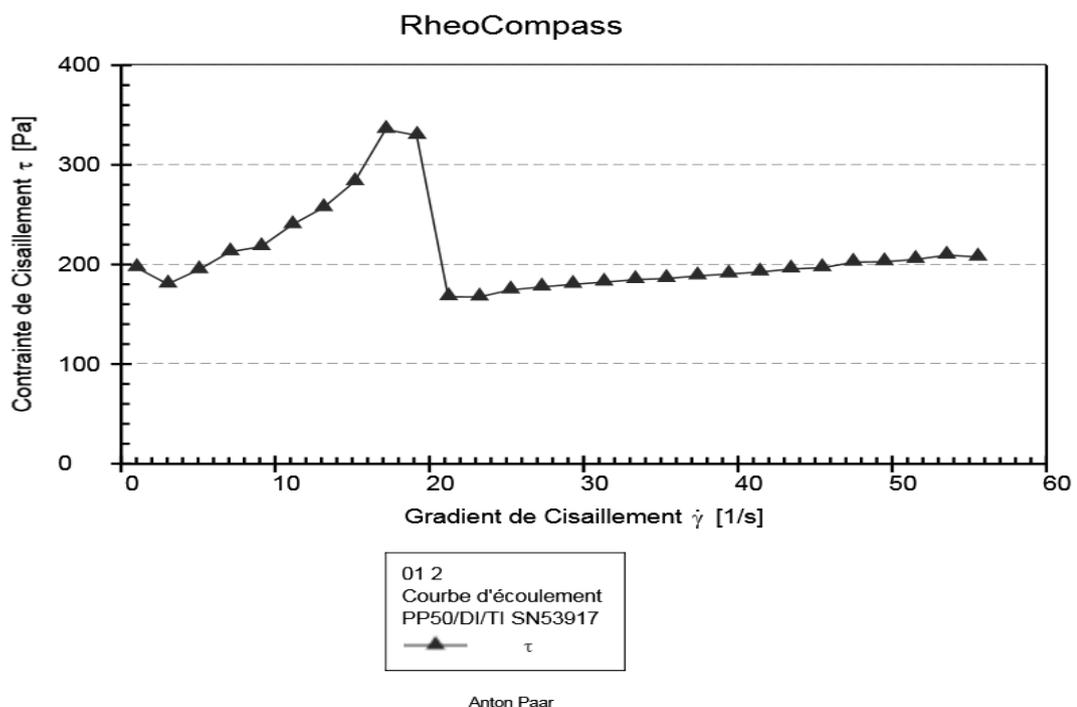


Figure 3.11 : Courbe d'écoulement, contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement, de la phycocyanine (Photo originale)

L'analyse de cette courbe d'écoulement (figure 3.11) indique une élévation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement et arrive à une valeur de $\tau = 329,71 \text{ Pa}$ à $\dot{\gamma} = 19.2 \text{ s}^{-1}$, puis une diminution brusque arrivant à de $\tau = 167.75 \text{ Pa}$ est observé à $\dot{\gamma} = 21.2 \text{ s}^{-1}$. Une augmentation légère par la suite arrivant à $\tau = 192,55 \text{ Pa}$ à 41.4 s^{-1} .

Inversement, l'analyse la courbe d'écoulement (figure 3.12), montre une diminution de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement ; de $\eta = 17193 \text{ mPa.s}$ à $\dot{\gamma} = 19.2 \text{ s}^{-1}$, une chute est observée juste après (au même gradient pour la figure 3.13), soit à $\dot{\gamma} = 21.2 \text{ s}^{-1}$ où la viscosité descend à $\eta = 7904.2 \text{ mPa.s}$. puis à $\eta = 4649.6 \text{ mPa.s}$ pour un gradient de cisaillement de $\dot{\gamma} = 41.4 \text{ s}^{-1}$.

La courbe tracée en la figure 3.11, est non linéaire. Elle indique ainsi que la phycocyanine à l'état fluide, présente les caractéristiques d'un fluide non-newtonien. A rappeler qu'un fluide dont la viscosité reste constante, indépendamment du taux de cisaillement ou de déformation appliqué est un fluide Newtonien.

,

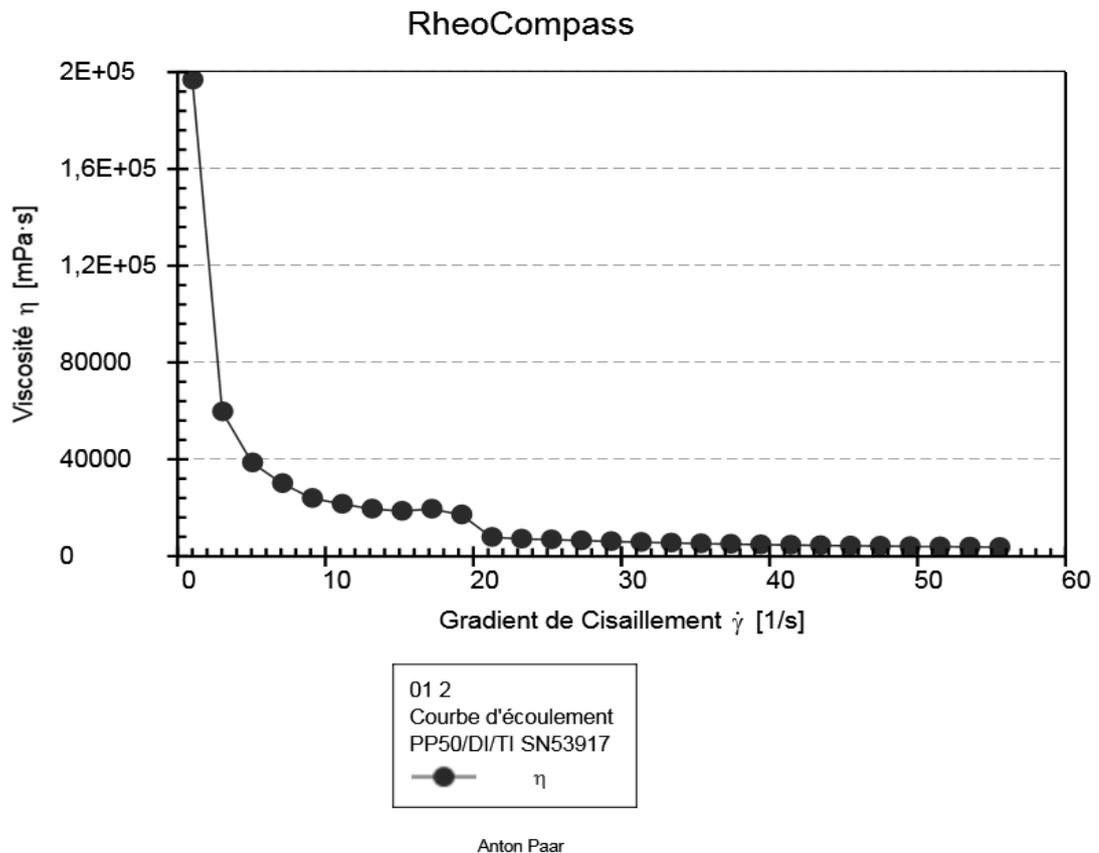


Figure 3.12: Courbe d'écoulement, viscosité en fonction du gradient de cisaillement, de la phycocyanine (Photo originale)

Pour caractériser le comportement de PC sous différentes conditions de cisaillement ou d'agitation ou autre traitement mécanique qui peut être appliqué en Technologie agroalimentaire, l'analyse de la figure 3.14, indique une diminution de la viscosité avec le gradient de cisaillement ; Nous pouvons conclure que la phycocyanine est un fluide rhéofluidifiant et peut être classée en tant qu'un pseudoplastique, sur le plan rhéologique.

En conclusion, La conformité structurelle de toute molécule joue un rôle crucial dans ses aspects fonctionnels. Selon Chhirang (2024) [267], Il existe 61 structures de phycobiliprotéines déposées dans la *Protein Data Bank*, obtenues par diffraction des rayons X, et qui appartiennent principalement à des cyanobactéries et à des algues rouges. Sur ces 61 structures, 36 sont des phycocyanines, 10 des allophycocyanines, 12 des phycoérythrines et 3 des phycoérythrocyanines.

La classification des phycobiliprotéines est basée sur leur structure et la composition de leurs chromophores. [268]. La C-PC nécessite une amélioration de ses propriétés fonctionnelles [266].

Conclusion Générale



CONCLUSION GÉNÉRALE

Le présent travail avait pour objectif de procéder à une caractérisation génomique aboutissant à la classification taxonomique d'une souche de cyanobactérie, isolée de Tamanrasset, Algérie, d'identifier ses contaminants de culture puis d'étudier la composition biochimique de cette cyanobactérie sous sa forme sèche cultivée sur milieu de culture Hiri. Par la suite une optimisation de l'extraction de la phycocyanine PC par solutions salines à base de chlorure de sodium (NaCl) en utilisant la méthodologie de réponse en surface (*Responce Surface Methodology*) (RSM) a été réalisée et une évaluation de quelques caractéristiques fonctionnelles et structurantes de la PC extraite a également été faite.

La souche de cyanobactérie *Limnospira sp. AlgLouSa11*, de Tamanrasset a été classée dans le genre *Limnospira*. *Limnospira fusiformis* KN01 étant son parent le plus proche.

Sa facilité de culture et sa capacité à générer des molécules bioactives font de *Limnospira sp. AlgLouSa11* une excellente alternative alimentaire. L'exploration de son génome a démontré qu'*AlgLouSa11* contient plusieurs gènes codant des CDS pour la biosynthèse de métabolites secondaires, dont des cyanobactines, des terpènes et des lanthipeptides de classe V.

L'exploration, la production et l'extraction de ces métabolites secondaires pourraient constituer des voies d'exploitation prometteuses pour des applications pharmaceutiques, médicinales, agricoles ou industrielles potentielles.

En outre, la compréhension des capacités de biosynthèse d'*AlgLouSa11* pourrait contribuer à l'élaboration de stratégies de gestion de l'environnement et de durabilité, contribuant ainsi à un domaine plus large de la biotechnologie.

Certes, la culture de cette cyanobactérie peut être gênée par des contaminants microbiens, nos résultats ont montré que les bactéries associées à sa culture sont quasiment des bactéries halophiles d'origine marine ou roches salines.

Les arbres phylogénétiques ont relié les branches des bactéries isolées à partir de la culture de la *L. sp. ALgLouSa11* avec des bactéries qui leurs sont étroitement apparentées à

savoir : *Oceanipulchritudo coccoïdes* CK1056 ; *Saliniramus fredriksonii* HL-109 T, *Coralimargarita sinensis* WN38 et *Marinicauda pacifica* P-1 km-3.

Nos travaux ont également permis aussi de bien cerner la composition biochimique de la *Limnospira* sp. *ALgLouSa11* cultivée sur le milieu Hiri et commercialisée à l'état sec. Il s'avère qu'elle présente un bon profil nutritionnel tant qu'aliment à vocation protéinique, avec des teneurs de l'ordre de 44,37 % \pm 0,78, riche en glucides avec des taux de 33,43 % \pm 1,77, assez riche en minéraux (8,66 % \pm 0,09) dont 933.3 mg/Kg \pm 23.09 de Calcium, 6230 mg/Kg \pm 20.81 de Magnésium et 116.6 mg/Kg \pm 48.35 de fer.

Elle est cependant assez pauvre en gras 0.26 % \pm 0.05.

La *L. sp. ALgLouSa11* est riche en phytonutriments, la teneur en chlorophylles est de 12 mg/g pour la chlorophylle a et de 8,698 mg/g pour la chlorophylle b. En termes de phycobiliprotéines, nous notons la présence de 7.89% de C-PC, 6.26 % de A-PC et 1.43 % de PE.

Tous les résultats, portant sur la composition biochimique de la cyanobactérie étudiée, permettent de lui conférer un grand intérêt nutritionnel et thérapeutique.

Les résultats de l'optimisation des conditions d'extraction de la phycocyanine par solutions salines en utilisant la méthodologie de surface de réponse, ont montré que le temps de macération a le plus grand impact, suivi de la concentration en cyanobactérie. L'effet combiné du temps de macération avec d'autres facteurs est également apparu comme important.

Les courbes obtenues ont montré une augmentation significative de la concentration de phycocyanine avec le temps de macération et une légère courbure quadratique pour la concentration initiale en *Limnospira* sp. *ALgLouSa11*.

L'étude des propriétés structurantes par BET de la phycocyanine a montré qu'elle présente une surface spécifique de 3.4845 m²/g \pm 0.346 avec une capacité moyenne d'adsorption de C = 8.138.

La phycocyanine en solution, se comporte comme un fluide non-newtonien et perd sa viscosité à environ 30°C.

La détermination de la tension interfaciale phycocyanine/air, phycocyanine/huile et leurs *modulus* ont montré que la PC ait des propriétés émulsifiantes meilleures comparativement aux propriétés moussantes.

L'analyse rhéologique indique que la phycocyanine est rhéofluidifiante et peut être classée en tant qu'un pseudoplastique.

Notre travail ouvre plusieurs perspectives de valorisation, Il serait nécessaire de procéder à la purification de la *Limnospira sp. AlgLouSal1*, pour avoir une culture axénique. Il serait nécessaire de tester différents milieux de culture pour éviter une éventuelle toxicité par les métaux lourds ou éventuellement pour favoriser la production de certains nutriments essentiels, ce qui peut constituer une alternatives alimentaire durable et jouer un rôle crucial dans la sécurité alimentaire ; d'identifier les différentes fractions protéiniques ou même peptidiques existantes dans la phycocyanine extraite et d'étudier l'effet d'autres facteurs sur le rendement d'extraction de la PC et sur sa pureté aussi. Il serait aussi intéressant d'étudier l'optimisation par RSM de la purification de la phycocyanine. Une dernière perspective est d'optimiser les qualités fonctionnelles et structurantes de la phycocyanine.

Références bibliographiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Sessions, A.L., Doughty, D.M., Welander, P.V., Summons, R.E. and Newman, D.K., “The continuing puzzle of the great oxidation event”, *Current Biology*, V. 19, (2009), 567 – 574.
- [2] Sumner, D.Y., Hawes, I., Mackey, T.J., Jungblut, A.D. and Doran, P.T., “Antarctic microbial mats: a modern analog for Archean lacustrine oxygen oases”, *Geology*, V. 43, (2015), 887 – 890.
- [3] Tefera, G., Hailu, D. et Tsegaye, Z. “Importance of *Arthrospira* *Spirulina* in Sustainable Development”. *Int. J. Curr. Trend. Pharmacobiol. Med. Sci.*, V 1, n° 2, (2016), 60–68.
- [4] Iltis, A., “Algues des eaux natronées du Kanem (Tchad)”, *Cah. O.R.S.T.O.M., Hydrobiol.*, V. 7, N° 1, (1973), 25–54.
- [5] Ciferri, O., “*Spirulina* the edible microorganism”, *Microbiol. Rev.*, V. 47, N° 4, (1983), 551–578.
- [6] Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J. R., “Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach”, *Preslia*, V. 86, (2014), 295 - 335.
- [7] Marty, F. et Busson, F., “Données cytologiques sur deux Cyanophycées: *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler et *Spirulina geitleri* J. de Toni, Schweiz. Z”, *Hydrology*, V. 32 (1970) 559 – 565.
- [8] Benbelkhir, F.Z., et Medjekal, S., “Microalgal carotenoids: a promising alternative to synthetic dyes”, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, V. 66, (2022), 102823.
- [9] Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B.A., Belay, A. and Wilmotte, A., “*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*, V. 175, N° 2, (1999), 213 - 222.
- [10] Baurain, D., Renquin, L., Grubisic, S., Scheldeman, P., Belay, A. and Wilmotte, A., “Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of

- Arthrospira* (“Spirulina”) (Cyanophyceae, Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year-old dried samples from Africa”, *Journal of Phycology*, V. 38, (2002), 384 – 393.
- [11] Manen, J. F. et Falquet, J., "The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer“, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, V. 52, (2002), 861 - 867.
- [12] Muhling, M., Somerfield, P.J., Harris, N., Belay, A. and Whitton, B.A., "Phenotypic analysis of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains (cyanobacteria)”, *Phycologia*, V. 45, (2006), 148 - 157.
- [13] Miklaszewska, M., Waleron, M., Morin, N., Calusinska, M., Wilmotte, A., De Marsac, N.T., Rippka, R. and Waleron K., "Elucidation of the gas vesicle gene clusters in cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanophyta) and correlation with ITS phylogeny”, *Eur. J. Phycol.* V. 47, (2012), 233 - 244.
- [14] Papapanagiotou, G. et Gkelis, S., "Taxonomic revision of commercially used *Arthrospira* (Cyanobacteria) strains: a polyphasic approach”, *European Journal of Phycology* V. 54, (2019), 595 – 608.
- [15] Comte, K., Coursin, T., and Carre-Mlouka, A., “A new genotype in the genus (*Oscillatoriales, Cyanobacteria*) revealed by a mosaic-like structure of the 16S-23SrRNA intergenic spacer region in strain PCC 9901”, *Phycologia*, V. 52, (2013) 333 – 337.
- [16] Nowicka-Krawczyk, P., Muhlsteinova, R. and Hauer T., “Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria)”, *Scientific Reports*, V. 9, (2019), p. 694.
- [17] Hoseini, S., Khosravi-Darani, K. et Mozafari, M., “Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae”, *Mini Rev Med Chem*, V. 13, (2013), 1231–1237.
- [18] Sagara, T., Nishibori, N., Kishibuchi, R., Itoh, M. and Morita K., “Non protein components of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protect PC12 cells against iron-evoked neurotoxic injury”, *Journal of Applied Phycology*, V. 27, (2015), 849 - 855.

- [19] Wang Z. et Zhang X., “Characterization and antitumor activity of protein hydrolysates from *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) using two-step hydrolysis. *J Appl Phycol*. 28, (2016), 3379–3385.
- [20] Xia, D., Liu, B., Xin, W., Liu, T., Sun, J., Liu, N., Qin, S. et Du, Z., “Protective effects of C-phycoerythrin on alcohol-induced subacute liver injury in mice”, *J Appl Phycol*, V. 28, (2016), 765–772.
- [21] Wikfors, G. H. et Ohno, M., “Impact of algal research in aquaculture”, *Journal of Phycology*, V. 37, n° 6, (2002), 968 - 974.
- [22] Koru, E., “Earth food *Spirulina* (*Arthrospira*): production and quality standards, chapter in book Food Additive”, *Food, InTech*, (2012), 191–202 pp.
- [23] Ma Z.L., F. Ahmed, B. Yuan, W. Zhang, Fresh living *Arthrospira* as dietary supplements: current status and challenges”, *Trends in Food Sciences and Technology*, V. 88, (2019), 439 – 444.
- [24] Kim, K.D., Hoh, Y., Ji, H., Do, B. and Lee, W. H., “Impact of light intensity, CO₂ concentration and bubble size on growth and fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* KMMCC CY-007”, *Biomass and Bioenergy*, V. 49 (2013), 181 – 187.
- [25] De Souza da Silva, S.P., Perrone, D. and Do Valle, A.F., “Optimization of *Arthrospira maxima* cultivation for biomass and protein production and biomass technological treatment to color, flavor, and aroma masking for addition to food products”, *Journal of Applied Phycology*., V. 34, (2021), 65 - 80.
- [26] Trincone, A., “Polysaccharides produced by microalgae”, in: J. Oliveira, H. Radhouani, R.L. Reis (Eds.), *Polysaccharides of Microbial Origin*, Springer International Publishing, Cham, (2021), 1 – 22.
- [27] Barros de Medeiros, V.P., Da Costa, W.K.A., D Silva, R.T., Pimentel, T.C., and Magnani M., “Microalgae as source of functional ingredients in new-generation foods: challenges, technological effects, biological activity, and regulatory issues”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V. 62 (2022), 4929 - 4950.
- [28] Li, Z.Y., Guo, S.Y. Li, L. and Cai M.Y., “Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor”, *Bioresource Technology*, V. 98, (2007), 700 – 705.
- [29] Wojtasiewicz, B. et Stoń-Egiert, J., “Bio-optical characterization of selected cyanobacteria strains present in marine and freshwater ecosystems”, *J Appl Phycol*, V. 28, (2016), 2299–2314.

- [30] Glazer, A.N., “Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal of Biological Chemistry*, V. 264, (1989), 1 - 4.
- [31] Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K., “Phycobiliprotein: Potential microalgae-derived pharmaceutical and biological reagent”, *Biochemical Engineering Journal*, V. 109, (2016), 282–296.
- [32] Chaiklahan, R., Chirasuwan, N. and Bunnag, B., “Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives”, *Process Biochemistry*, V. 47, n° 4, (2012), 659 - 664.
- [33] Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K., “Purification and characterization of c-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat”, *Protein Expression Purification*, V. 40, (2005), 248 - 255.
- [34] Cuellar-Bermudez, S.P., Iris Aguilar-Hernandez, D.L., Cardenas-Chavez, N., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M.A., Parra-Saldivar, R., “Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins”, *Microb Biotechnol*, V. 8, (2015), 190–209.
- [35] Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan, P.S., Raghavan, S. et Jayaprakash, P., “Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells”, *BMC Cancer*, V. 15, (2015), 768.
- [36] Safari, R., Raftani Amiri, Z. and Esmaeilzadeh Kenari, R “Antioxidant and antibacterial activities of C-phycocyanin from common name *Arthrospira platensis*”, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, V. 19, (2018), 1911 - 1927.
- [37] Ashaolu, T.J., Samborska, K., Lee, C.C., Tomas, M., Capanoglu, E., Tarhan, Ö., Taze, B., Jafari, S.M., “Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications”, *Int. J. Biol. Macromol.*, V.193, (2021), 2320–2331.
- [38] Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J. and Pedraza-Chaverri, J., “Nutraceutical properties of phycocyanin”, *Journal of Functional Foods*, V. 11, (2014), 375 – 392.
- [39] Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M.A., Mojica, L., “Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability”, *Algal Res.*, V. 42, (2019), 101600.
- [40] Chentir, I., Kchaou, H., Hamdi, M., Jridi, M., Li, S., Doumandji, A., and Nasri, M., “Biofunctional gelatin-based films incorporated with food grade

- phycocyanin extracted from the Saharian cyanobacterium *Arthrospira* sp.”, *Food Hydrocolloids*, V. 89, (2019), 715 - 725.
- [41] Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M. and Abbaspourrad, A., “Extraction of phycocyanin-A natural blue colorant from dried *spirulina* biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques”, *Journal of Food Sciences*, V. 85, N° 3, (Mars 2020), 727 - 735.
- [42] Batool, F., Adeel, S., Azeem, M.O., Khan, A.A., Bhatti, I.A., Ghaffar, A. and Iqbal, N., “Gamma radiations induced improvement in dyeing properties and colour fastness of cotton fabrics dyed with chicken gizzard leaves extracts”, *Radiation Physics and Chemistry*, V. 89, (2013), 33 - 37.
- [43] Mir, R.A., Adeel, S., Azeem, M., Batool, F., Khan, A.A., Gul, S., Iqbal, N., “Green algae, *Cladophora glomerata* L. based natural colourants: dyeing optimization and mordanting for textile processing”, *J Appl Phycol.*, V. 31, N° 4, (2019), 2541–2546.
- [44] Moraes, C., Sala, L., Cerveira, G., Kalil, S., “C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, V. 28, (2011), 45–49.
- [45] Aouir, A., “Extraction des composés bioactifs de la spiruline par le champ électrique pulsé”, Thèse de doctorat, École nationale supérieure agronomique – Alger, (2017), 184 p.
- [46] Khandual, S., Sanchez, E.O.L., Andrews, H.E. *et al.* Phycocyanin content and nutritional profile of *Arthrospira platensis* from Mexico: efficient extraction process and stability evaluation of phycocyanin. *BMC Chemistry* V. 15, N° 24, (2021).
- [47] Teixeira, I.R., Marczak, L.D.F., Mercali, G.D. and Jaeschke, D.P., “Saline extraction assisted by ultrasound: a method to obtain purified phycocyanin”, *Journal of Biotechnology*, V. 348, (Mars 2024), 38 - 44.
- [48] Aouir, A., Amiali, M., Bitam, A., Benchabane, A., Raghavan, V.G., “Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA,” *Journal of Food Measurement and Characterization*, V. 11, (2017), 913–923.
- [49] Lafri I., Jemni M., Bensehaila S. et Boutekrabort L. Evaluation Des Méthodes D’extraction De La Phycocyanine Et Son Rendement á Partir De *Spirulina Platensis*”, *Agrobiologia*, V. 7, N° 2, (2017), 623-634

- [50] Chentir, I., Hamdi, M., Doumandji, A., HadjSadok, A., Ben Ouada, H., Nasri, M., 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*, V. 105, N° 2, (2017), 1412–1420.
- [51] Chentir, I., Hamdi M., Li S., Doumandji A., Markou, G., Nasri, M., “Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain”, *Algal Research*, V. 35, (2018), 395-406.
- [52] Schopf, J. W., “The development and diversification of Precambrian life”., – *Origin of Life* 5, (1974), 119 - 135.
- [53] Knoll, A.H., “Cyanobacteria and earth history. – In: Herrero A. et Flores E. (eds), *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*, Caister Academic Press, Norfolk, (2008), 1 - 19.
- [54] Balloni, W., Tomasselli, S., Giovannetti, M.C. and Margheri, M.C., "Biologia fondamentale del genera *Spirulina*", in Materassi R. (ed) Prospective della coltura di *Spirulina* in Italia. Consilio Nazionale delle Ricerche, Rome, (1980), 49 - 85.
- [55] Masojídek, J., Koblizek, M., and Torzillo, G., “Photosynthesis in Microalgae. Handbook of Microalgal Culture”, *Biotechnology and Applied Phycology*, (2013) 20 - 39.
- [56] MacColl, R., “Cyanobacterial Phycobilisomes”, *Journal of Structural Biology*, V. 124, (1998), 311 - 334.
- [57] Pagels, F., Catarina, G.A., Amaro, H.M., Kijjoa, A. and Vasconcelos, V., “Phycobiliproteins from cyanobacteria, Chemistry and biotechnological applications”, *Biotechnology Advances*, V. 37, n° 3, (2019), 422 - 443.
- [58] Wildman, R.B. et Bowen, C.C., “Phycobilisomes in blue-green algae”. *J Bacteriol.*, V. 117, n° 2, (Fevrier 1974), 866 - 881.
- [59] Mosulishvili, L.M., Kirkesali, E.I., Belokobylsky, A.I., Khizanishvili, A.I., Frontasyeva, M.V., Pavlov, S.S. and Gundorina, S.F., "Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*". *J. Pharmaceut. Biomed.*, Vol. 30, N° 1, (2002), 87 - 97.
- [60] Lavoie, I., Laurion, I., Warren, A. and Vincent, W.F., “Les fleurs d’eau de cyanobactéries”, revue de littérature, INRS rapport n°. 916, (2007), p. 124.
- [61] Fox, R.D., “La spiruline: technique, pratique et promesse”, Edisud, (1999).

- [62] Ciferri, O., et Tiboni, O., “The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*”, Annual Review of Microbiology, V. 39, (1985), 503 - 526.
- [63] Castenholz, R.W., Rippka, R., Herdman, M., Wilmotte, A., “Form-*Arthrospira*, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria”, (2015), 1 - 3.
- [64] Jourdan, J.P., “Cultivez votre spiruline”, manuel de culture artisanale de la spiruline, (2013).
- [65] Li, J.N. et Wang, Z.P., “Classification with RAPD marker in *Spirulina*”, Oceanol. Limnol. Sin., Vol. 33, (2002), 203 - 208.
- [66] Yang, L.Y., Wang, Z.P., Cao, X.C., Chen, X.Y. and Xu B.J., "cpc HID operon as a new tool for classification of and identification of *Arthrospira platensis* strains”, Acta. Microbiol. Sin., V. 46,n° 6, (2006), 1003 - 1006.
- [67] Zhou H.-N., Xie Y.-G., Wang Z.-P., Shao B., Liu X.-Y., Yu J.-X. et Chen Z.-Y., “Evaluation of arthrospira (*spirulina*) *platensis* production trait using cpchid operon”, Pak. J. Bot., Vol. 45, n° 2, (2013), 687-694.
- [68] Hicks, M., Tran-Dao, T.K., Mulrone, L., Bernick, D.L., “*De-novo* assembly of *Limnospira fusiformis* using ultra-long reads”. Frontiers in Microbiology, V. 12, (April 2021), 657995.
- [69] Komárek, J., Anagnostidis, K., Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/2: Cyanoprokaryota, Bd. 2 / Part 2: Oscillatoriales, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2005).
- [70] Sili, C., Torzillo, G., and Vonshak, A., “*Arthrospira (Spirulina)*. Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time”, Avigad, (2013), 677 - 705.
- [71] Mühling, M., Harris, N., Belay, A. and Whitton, B.A., “Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*”, Journal of Phycology, V. 39, (2003), 360 - 367.
- [72] Voronichin, N. N. K., “biologii mineralizovanykh vodojemov Kulundinskoj stepi. Trudy Soveta Izucheniю Prirodných Resursov”, Ser. Sibirsk. V. 8, (1934), 177 – 183.
- [73] Zarrouk, C., "Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler*”, Thèse Doctorat Faculté des Sciences, Université de Paris, (1966).

- [74] Lounici, S., "Caractérisation de la spiruline de Tamanrasset *spirulina htam*, optimisation de ses conditions de culture et application industrielle", Mémoire de magister, Université de Blida, (2010).
- [75] Vonshak, A., "*Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology Cell biology an biotechnology", Taylor & Francis LTD, (1997).
- [76] Léonard, J. et Compère, P., "*Spirulina platensis* (Gom.) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en protéines", Bulletin du Jardin botanique National de Belgique., V. 37, n°1, (1967), Suppl.23.
- [77] Falquet, J. et Hurni, J.P., "Spiruline, Aspects Nutritionnels", Antenna Technologies, (2006), 41 p.
- [78] Dillon, J.C. et Phan P.A., "Spirulina as a source of proteins in human nutrition" Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, V. 12, n°spécial, (1993), 103 - 107.
- [79] Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, P., Kabke, K. and Weber, A., "Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology". World Journal of Microbiology and Biotechnology, V. 18, (2002), 603 - 607.
- [80] Bujard, E.U., Braco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., Wuhrmann, J.J. and Clément, G., "Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations", 3rd.international Congress of Food Science and Technology, Washington, (1970).
- [81] Clément, G., Giddey, C. and Menzi, R., "Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*". Journal of the Science of Food and Agriculture, V. 18, (1967), 497 - 501.
- [82] Clément, G., "Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*", Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, V. 29, (1975), 477 - 487.
- [83] Jacquet, J., "Utilisations biologiques des Spirulines", . Bull. Acad. Vét. XLVII, (1974).
- [84] Borowitzka, M.A. et Borowitzka. L.J., "Micro-Algal biotechnology", New York: Cambridge University Press, (1988), 477 p.
- [85] Shekharam, K.M., Venkataraman, L.V. et Salimath, P.V., "Carbohydrate Composition and Characterization of Two Unusual Sugars from the Blue Green Alga *Spirulina-Platensis*", Phytochemistry, V. 26, (1987), 2267 - 2270.

- [86] Lee, J.B., Hayashi, T., Hayashi, K., Sankawa, U., Maeda, M., Nemoto, T. and Nakanishi, H., "Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*", Journal of natural products, V. 61, n° 9, (1998), 1101 - 1104.
- [87] Lee, J.B., Hayashi, T., Hayashi, K. and Sankawa, U., "Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry", Journal of Natural Products, V. 63, N° 1, (2000), 136 -138.
- [88] Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, H.N., ElSohly, M.A. and Pasco, D.S., "Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*". Planta Medica, V. 67, (2001), 737 - 742.
- [89] Lobner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K. and Nielsen, C.H., "Enhancement of Human Adaptive Immune Responses by Administration of a High-Molecular-Weight Polysaccharide Extract from the Cyanobacterium *Arthrospira platensis*", Journal of Medicinal Food, V. 11, n° 2, (2008), 313 - 322.
- [90] Sautier, C. et Trémolières, J., "Valeur alimentaire des algues spirulines chez l'homme", Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, V. 29, (1975), 517 - 533.
- [91] Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H. and Imbs, A.B., "Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*", Food Chemistry, V. 77, (2002), 9 – 13.
- [92] Otlés, S. et Pire, R., "Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species", Journal of AOAC International, V. 84, n° 6, (2001), 1708 - 1714.
- [93] Hwang, D., "Essential fatty acids and immune response", Faseb Journals, V. 3, (1989), 2052 - 2061.
- [94] Kiet, P.Q. et Durand-Chastel, H., "Spirulina rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids", In Charpy et al. (ed.) International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development, (2006), 111 - 117.
- [95] Donaldson, M.S., "Metabolic vitamin B12 status on a mostly raw vegan diet with follow-up using tablets, nutritional yeast, or probiotic supplements", Annals of Nutrition and Metabolism, V. 44, (2000), 229 - 234.
- [96] Vincenzini, M, Ferrari, F., Margheri, M.O. and Florenzano, G., "Quinonoid and tocopherol levels in *Spirulina platensis*", Microbiologica, V. 3, (1980), 131 - 136.

- [97] Palla, J.C. and Busson, F., “Etude des caroténoïdes de *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler (Cyanophycées)”, C.R. Acad. Sc. Paris, T.269, (1969), 1704 - 1707.
- [98] Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A. and Von Holst, C., “Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach”, Journal of Chromatography A 912, (2001), 61 – 71.
- [99] Campanella, L., Crescentini, G. and Avino, P., “Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina Analusis*”, V. 27, (1999), 533 – 540.
- [100] Cogne, G., Lehmann, B., Dussap, C.G. and Gros, J.B., “Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* under photoautotrophic conditions”, Culture medium optimization Biotechnology and Bioengineering, V. 81, n° 5, (2002), 588 – 593.
- [101] Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.S., Yang, F. and Bai, Y., “Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose”, Bioresource Technology, V. 97, (2006), 2260 - 2265.
- [102] Singh, Y., et Kumar, H.D., “Adaptation of a strain of *Spirulina platensis* to grow in cobalt- and iodine-enriched media”, J-Appl-Bacteriol., V. 76, N°2, (1994), 149 - 154.
- [103] Lison, D., De Boeck, M., Verougstraete, V. and Kirsch-Volders, M., “Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds”, Occupational and Environmental Medicine, V. 58, n°10, (2001), 619 - 625.
- [104] Belay A., “Mass culture of *Spirulina* outdoors: the Earthrise Farms experience”. In Vonshak, A. (ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, London: Taylor & Francis, (1997). 131-158 pp.
- [105] Jeyaprakash, K. et Chinnaswamy, P., “Effect of *Spirulina* and Liv-52 on cadmium induced toxicity in albino rats”, Indian J. Exp. Biol., V. 43, (2005), 773 – 781.
- [106] Misbahuddin, M., Islam, A.Z., Khandker, S., Ifthaker-Al-Mahmud, I., Islam, N. and Anjumanara. “Efficacy of *spirulina* extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study”, Clinical Toxicology (Phila), V. 44, n° 2, (2006), 135 - 41.

- [107] Saha, S.K., Misbahuddin, M., Khatu, R., and Mammum, I.R., “Effect of hexane extract of *Spirulina* in the removal of arsenic from isolated liver tissues of rat”, *Mymensingh. Medium Journal*, V. 14, n° 2, (2005), 191 – 195.
- [108] Man, L., “Complementary and alternative medicine for allergic rhinitis”, *Current Opinion in Otolaryngology and Head Neck Surgery.*, n° 17, (2009), 226 – 231.
- [109] Biney, C., Amuzu, A.T., Calamari, D., Kaba, N., Mbome, I.L., Naeve, H., Ochumba, O., Osibanjo, O., Radegonde V. and Saad M.A.H., “Etude des métaux lourds. Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome, © FAO 1994. M-45.
- [110] Kim, H.M., Lee, E.H., Cho, H.H. and Moon, Y.H., “Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *spirulina*”; *Biochemic Pharmacology*, V. 55, (1998), 1071 – 1076.
- [111] Pétrus, M., Assih, L., Horen, B., Lapebie, P., Trigatti, A., Culerrier, R., Barre, A., Rouge, P. et Dutau, G., “Premier cas d’allergie à la spiruline chez un enfant de treize ans”, *Revue française d’allergologie*, V. 50, (2010), 470 – 472.
- [112] Panjjar, N., Mishra, S., Yadav, A.N. and Verma P., “Functional foods from Cyanobacteria,” in *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*. eds. Gupta V. K., Treichel H., Shapaval V., de Oliveira L. A., Tuohy M. G., (2017), 21 – 37.
- [113] Arad, S. et Yaron, A., “Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics”, *Trends Food Sciences Technology*, V. 3, (1992), 92 – 97.
- [114] Ruiz, G., “Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d’algues rouges”, Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges, (2005), 256 p.
- [115] Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R. and Mishra, S., “ Microalgal Rainbow Colours for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications”, In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K. (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi, 2015, 777 – 791.
- [116] Kumar, D., Dhar, D.W., Pabbi, S., Kumar, N. and Walia, S., “Extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (CCC540)”, *Indian Journal Plant Physiology*, (2014), V. 19, 184 – 188.
- [117] Singh, N.K., Sonani, R.R., Prasad Rastogi, R. and Madamwar, D., “The phycobilisomes : an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria ”,

- EXCLI Journal, V. 14, (2015), 268 – 289.
- [118] Eriksen, N.T., “Production of phycocyanin– a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine”, *Applied Microbiological Biotechnologies*, (2008), V. 80, 1 – 14.
- [119] Kannaujiya, V.K. et Sinha, R.P., “Thermokinetic stability of phycocyanin and phy coerythrin in food-grade preservatives”, *Journal Applied Phycology*, V. 28, (2016). 1063 – 1070.
- [120] Patil, G., et Raghavarao, K.S.M.S., “Aqueous two-phase extraction for purification of C-phycocyanin”, *Biochem Eng J.*, V. 34, (2007), 156.
- [121] Vernès, L., Granvillain, P., Chemat, F. and Vian, M., “Phycocyanin from *Arthrospira Platensis*. Production, Extraction and Analysis”, *Current Biotechnology*, V. 5, n° 999, (2015), 1 - 1.
- [122] Boussiba, S., Richmond, A.E., “Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*”, *Archives of Microbiology*, V.120, (1979), 155 - 159.
- [123] Sinha, R., Lebert, M., Kumar, A., Kumar, H. and Häder, D.P., “Spectroscopic and biochemical analyses of UV effects on phycobiliproteins of *Anabaena* sp. and *Nostocarmium*”, *Botanic Acta*, V. 180, (1995), 87 - 92.
- [124] Ferraro, G., Imbimbo, P., Marseglia, A., Lucignano, R., Maria Monti, D. and Merlino, A., “X-ray structure of C-phycocyanin from *Galdieria phlegrea*: Determinants of thermostability and comparison with a C-phycocyanin in the entire phycobilisome”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, V. 1861, n° 9, (2020), 148236.
- [125] Glazer, A., “Phycobiliproteins—A family of valueble, widely used fluorophore”, *Journal of Applied Phycology*, V. 6, (1994), 105 - 12.
- [126] Stanek, M. et Grubmayr, K., “Protonated 2,3-dihydrobilindiones - Models for the chromophores of phycocyanin and the red-absorbing form of phytochrome”, *Chemistry - A European Journal*, V. 4, N° 9, (1998). 1653 – 1659.
- [127] Zhang, Z., Cho, S., Dadmohammadi, Y., Li, Y. and Abbaspourrad, A., “Improvement of the storage stability of C-phycocyanin in beverages by high-pressure processing”, *Food Hydrocolloids*, V. 110, (2021). p.106055.
- [128] Thomas, J.C., “L'antenne collectrice d'énergie lumineuse à phycobiliprotéines chez les Cyanobactéries, Bulletin de la Société Botanique de France”, *Actualités Botaniques*, V. 136, N° 1, (1989), 31 – 49.

- [129] Anamika, P., Sandhya, M. and Richa Pawar, P.K.G., “Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat”, *Protein Expression and Purification*, V. 40, (2005), 248 - 255.
- [130] Walter, A., Cesar de Carvalho, J., Vanete, T.S., Ana, B.B., de Faria Ghiggi, V. and Soccol, C.R., ”Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, V. 54, N° 4, (2011), 675 - 682.
- [131] Pottecher, F., “Procedé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications”, (2014). Brevets WO 2014045177 A1.
- [132] Sekar, S. et Chandramohan, M., “Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization”, *Journal Applied Phycology*, V. 20, (2008), 113 – 136.
- [133] Wyman, M., “An *in vivo* method for the estimation of phycoerythrin concentrations in marine cyanobacteria”, *Limnology and Oceanography*, V. 37, (1992), 1300 –1306.
- [134] Van Eykelenburg, C., “On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, (1977), V. 43, 89 – 99.
- [135] Deniz, I., Ozen, M.O. and Yesil-Celiktas, O., “Supercritical fluid extraction of phyco cyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells”, *Journal of Supercritical Fluids*, V. 108, (2016), 108, 13 – 18.
- [136] Duangsee, R., Phoopat, N. and Ningsanond, S., “Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* and extract stability under various pH and temperature. *Food Innovation in Asia*, V. 2, (2009), 819 – 826.
- [137] Martinez, J.M., Luengo, E., Saldana, G., Alvarez, I. and Raso, J., “C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *artrosphira platensis*”, *Food Research International*, V. 99, (2016), 1042 – 1047.
- [138] Tavanandi, H.A., Mittal, R., Chandrasekhar, J. and Raghavarao, K.S.M.S., “Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthospira platensis*”, *Algal Research*, V. 31, (2018), 239 – 251.
- [139] Hemlata, G.P. et Fareha, B., “Studies on *Anabaena* sp. nccu-9 with special reference to phycocyanin”, *Journal of Algal Biomass Utility*, V. 2, (2011), 30 – 51.
- [140] Hardiningtyas, S.D., Setyaningsih, I. and Susila, A.R., “ Effect of ultrasonication-assisted extraction time on the profile of phycocyanin from wet biomass *Spirulina plantesis*”, Published under licence by IOP Publishing Ltd (2021).

- [141] Vinatoru, M., “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs”, *Ultrason Sonochem*, V. 8, (july 2021), 303 – 313.
- [142] Vinatoru, M., Toma, M. and Mason, T.J., “Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents”, *Advances Sonochem*. V. 5, (1999), 238.
- [143] İltter I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., Kaymak-Ertekin, F., “Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques”, *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 70, (2018), 78-88.
- [144] Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U. and Madamwar, D., “Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India”, *Process Biochemistry*, V. 41, N° 9, (2006), 2017 – 2023.
- [145] Kuhnholz, J., Glockow, T., Siebecke, V. *et al.* “Comparison of different methods for extraction of phycocyanin from the cyanobacterium *Arthrospira maxima* (Spirulina)”, *Journal of Applied Phycology*, Vol. 36, (2024), 1725 – 1735.
- [146] Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Yue, Q., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K., “Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from *Arthrospira* (Spirulina) *platensis*,” *J. Appl. Phycol.*, V. 29, (2017), 1261–1270.
- [147] Santiago-Santos, M.C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J.R.O.C, “Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. ”, *Process Biochemistry*, V. 39, n° 12, (2004), 2047 – 2052.
- [148] Vali Aftari, R., Rezaei, K., Mortazavi, A. et Bandani, A. R., “The Optimized Concentration and Purity of *Spirulina platensis* C-Phycocyanin: A Comparative Study on Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods ”, *Food processing and preservation*. V. 39, n° 6. (2015), 3080-3091.
- [149] Lauceri, R., Cavone, C., Chini Zittelli, G. *et al.* “High Purity Grade Phycocyanin Recovery by Decoupling Cell Lysis from the Pigment Extraction: an Innovative Approach”, *Food Bioprocess Technology*, V. 6, (2023), 111 – 121.
- [150] Goja, A.M., Yang, H., Cui, M. and Li, C., “Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation”, *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, V. 4, (2013), 1 - 8.
- [151] Wang, W.J., Zhang, X.L., Xu, C.B. and Cheng, H.Y., “Purification and concentration of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using aqueous two-phase

- system. Applied Mechanics and Materials, V. 138-139, (2012), 995 – 1001.
- [152] Rito-Palomares, M., Nunez, L., Amador, D., “Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*”, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, V. 76, (2001), 1273 - 1280.
- [153] Lee I., Ouk Kim Y., Park S.C., Chun J., OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 66, (2016), 1100–1103.
- [154] Colla, L. M., Furlong, E. B., & Costa, J. A. V. "Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperature and nitrogen regimes". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, V. 50, N° 1, (January 2007), 161-167.
- [155] Sungthongjeen, S., Jitpreedakorn, C., Chaiaun, S., Kriangkrai, W., Charoenthai, N. and Puttipipatkachorn S., “Stability study of blue phycocyanin from spirulina and compatibility evaluation in eye remover solution using Plackett-Burman design”, *Science, Engineering and Health Studies*, V. 17, (2023), 23050001,
- [156] Wu, H.L., Wang, G.H., Xiang, W.Z., Li, T. and He, H., “Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*”, *International Journal of Food Properties*, V. 19, n° 10, (2016). 2349 – 2362.
- [157] Ren, S., Wang, F., Cao, Y., Li, L. and Pan, T., “Study on the stability of phycocyanin”, *Journal of Henan University of Technology: Natural Science*, V. 41, n° 6, (2020), 1 – 7.
- [158] Rastogi, R. P., Sonani, R. R. and Madamwar, D., “Physico-chemical factors affecting the in vitro stability of phycobiliproteins from *Phormidium rubidum* A09DM”, *Bioresource Technology*, V. 190, (2015), 219 - 226.
- [159] Shafieiyoun, N., Jahadi, M. and Khosravi-Darani, K., “The stability of phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis* against osmotic, acid, and temperature stress conditions”, *Italian Journal of Food Science*, V. 36, N° 3, (2024). 176 - 183.
- [160] Gavrailov, G., Andonova, V.Y., Gerasimova, A.Ts., Gentscheva, G.D., Petkova, N. and Nikolova, Kr.T., “Stability of phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis* under different conditions”, *Bulgarian Chemical Communications*, V. 56, Special Issue D1, (2024), 43 – 48.

- [161] Zhao B., Zhang F., Chen Y., Wang J. Extraction by four steps' salting-out and stability of phycocyanin from fresh blue alage in Lake Chaohu[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, Vol. 10, n°. 5, (2016), 2302-2308.
- [162] Heslot, H., “L’ingénierie des protéines et ses applications”, Lavoisier Tec et Doc. Londres, 1996, 623 p.
- [163] Lounici, S., Boutekrabt, L., Doumandji, A., Salhi, S., Van Houdt, R., Leys, N., “Physiological and genomic analysis of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 isolated from Tamanrasset, Algeria”, Algal Research, Vol.81, (2024), 103569.
- [164] Morin, N., Vallaeys, T., Hendrickx, L., Natalie, L. and Wilmotte, A., “An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*”, Journal of Microbiological Methods, V. 80, (2010), 148 – 154.
- [165] Manchester K.L., “Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids”. Biotechniques, Vol. 19, n°. 2, (1995), 208-10.
- [166] Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A., “Using SPAdes de novo assembler”, Curr. Protoc. Bioinformatics, Vol. 70 (2020) e102.
- [167] Wang F., Yu, X., Cui, Y., Xu, L., Huo, S., Ding, Z., Hu, Q., Xie, W., Xiao, H., Zhang, D., “Efficient extraction of phycobiliproteins from dry biomass of *Spirulina platensis* using sodium chloride as extraction enhancer”. *Food Chem.* 406, (2023), 135005.
- [168] Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W., CheckM: “Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes”, *Genome Res.* Vol. 25, (2015), 1043–1055.
- [169] Chaumeil, P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H., “GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database”, *Bioinformatics*, Vol. 38, (2022), 5315–5316.
- [170] Asnicar F., Thomas A.M., Beghini F., Mengoni C., Manara S., Manghi P., Zhu Q., Bolzan M., Cumbo F., May U., Sanders J.G., Zolfo M., Kopylova E., Pasolli E., Knight R., Mirarab S., Huttenhower C., Segata N., “Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0”, *Nat. Commun.* Vol. 11, (2020), 2500.
- [171] T. S. Prokka: “rapid prokaryotic genome annotation”, *Bioinformatics*. Vol. 30, (2014), 2068–2069.

- [172] Russel J., Pinilla-Redondo R., Mayo-Munoz D., Shah S.A., Sorensen S.J., “CRISPRCasTyper: automated identification, annotation, and classification of CRISPR-Cas loci”, *CRISPR J* Vol. 3, (2020), 462–469.
- [173] Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D.S., “PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool”, *Nucleic Acids Res.* Vol. 44, (2016), W16–W21.
- [174] K. Blin, S. Shaw, H.E. Augustijn, Z.L. Reitz, F. Biermann, M. Alanjary, A. Fetter, B. R. Terlouw, W.W. Metcalf, E.J.N. Helfrich, G.P. van Wezel, M.H. Medema, T., Weber, “antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation”, *Nucleic Acids Res.* Vol. 51, (2023), W46–W50.
- [175] Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. t.; Smith, F., “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”. *Analytical chemistry* (1956), 28 (3), 350-356.
- [176] Van Soest P. J., 1963. “Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin”. *J. Assoc. Pfficial Agron. Chem.*, vol. 46. P.829-835.
- [177] Pinta M., “Méthodes de références pour détermination des éléments dans végétaux : Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique”, *Oléagineuse*, Vol. 28, (1973), 87- 92.
- [178] Charlot G., 1961, “Analyse quantitative minérale”. Masson et Cie edit. Paris, 1024p.
- [179] El-Sheekh M.M., Fathy A.A., “Variation of some nutritional constituents and fatty acid profiles of *Chlorella vulgaris* Beijerinck grown under auto and heterotrophic conditions. *International Journal of Botany*”, vol. 5, (2009). p. 153-159
- [180] Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R., “Detrmination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents”. *Biol.Soc. Trans.*, vol. 11, (1985). p. 591-592.
- [181] Bennett A, Bogorad L. “Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga”. *J Cell Biol.*, Vol. 58, n°. 2, (1973), 419-35.
- [182] Brul, S., Van Gerwen, S., Zwietering, M. (2007). *Modelling microorganisms in food*. Elsevier edition.

- [183] Goussarov G., Cleenwerck I., M. Mysara, N. Leys, P. Monsieurs, G. Tahon, A. Carlier, P. Vandamme, R. Van Houdt, PaSiT: a novel approach based on short-oligonucleotide frequencies for efficient bacterial identification and typing, *Bioinformatics*, Vol. 36, (2020), 2337–2344.
- [184] Misztak A.E., Waleron M., M. Furmaniak, M.M. Waleron, O. Bazhenova, M. Daroch, K.F. Waleron, Comparative genomics and physiological investigation of a new *Arthrospira/Limnospira* strain O9.13F isolated from an alkaline, winter freezing, Siberian Lake, *Cells*, Vol. 10, (2021).
- [185] M. Welker, H. von Dohren, Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (2006) 530–563.
- [186] A.M. Burja, B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J.G. Burgess, P.C. Wright, Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products, *Tetrahedron* 57 (2001) 9347–9377.
- [187] B. Blerot, L. Martinelli, C. Prunier, D. Saint-Marcoux, S. Legrand, A. Bony, L. Sarrabere, F. Gros, N. Boyer, J.C. Caissard, S. Baudino, F. Jullien, Functional analysis of four terpene synthases in rose-scented *Pelargonium* cultivars (*Pelargonium x hybridum*) and evolution of scent in the *Pelargonium* genus, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1435.
- [188] T.D. Santos, B.C.B. de Freitas, J.B. Moreira, K. Zanfonato, J.A.V. Costa, Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 37 (2016) 216–220.
- [189] S. Bhavaniramy, S. Vishnupriya, M.S. Al-Aboody, R. Vijayakumar, D. Baskaran, Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications, *Grain & Oil Science and Technology* 2 (2019) 49–55.
- [190] T. Lafarga, Effect of microalgal biomass incorporation into foods: nutritional and sensorial attributes of the end products, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 41 (2019) 101566.
- [191] Costa J.A.V., Cassuriaga A.P.A., Moraes L., Morais M.G., Biosynthesis and potential applications of terpenes produced from microalgae, *Bioresource Technology Reports*. Vol. 19, (2022), 101166.
- [192] S. Gheda, E.H.F. Abd El-Zaher, A.M. Abou-Zeid, N.A. Bedair, L. Pereira, Potential activity of *Arthrospira platensis* as antioxidant, cytotoxic and antifungal against some skin diseases: topical cream application, *Mar. Drugs* 21 (2023).

- [193] T. Yamaura, S. Tanaka, M. Tabata, Participation of phytochrome in the photoregulation of terpenoid synthesis in thyme seedlings, *Plant Cell Physiol.* 32 (1991) 603–607.
- [194] M. Gouda, Z. Huang, Y. Liu, Y. He, X. Li, Physicochemical impact of bioactive terpenes on the microalgae biomass structural characteristics, *Bioresour. Technol.* 334 (2021) 125232.
- [195] M.S. Donia, E.W. Schmidt, Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family, *Chem. Biol.* 18 (2011) 508–519.
- [196] N. Ziemert, K. Ishida, P. Quillardet, C. Bouchier, C. Hertweck, N.T. de Marsac, E. Dittmann, Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008). 1791–1797.
- [197] X. Salvatella, J.M. Caba, F. Albericio, E. Giralt, Solution structure of the antitumor candidate trunkamide A by 2D NMR and restrained simulated annealing methods, *J. Organomet. Chem.* 68 (2003) 211–215.
- [198] C. Ireland, P.J. Scheuer, Ulicyclamide and ulithiacyclamide, two new small peptides from a marine tunicate, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (2002) 5688–5691.
- [199] E.W. Schmidt, M.S. Donia, Chapter 23. Cyanobactin ribosomally synthesized peptides—a case of deep metagenome mining, in: *Methods Enzymol.* 458, 2009, pp. 575–596.
- [200] N. Leikoski, L. Liu, J. Jokela, M. Wahlsten, M. Gugger, A. Calteau, P. Permi, C. A. Kerfeld, K. Sivonen, D.P. Fewer, Genome mining expands the chemical diversity of the cyanobactin family to include highly modified linear peptides, *Chem. Biol.* 20 (2013) 1033–1043.
- [201] W. Gu, S.-H. Dong, S. Sarkar, S.K. Nair, E.W. Schmidt, Chapter four - the biochemistry and structural biology of cyanobactin pathways: enabling combinatorial biosynthesis, in: B.S. Moore (Ed.), *Methods Enzymol*, Academic Press, 2018, pp. 113–163.
- [202] T. Le, W.A. van der Donk, Mechanisms and evolution of diversity-generating RiPP biosynthesis, *Trends in Chemistry* 3 (2021) 266–278.
- [203] C.M. Czekster, Y. Ge, J.H. Naismith, Mechanisms of cyanobactin biosynthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 35 (2016) 80–88.
- [204] J. Koehnke, A.F. Bent, D. Zollman, K. Smith, W.E. Houssen, X. Zhu, G. Mann, T. Lebl, R. Scharff, S. Shirran, C.H. Botting, M. Jaspars, U. Schwarz-Linek,

- J. H. Naismith, The cyanobactin heterocyclase enzyme: a processive adenylase that operates with a defined order of reaction, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 52 (2013) 13991–13996.
- [205] J. Wang, Y. Chen, Role of the Zn(2+) motif of E1 in SUMO adenylation, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 23732–23738.
- [206] Y. Goto, Y. Ito, Y. Kato, S. Tsunoda, H. Suga, One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase, *Chem. Biol.* 21 (2014) 766–774.
- [207] F.J. Ortiz-Lopez, D. Carretero-Molina, M. Sanchez-Hidalgo, J. Martin, I. Gonzalez, F. Roman-Hurtado, M. de la Cruz, S. Garcia-Fernandez, F. Reyes, J.P. Deisinger, A. Muller, T. Schneider, O. Genilloud, Cacaoidin, first member of the new Lanthidin RiPP family, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 59 (2020) 12654–12658.
- [208] F. Roman-Hurtado, M. Sanchez-Hidalgo, J. Martin, F.J. Ortiz-Lopez, O. Genilloud, Biosynthesis and heterologous expression of Cacaoidin, the first member of the Lanthidin family of RiPPs, *Antibiotics (Basel)* 10 (2021).
- [209] J.A. McIntosh, M.S. Donia, E.W. Schmidt, Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 537–559.
- [210] P.G. Arnison, M.J. Bibb, G. Bierbaum, A.A. Bowers, T.S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D.J. Campopiano, G.L. Challis, J. Clardy, P.D. Cotter, D.J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P.C. Dorrestein, K.D. Entian, M. A. Fischbach, J.S. Garavelli, U. Goransson, C.W. Gruber, D.H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A.R. Horswill, M. Jaspars, W.L. Kelly, J. P. Klinman, O.P. Kuipers, A.J. Link, W. Liu, M.A. Marahiel, D.A. Mitchell, G. N. Moll, B.S. Moore, R. Muller, S.K. Nair, I.F. Nes, G.E. Norris, B.M. Olivera, H. Onaka, M.L. Patchett, J. Piel, M.J. Reaney, S. Rebuffat, R.P. Ross, H.G. Sahl, E. W. Schmidt, M.E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R. D. Sussmuth, J.R. Tagg, G.L. Tang, A.W. Truman, J.C. Vederas, C.T. Walsh, J. D. Walton, S.C. Wenzel, J.M. Willey, W.A. van der Donk, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, *Nat. Prod. Rep.* 30 (2013) 108–160.
- [211] H. Liang, I.J. Lopez, M. Sanchez-Hidalgo, O. Genilloud, W.A. van der Donk, Mechanistic studies on dehydration in class V lanthipeptides, *ACS Chem. Biol.* 17 (2022) 2519–2527.

- [212] Feng, X., Zou, Q.H., Zhang, X.Y., Ye, M.Q., Du, Z.J., “*Oceanipulchritudo coccooides* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment within the family *Puniceicoccaceae*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V.70, N° 11, (2020), 5654–5664.
- [213] Cole, J.K., Morton, B.R., Cardamone, H.C., Lake, H.R., Dohnalkova, A.C., Kim, Y.M., Kyle, J.E., Maezato, Y., Dana, K.L., Metz, T.O., Romine, M.F., Nelson, W.C., Lindemann, S.R., “*Salinivirga fredricksonii* gen. nov., sp. nov., a heterotrophic halophile isolated from a photosynthetic mat, a member of a novel lineage (*Salinarimonadaceae* fam. nov.) within the order *Rhizobiales*, and reclassification of the genus *Salinarimonas* into *Salinarimonadaceae*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V.68, N° 5, (2018), 1591–1598.
- [214] Yoon, J., Yasumoto-Hirose, M., Katsuta, A., Sekiguchi, H., Matsuda, S., Kasai, H., Yokota, A., “*Coralimargarita akajimensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the phylum ‘*Verrucomicrobia*’ isolated from seawater in Japan”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 57, N° 5, (May 2007), 959–963.
- [215] Zhou, L.Y., Wang, N.N., Mu, D.S., Liu, Y., Du, Z.J., “*Coralimargarita sinensis* sp. nov., isolated from a marine solar saltern”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 69, N° 3, (Mars 2019), 701–707.
- [216] Zhang, X.Y., Li, G.W., Wang, C., Zhang, Y.J., Xu, X.W., Li, H., Liu, A., Liu, C., Xie, B.B., Qin, Q.L., Xu, Z., Chen, X.L., Cheng, Z., Zhang, Y.Z., “*Marinicauda pacifica* gen. nov., sp. nov., a prosthecate alphaproteobacterium of the family *Hyphomonadaceae* isolated from deep seawater”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, V. 63, (2012).
- [217] Vaara T., M. Vaara, S. Niemela, 1979, Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria, *Appl Environ Microbiol*, 38, pp. 1011–1014.
- [218] Rippka R., 1988, Isolation and purification of cyanobacteria, *Methods Enzymol*, 167, pp. 3–27.
- [219] Castenholz R. W., 1988, Culturing methods for cyanobacteria, *Methods Enzymol*, 167, pp. 68–93.
- [220] Choi G-G., M-S. Bae, C.-Y. Ahn, H.-M. Oh, 2007, Induction of axenic culture of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* based on antibiotic sensitivity of

- contaminating bacteria, Springer Science + Business Media B.V. 2007, 30, pp. 87–92.
- [221] Kim J.-S., Y-H Park, B.-D. Yoon, H.-M. Oh, 1999, Establishment of axenic cultures of *Anabeana flos-aquae* and *Aphanothece nidulans* (cyanobacteria) by lysozyme treatment, *J Phycol*, 35, pp. 865–869.
- [222] Vázquez G. – Martínez, M. H. Rodriguez, F. Hernández-Hernández, J.E. Ibarra, 2004, Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*, *Journal of Microbiological Methods*, 57, pp. 115–121.
- [223] Choi GG, Bae MS, Ahn CY, Oh HM. Induction of axenic culture of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. *Biotechnol Lett.*, Vol.30, n° 1, (2008), 87-92.
- [224] Vonshak A., Boussiba S., Abeliovich A. et Richmond A., "Production of *Spirulina* biomass: Maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnology and bioengineering*. 25. (1983), 341-9.
- [225] Moreno, I. M., Maraver, J., Aguete, E. C., Leao, M., Gago-Martínez, A., and Cameán, A. M. "Decomposition of microcystin-LR, microcystin-RR, and microcystin-YR in water samples submitted to in vitro dissolution tests. *J. Agric. Food Chem.* 52, (2004), 5933–5938.
- [226] Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., González, H., Moret, J., Naranjo, L., "A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, V. 27, N° 5, (May 2011), 1045–1053.
- [227] Roy-Lachapelle, A., Sollicic, M., Bouchard, M. F., and Sauvé, S. "Detection of Cyanotoxins in algae dietary supplements. *Toxins* 9: (2017), 76.
- [228] Borowitzka, M. A. "Chapter 3 - Biology of microalgae," in *Microalgae in Health and Disease Prevention*, eds I. A. Levine and J. Fleurence (Cambridge, MA: Academic Press), (2018). 23–72.
- [229] Khong, N. M. H., Khaw, Y. S., Nazarudin, M. F., and Yusoff, F. M., "Microcystis aeruginosa grown in different defined media leads to different cultivable heterotrophic bacteria composition that could influence cyanobacterial morphological characteristics and growth properties. *bioRxiv* (2019).

- [230] Tomaselli, L., “Morphology, ultrastructure and taxonomy. In: *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology”, Vonshak, A., Ed., (1997), 1–15 pp. Taylor and Francis, London, UK.
- [231] Espirard, E., “Introduction à la transformation industrielle des fruits”. Ed. Tec et Doc Lavoisier, vol. 1, (2002), 360 p.
- [232] Becker, E.W., “Microalgae biotechnology and microbiology”. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press, (1995), 293 p.
- [233] Pikaar, I., Matassa, S., Rabaey, K., Bodirsky, B.L., Popp, A., Herrero, M., Verstraete, W., “Microbes and the Next Nitrogen Revolution”. *Environmental Science & Technology*, V.51, N°13, (July 2017), 7297–7303.
- [234] Becker, E.W. “Micro-algae as a source of protein”. *Biotechnol. Adv.*, V. 25, (2007), 207–210.
- [235] Priyanka, S.; Varsha, R.; Verma, R.; Ayenampudi, S.B.. “Spirulina: A spotlight on its nutraceutical properties and food processing applications”. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, V. 12, (2023), e4785.
- [236] Masten Rutar, J.; Jagodic Hudobivnik, M.; Nečemer, M.; Vogel Mikuš, K.; Arčon, I.; Ogrinc, N., “Nutritional quality and safety of the Spirulina dietary supplements sold on the Slovenian market”. *Foods*, V. 11, (2022), 849.
- [237] Becker EW., “Microalgae for human and animal nutrition”. In: Richmond A, Hu Q (eds) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, (2013) 461–503 pp.
- [238] Lupatini, A.L.; Colla, L.M.; Canan, C.; Colla, E.. “Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source”. *J. Sci. Food Agric.*, V. 97, (2017), 724–732.
- [239] Quillet M., “Research on carbohydrate substances produced by Spirulina”. *Ann. Nutr. Alim.*, V. 29, (1975). 553-561.
- [240] Sinetova MA, Kupriyanova EV, Los DA., “Spirulina/Arthrospira/Limnospira—Three Names of the Single Organism”. *Foods*, V. 13, N° 17, (2024), 2762.
- [241] Babadzhanov, A., Abdusamatova, N., Yusupova, F., Faizullaeva, N., Mezhlumyan, L., and Malikova, M., “Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan,” *Chemistry of Natural Compounds*, V. 40, N° 3, (2004), 276–279.

- [242] Tokus,Oglu Ö., Ünal M.K., Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of food science*, vol. 68, n° 4, (2003). p.1144-1148.
- [243] Markou, G., Kougia, E., Arapoglou, D., Chentir, I., Andreou, V., Tzovenis, I., “Production of *Arthrospira platensis*: Effects on Growth and Biochemical Composition of Long-Term Acclimatization at Different Salinities”. *Bioengineering*, V. 10, N° 2, (February 2023), 233.
- [244] Hadson, B.J.F.; Karis, I.G. (1974). “Lipids of the alga *Spirulina*”. *J. Sci. Food Agric.*, V. 25, 759–763.
- [245] Pascaud, M., Doumenge, F., Durand-Chastel, H. et Toulemont, A. “The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response”. *Bull. Inst. océanogr. SNS12*, (1993), 49-57.
- [246] Shabana K.A., Arabi M.S., “*Spirulina* - an overview”. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, V. 4, N° 3, (2012), 0975-1491.
- [247] Bensehaila S, Doumandji A, Boutekrabt L, Manafikhi H, Peluso I, Bensehaila K, Kouache A et Bensehaila A. “The nutritional quality of *Spirulina platensis* of Tamenrasset, Algeria”. *Afr. J. Biotechnol.*, V. 14, N° 19, (2015), 1649-1654.
- [248] Tabutin, I., Gouesin, P. Y., & Mollo, P. "La spiruline contre la malnutrition". Madurai, India, (April 2002).
- [249] Al-Homaidan, A.A., “Heavy Metal Levels in Saudi Arabian *Spirulina*,” *Pakistan Journal of Biological Sciences*, V. 9, N° 14, (2006), 2693–2695.
- [250] Sguera, S., “*Spirulina platensis* et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques”. Diplôme d’État de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy, (2008), 162 p.
- [251] Kumar M., Kulshreshtha J., Singh G.P., Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, (2011). p.1128-1135.
- [252] Kent, M., Welladsen, H.M., Mangott, A., Li, Y.,. “Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements”. *PLoS ONE*, V. 10, N° 2, (February 2015). e0118985.
- [253] Capelli, B., Cysewski, G.R., “*Potential health benefits of Spirulina microalgae. A review of the existing literature*”. *Nutrafoods*, V.9, N° 2, (April 2010), 19–26.

- [254] Pierlovisi, C.,. "L'homme et la spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques". Thèse de doctorat, Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, (2007), 162 p.
- [255] Bogorad I. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol*, Vol. 26, (1975), 369-401.
- [256] Abd El-Baky, H. H. "Blue green alga *Spirulina sp.* and its inhibitory effect on growth. Ehrlich ascites carcinoma cells". *Journal of Medical Sciences*, V. 3, (2003), 314-324.
- [257] Szalontai, B., Gombos, Z., Csizmadia, V., Bagyinka, C., & Lutz, M. "Structure and interactions of phycocyanobilin chromophores in phycocyanin and allophycocyanin from an analysis of their resonance Raman spectra". *Biochemistry*, V. 33, N° 39, (September 1994), 11823–11832.
- [258] Chen, H. W., Yang, T. S., Chen, M. J., Chang, Y. C., et al. "Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas". *Process Biochemistry*, V. 49, (July 2014), 1337-1344.
- [259] Grumezescu, A.M., Holban, A.M., *Microbial Production of Food Ingredients and Additives* Vol. 5. (2017). Academic Press edition.
- [260] Singh, B., Raza, K., Beg, S., Developing optimized drug products employing designed experiments. *Chem Ind Dig*, Vol. 23, (2013), 70–76.
- [261] Minh, N., Chari, V., Yanis C., Laurent D. et Thomas P., Etude comparative des méthodes d'extraction de la phycocyanine de *Spirulina platensis*. (2014).
- [262] Tavanandi, H.A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., Raghavarao, K.S.M.S., Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Res.* Vol.31, (2018), 239–251.
- [263] Soria, A.C., Villamiel, M.,. "Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review". *Trends Food Sci. Technol.* V. 21, (2010), 323–331.
- [264] Vern`es, L., Abert-Vian, M., El Ma`ataoui, M., Tao, Y., Bornard, I., Chemat, F.,. "Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects". *Ultrason. Sonochem.* Vol. 54, (2019), 48–60.

-
- [265] Zhong, Y., Sun, S., Dai, T., Zhang, H., Wu, J., Gong, E. S., “Phycocyanin-chitosan complex stabilized emulsion: Preparation, characteristics, digestibility, and stability”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 260, Part 1, (2024), 129253
- [266] Gong, W., Yang T.q., Chen, T., Hu, J., N., “Effect of cold plasma treatment on the structure and emulsifying activities of phycocyanin”, *Journal of Food Engineering*, V. 388, (2025), 112355.
- [267] Chhirang, P., Gahlawat, V.K., Singh, B.P., “Phycocyanin: A potential bioresource for functional food product development”. *South African Journal of Botany*, V. 174, (November 2024), 49–65.
- [268] Dagnino-Leone, J., Pinto Figueroa, C., Latorre Castañeda, M., Donoso Youlton, A., Vallejos-Almirall, A., Agurto-Muñoz, A., Pavón Pérez, J., Agurto-Muñoz, C., “Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives”. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, V. 20, (2022), 1506–1527.

Appendices



APPENDICE A
Composition détaillée du milieu de culture Hiri.

Tableau A.1 : Composition chimique, en gramme par litre d'eau, du milieu de culture Hiri utilisé pour la culture de la spiruline [163].

Milieu de culture	Hiri
Composé	
Natron	16
Urée	1
Chlorure de sodium (NaCl)	1
Phosphate d'Ammonium	0,1
Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄)	0,5
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,1
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	0,1
Sulfate de fer (FeSO ₄ , 7H ₂ O)	0,01

APPENDICE B

Composition détaillée du milieu de culture Zarrouk.**Tableau B.1** : Composition chimique, en gramme par litre d'eau, du milieu de culture Zarrouk utilisés pour la culture de la spiruline [73].

Composé	Milieu de culture	Zarrouk
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃)		16,8
Nitrates de sodium (NaNO ₃)		2,5
Chlorure de sodium (NaCl)		1
Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄)		1
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O)		0,2
Chlorure de calcium (CaCl ₂)		0,04
Sulfate de fer (FeSO ₄ , 7H ₂ O)		0,01
Phosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)		0,5
Acide éthylène diamino tétracétique (EDTA)		0,08
Solution A5		1 ml
Solution B6		1 ml

La composition des solutions A5 et B6 additionnées au milieu Zarrouk (tableau 1), est détaillée dans le tableau 1.

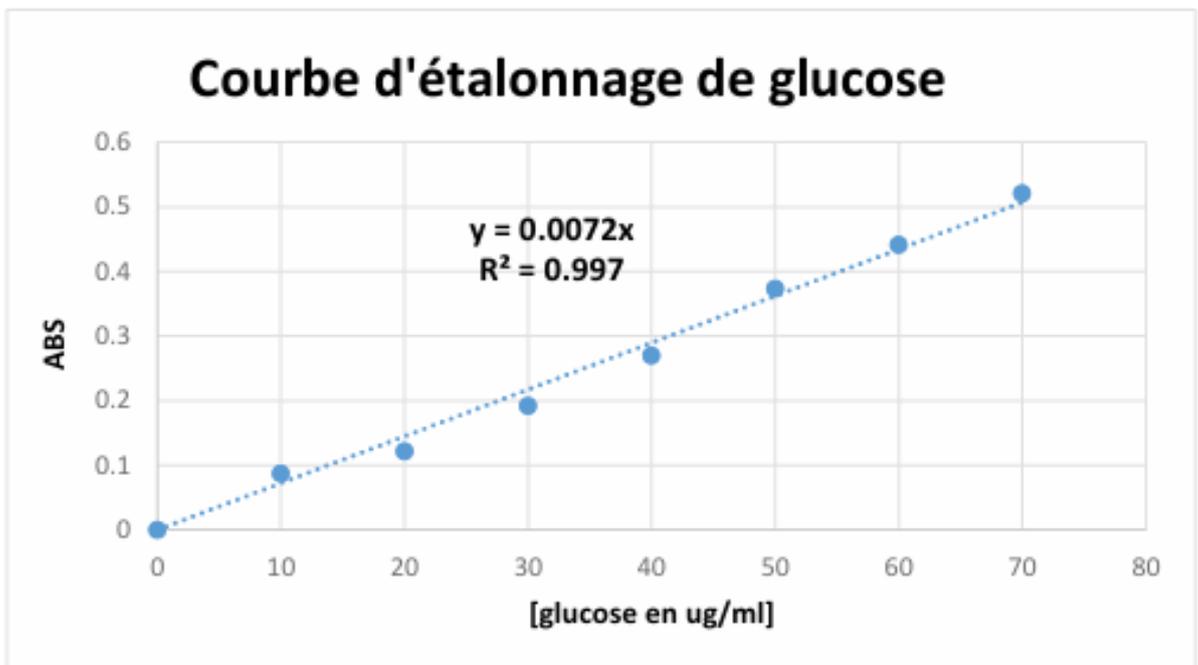
Tableau B.2 : Composition des solutions A5 ; B6 pour le milieu Zarrouk [73].

Solution A5	
Produit chimique	Quantité g/l d'eau
H ₃ BO ₃ (Acide borique)	2,86
MnCl ₂ , 4H ₂ O (Chlorure de manganèse)	1,81
ZnSO ₄ , 7H ₂ O (Sulfate de zinc)	0,222
CuSO ₄ , 5H ₂ O (Sulfate de cuivre)	0,079
MoO ₃ (Oxyde de molybdène)	0,015

Solution B6	
Produit chimique	Quantité g/l d'eau
NH ₄ VO ₃ (Vanadate d'ammonium)	229 x 10 ⁻⁴
K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ , 24 H ₂ O (Alun de chrome)	960 x 10 ⁻⁴
NiSO ₄ , 7H ₂ O (Sulfate de nickel)	478 x 10 ⁻⁴
NaWO ₄ , 2H ₂ O (Tungstate de sodium)	179 x 10 ⁻⁴
Ti ₂ (SO ₄) ₃ (Sulfate de titanium)	400 x 10 ⁻⁴
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O (Nitrate de cobalt)	44 x 10 ⁻⁴

APPENDICE C

Courbe d'étalonnage du glucose



**Publication
Internationale (Q1)**



Publication Internationale (Q1)



Contents lists available at ScienceDirect

Algal Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/algal

Physiological and genomic analysis of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 isolated from Tamanrasset, Algeria

Safia Lounici^{a,b,*}, Lynda Boutekrabi^c, Amel Doumandji^d, Selma Salhi^e, Rob Van Houdt^f, Natalie Leys^f

^a Department of Agricultural Sciences, Faculty of Sciences, Amar Telidji Laghouat University, Laghouat, Algeria

^b Laboratory of Biotechnology and Plant Production, Department of Biotechnology and Agro-Ecology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, Algeria

^c Faculty of Nature and Life Sciences, Saad Dahlab Blida 1 University, Blida, Algeria

^d Laboratory of Science Technology and Sustainable Development Research, Department of Food Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Saad Dahlab Blida 1 University, Blida, Algeria

^e Department of Ecology and Environment, Faculty of Natural and life Sciences, University of Bama 2, Bama, Algeria

^f Microbiology Unit, Nuclear Medical Applications, Belgian Nuclear Research Centre, Mol, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:
Limnospira
Culture media
Genomic analysis
Secondary metabolites
Tamanrasset
Algeria

ABSTRACT

Cyanobacteria designated as *Spirulina*, *Arthrospira* and *Limnospira* are worldwide well-known food and food supplement sources. Despite their long history of use for human consumption, many indigenous strains remain unstudied. Here we performed a genomic and physiological characterization of AlgLouSa11, an Algerian strain isolated from the Taguemart region in Tamanrasset. Its genome was sequenced and compared (via ANI and PaSit4) to 21 genomes of the *Arthrospira* and *Limnospira* genera, indicating that AlgLouSa11 belonged to the *Limnospira* genus, with *Limnospira fusiformis* KN01 being the closest relative (99.3 %). Growth was scored in three different culture media (Hiri, Zarrouk, and BG-11), with the highest cell density, 4.76×10^5 cells/ml after 11 days, obtained for Hiri medium. The optimal growth temperature was 34°C, with automatic agitation producing the highest yields (5.90 ± 0.25 g/l). The optimal growth pH was nine, with growth decreasing with increasing alkalinity. Finally, exploring the genome of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 showed the presence of coding sequences involved in the biosynthesis of secondary metabolites such as cyanobactin, terpenes and lanthipeptides.

1. Introduction

Although the cyanobacterial genus *Limnospira* has only recently been established [1], such cyanobacteria have probably been around since the rise of oxygen in the atmosphere and oceans during the so-called Great Oxidation Event [2,3]. In 1492, Christopher Columbus, upon discovering it in Mexico, referred to it as “The Magic Portion” in the form of small dried green galettes and the Aztecs harvested and consumed it under the name Tecuitlatl [4]. The first description of spirulina dates from 1844 [5], was rediscovered around 1930 in Chad under the name Dihé and in 1940 by the botanist Dangeard [4,6]. It is important to note that the term “Spirulina”, which is derived from its filamentous form often coiled in spirals, most often refers to the commercial name of cyanobacteria belonging to the *Limnospira* (formerly *Arthrospira*) genus. However, it can also refer to a

cyanobacterial genus quite distant from *Arthrospira*, which is classified in another order and non-edible [7,8]. Since 2019, the *Limnospira* genus was established, which essentially includes three taxa of *Arthrospira* cultivated for commercial and industrial purposes [1]. *Limnospira* (as well as *Arthrospira*) members are filamentous cyanobacteria, often referred to as blue-green algae because of their richness in pigments, especially Carotenoids, C-Phycocyanin and Chlorophyll [9,10], but are not scientifically classified as algae. They are among the most produced microorganisms in the world for human and animal consumption [11,12]. In fact, these microorganisms are the only ones in the world that are grown and commercially marketed as a food source [13]. They are often coined as superfood [14] because of their very high content in macronutrients [15–17], micronutrients and trace elements [18,19]. They contain high levels of bioactive compounds such as carotenoids, unsaturated fatty acids, phytosterols, polysaccharides and dietary fiber,

* Corresponding author at: Department of Agricultural Sciences, Faculty of Sciences, Amar Telidji Laghouat University, Laghouat, Algeria.

E-mail addresses: s.lounici@lagh-univ.dz (S. Lounici), l.boutekrabi@messrs.dz (L. Boutekrabi), corino147@yahoo.fr (A. Doumandji), selma.salhi@univ-batna2.dz (S. Salhi), rob.van.houdt@sckcen.be (R. Van Houdt), Natalie.Leys@sckcen.be (N. Leys).

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103569>

Received 22 September 2023; Received in revised form 18 May 2024; Accepted 1 June 2024

S. Louici et al.

which can serve as prebiotics and have a physiological effect on digestion. In addition, they recently also garnered great interest in therapeutic fields because of their anti-inflammatory, antioxidant and cholesterol-lowering properties, as well as support in controlling blood sugar levels [13,20–23]. Finally, *Limnospira indica* PCC8005 is also studied within the European Space Agency MELISSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) project in order to produce food, water and oxygen for extended space missions [24,25].

Limnospira and *Arthrospira* are photoautotrophic genera that grow preferentially in warm, alkaline waters, containing sodium carbonate or sodium bicarbonate, and rich in nitrogen and phosphorus nutrients [6,26]. Naturally, they are observed in brackish waters, as well as in saline lakes of tropical and semi-tropical regions [27]. In addition to their natural habitats, they can also be grown in culture ponds using artificial culture medium as well as specialized photobioreactors [6]. Observed optimal growth temperature and pH are between 35–37 °C and 9.5–10.5, respectively [28]. Although light, natural or artificial, is essential, strong light (120,000 lx) leads to decomposition [6].

Taxonomic classification according to their phenotypic and morphological characteristics appears to be very difficult [6]. As such, a polyphasic approach is used that combines phenotypic data with molecular data, including 16S rRNA, internal transcribed spacer (ITS), the phycocyanin locus (*pcrBA*-IGS sequences) and the gas vesicle gene clusters (*gvp*) [29–35]. Initial phylogenetic studies based on the 16S rRNA gene divided the *Arthrospira* genus into three clades [36] and defined six *Arthrospira* species: *A. geitleri*, *A. jenneri*, *A. platensis*, *A. fusiformis*, *A. indica* and *A. maxima* [33]. The latter three *Arthrospira* species were recently reclassified to the newly established *Limnospira*

genus: *L. fusiformis*, *L. indica* and *L. maxima* [1]. The various strains within the *Arthrospira* and *Limnospira* genera exhibit notable morphological and genetic resemblances, posing challenges to their taxonomic classification. Based on their phenotypic and morphological traits, species from these genera typically manifest as multicellular filaments known as trichomes, often coiled into spirals. *L. maxima* typically displays a regular spiral pattern, often with relaxed trichomes, while *L. fusiformis* shows considerable irregularity in spiral formations, particularly towards the trichome ends, and *L. platensis* are usually regular filaments with a tapered spiral and few to no gas vesicles (aerotopes) [31,37].

Although cyanobacteria were already discovered in the Guelta in the crystalline massif of Hoggar in Tamanrasset (Algeria) in 1988 by Abdelkader Hiri, Etienne Boileau and Monique Boileau, strain AlgLouSa11 was only isolated in 2004 by Dr. Hiri. Aouir et al. [38] examined the extraction of bioactive compounds from this particular strain, which had the highest amount of carotenoids (5.50 mg/g) and polyphenols (67.52 mg GAE/g) among the comparative strains. Its production of extracellular polymeric substances (EPS) was optimized and phycocyanin extracts studied [39,40]. Finally, Chentir et al. [41] developed bio-functional films utilizing bovine gelatin and its phycocyanin extract.

The present study aims to characterize strain AlgLouSa11 by determining the optimal growth and production conditions, developing the use of natural ingredients in the culture medium, i.e. Trona (a complex of carbonates and bicarbonates), exploring its genome and classifying AlgLouSa11 taxonomically.

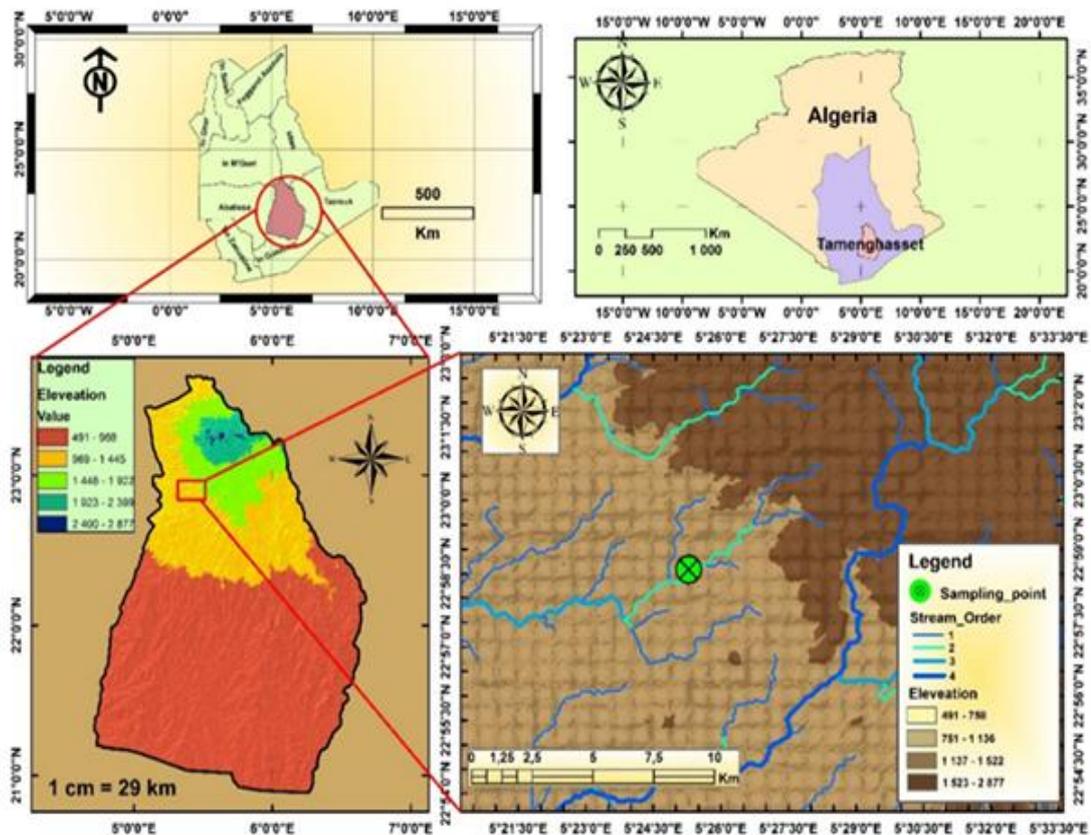


Fig. 1. Location mapping of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 isolation site.

2. Materials and methods

2.1. Isolation

Limnospira sp. AlgLouSa11 was obtained from the culture farm of Dr. Hiri. It was isolated for the first time in 2004 from a Guelta located in the region of Taguemart near the crystalline massif of Hoggar, Tamanrasset, Algeria (22°58'35" N 5°25'17"E) (Fig. 1). Gueltas, which are one of the main features of the Hoggar (also known as "Aguelmane"), are vast and deep-water wells fed by runoff water (rainfall is rare and irregular) and underground reserves stored in permeable and porous rocks (sandstone or volcanic rocks). These are carbonate soils (calcimagnesian) poor in organic matter and saline-alkaline. Gueltas contain living remnants of flora and fauna that were once more abundant and there is a distinctive flora adjacent to these water sources, including our isolated strain. The Hoggar region is influenced by two climatic regimes (i.e. temperate and tropical). Diurnal temperatures are exceptionally high, with an annual average of 22.4 °C and can reach above 50 °C.

Optimization and evaluation of growth conditions of the rod-shaped (Fig. S1) *Limnospira* sp. AlgLouSa11 was evaluated for a period of 29 days in three different culture media: Zarrouk medium [42], BG-11 medium [43] and Hiri medium. The latter was created and developed by Dr. Hiri (16 g/l trona, 16 g/l urea, 1 g/l NaCl, 0.1 g/l (NH₄)₃PO₄, 0.5 g/l K₂SO₄, 0.1 g/l MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/l CaCl₂, 0.01 g/l FeSO₄·7H₂O). The trona used was from the Hoggar massifs Edless. Cultures were maintained at 32 °C under a 12 h photoperiod (continuous light, 2000 lx) and continuous stirring via an aquarium air pump (≈1.5 l/min). Cell counts were performed by Nageotte counting chamber (Gx40) and expressed as number of cells per milliliter. The measurement was carried out every other day. The starting concentration was around 2.0×10^4 cells/ml.

The impact of temperature (28, 32, 36 and 38 °C) and pH (8, 9, 10 and 11) on growth in Hiri medium was assessed, with pH levels carefully monitored throughout cultivation. Measurements were conducted every other day to maintain consistency and adjustments were made with NaOH or HCl to keep the pH within the desired range. The effect of stirring mode (manual or automatic by electric air pump with a speed of ≈1.5 l/min) on growth was also evaluated. Five mg (fresh weight) *Limnospira* sp. AlgLouSa11 was resuspended in 4 ml distilled water and the optical density (570 nm) was scored in function of time (2000 lx). Optical density (570 nm) was recalculated to biomass based on a calibration curve (Fig. S2). Tests were carried out in triplicate.

2.2. DNA extraction

Limnospira sp. AlgLouSa11 was grown in 250 ml cell culture flasks (Greiner) containing 100 ml of Zarrouk medium under continuous light and shaking (128 rpm) at 25 °C. Cells were collected by centrifuging 6 ml (10 min, 8000 ×g). DNA was extracted as described by Morin et al. [44]. Quantity and purity were spectrophotometrically determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A.).

2.3. Whole-genome sequencing, annotation and phylogenomic analysis

Illumina sequencing was performed on the Illumina HiSeq 2500 platform using paired-end sequencing (BaseClear, Leiden, the Netherlands). Processed reads were de novo assembled using Spades v3.15.5 [45] with meta flag. The assembly was binned with MetaBinner [46] and individual bins evaluated with CheckM v1.2.1 [47] and GTDB-Tk v2.1.1 [48]. The contigs in the *Limnospira* sp. AlgLouSa11 bin were reordered based on the genome of *Limnospira fusiformis* KN01 (GCF_014489865.2) and are available from the NCBI Sequence Read Archive under accession number PRJNA926371. Phylogeny was constructed with PhyloPhlAn v3.0 using the supermatrix pipeline and *Planktothrix tepida* PCC 9214 as an outgroup [49]. The *Limnospira* sp. AlgLouSa11 genome was annotated with Prokka 1.14.6 [50]. Clustered

Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) sequences were predicted using CRISPRCasTyper 1.8.0 [51]. Prophage regions were identified using the PHASTER tool [52]. ANTIMASH was used to scrutinize the presence of secondary metabolite biosynthesis gene clusters [53].

3. Results and discussion

3.1. Taxonomic position of *Limnospira* sp. AlgLouSa11

The draft genome of AlgLouSa11 was compared to 21 genomes of the *Arthrospira* and *Limnospira* genera via Average Nucleotide Identity (ANI) [54] and PaSit4 [55] (Fig. 2). The latter is a novel method based on short-oligonucleotide frequencies [55]. Both ANI and PaSit4 assigned the strain to the *Limnospira* genus, with *Limnospira fusiformis* KN01 being the closest (99.3 %). Corroborating the results of Misztak et al. [56], ANI comparisons divided the genomes into two main clusters. For PaSit4, more clusters could be observed when using the most stringent cut-off (0.22). These results position the isolate in the *Limnospira* genus, which is also supported by phylogenomic analysis based on 400 universal markers [49] (Fig. 3).

3.2. Effect of medium, pH, temperature and stirring mode on *Limnospira* sp. AlgLouSa11 growth

Growth of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 in the different media (Zarrouk, BG 11 and Hiri) was observed after 7 to 11 days (Fig. 4). This lag phase was shorter in Zarrouk and BG-11 media (7 days) compared with Hiri culture medium (11 days). Growth rate appeared to be the highest in Hiri medium, followed by Zarrouk. In terms of biomass production, Hiri appeared to be the most efficient, reaching a cell density of 4.76×10^6 cells/ml, followed by Zarrouk with 3.77×10^6 cells/ml. From day 19 onward, a decrease in cell density was observed in Zarrouk and BG-11, but not in Hiri medium. According to Li et al. [57], sodium bicarbonate rapidly increases pH, which may explain the rapid growth of AlgLouSa11 on Zarrouk medium (16.8 g/l sodium bicarbonate) [42]. Delrue et al. [58] observed the maximum growth in Zarrouk on day 10.

The decrease in cell density is probably due to the depletion of the culture medium and secretion of exopolysaccharides, leading to the formation of clumps that settle to the bottom of the beaker [6,28]. According to Fox [6] and Zarrouk [42], secreted exopolysaccharides can inhibit *Limnospira* growth. While the production of exopolysaccharides by *A. platensis* can be enhanced by high concentrations of nitrogen (NaNO₃) and phosphate in the culture medium [57,59], *Limnospira* grown under such salt stress conditions increase their carbohydrate content and decrease their protein content. EPS can regulate excess carbon in cells and can act as a buffer between cells and air, providing a water reserve as observed in Hiri and Zarrouk media [57]. Thus, nutrient depletion together with light scattering by the biomass could be responsible for the decreased cell density after 20 days in Zarrouk medium.

BG-11 culture medium turned yellow after 20 days (measured pH was 9.98), suggesting nitrogen deficiency [14]. In fact, the amount of nitrogen in BG-11 is the lowest of the three tested growth media.

Next, Hiri medium was selected to evaluate the impact of pH, temperature and stirring mode on growth. For growth in pH 8 to 11, no differences were observed during the first three days (Fig. 5). From day 6 to 12, a significant difference was noticed between pH 11 and pH 8, 9 and 10 (Fig. 5, Table S1). While from day 15, a significant difference between pH 8 and 10 was observed. The highest biomass was recorded on day 9 for pH 9 (8.01 ± 0.125 g/l) and on day 12 for pH 10 (8 ± 0.5 g/l).

As these cyanobacteria thrive in alkaline environments, they require a relatively high initial pH. Here, we scrutinized the effect of different pH values (8–11) on the growth of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 and found no significant differences. This finding is consistent with prior research

S. Lounici et al.

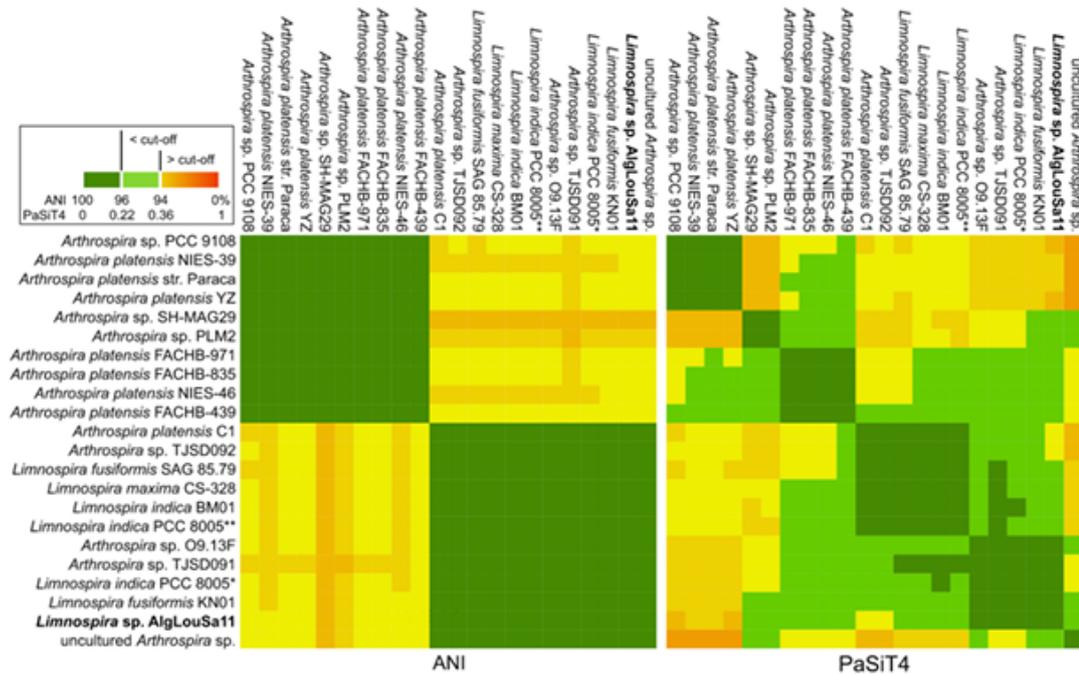


Fig. 2. Genomic coherence of 22 *Arthrospira*/*Limnospira* genomes as measured by Average Nucleotide Identity (FastANI; left panel) and short-oligonucleotide frequencies (PaSiT4; right panel). * GCF_000176895.2 ** GCF_000973065.1.

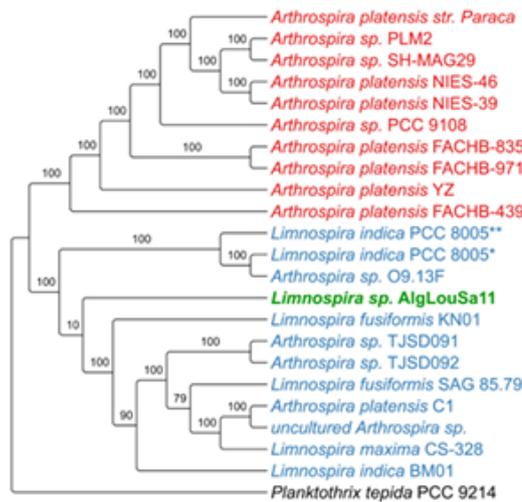


Fig. 3. Phylogenomic tree showing the relationships between strain AlgLouSa11 and strains of the *Arthrospira* and *Limnospira* genera. The phylogeny was constructed with PhyloPhlAn v3.0 using the supermatrix pipeline and *Planktothrix tepida* PCC 9214 as an outgroup. Branch labels correspond to bootstrap ($n = 100$) support values. The two clusters observed with ANI are colored red and blue. * GCF_000176895.2 ** GCF_000973065.1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

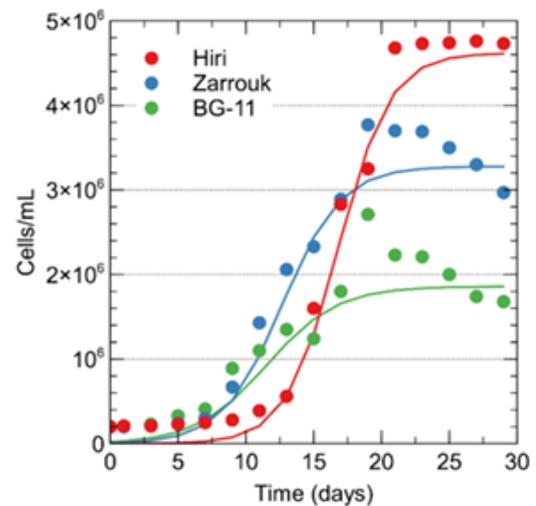


Fig. 4. Growth of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 in different culture media.

reporting an optimal pH range of 9 to 10 [28,42,60]. According to Mahadevaswamy and Venkataraman [61], maintaining the pH between 8.5 and 9.5 can limit growth due to growth of potential contaminants, including bacteria and protozoa [61,62]. This risk can be mitigated by keeping the pH closer to 10.5 [63]. The pH significantly influences the

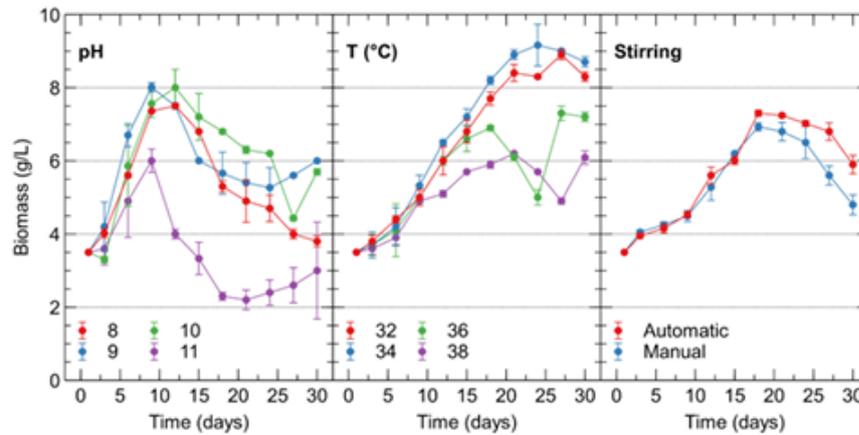


Fig. 5. Effect of pH (a), temperature (b) and stirring mode (c) on biomass evolution (g/L) as function of time.

dissolution kinetics of ions, particularly the inorganic carbon sources present in the growth media. At pH 8.5, the solubility of HCO_3^- ions, which are the primary constituents of the growth medium, is maximal. As the pH deviates, the solubility of these ions decreases. Zeng et al. [64] observed a depletion of the carbon source in the medium when the pH increases above 10.5 under low CO_2 conditions, which could explain the hampered growth at pH 11 [6,64–66]. Inorganic carbon, in the form of CO_2 , can affect growth in two ways. CO_2 dissolved in water is transformed in the presence of light by photosynthesis into organic carbon and O_2 . The energy required for growth is provided by respiration, using organic carbon as a substrate [67]. Based on this, biomass and photosynthetic pigments produced from mixotrophic cultures nearly doubled compared to photoautotrophic cultures [68]. In addition, dissolution of CO_2 in the culture medium (H_2CO_3) prevents a pH increase during growth [64]. As such, these cyanobacteria can contribute to reduce CO_2 , a greenhouse gas that leads to global warming, which is one of the most significant challenges of this century [66].

For the tested temperatures (32, 34, 36 and 38 °C), a significant difference was observed from day 12 onward (Fig. 5). The most optimal growth temperature was 34 °C, with a biomass concentration of 9.16 ± 0.57 g/L on day 14. The highest biomass was observed at day 24 for growth at 34 °C (Fig. 5, Table S2). Our findings align with other studies describing an optimum at 35–37 °C [6,28], but is slightly higher than the recommended growth temperature of 30 °C for *Arthrospira platensis* grown in Zarrouk medium [42,60]. Growth at 36 °C and 38 °C was significantly lower than at 32 °C and/or 34 °C. At 38 °C, a yellow discoloration of the culture was observed. This could mean that lysis had occurred, expelling polysaccharides into the water and leading to clump formation that inhibits growth [6]. High temperature (36 and 38 °C) also decreases CO_2 solubility that affects the enzymatic activity of ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCo), resulting in a reduction carbon bioconversion rates of 20–30 % [69]. It should be noted that in the case of large-scale cultivation in closed systems, a temperature increase of 10–25 °C during the day could be marked due to solar heating. In the case of open systems, a temperature decrease because of evaporation can be evident [69]. Potential cooling would result in a reduction of metabolic rate and a possible change in the photosynthesis/respiration ratio [69]. Studies have shown that maximum chlorophyll levels were obtained when *Arthrospira* was grown at 20 °C, while at 15 °C some *Arthrospira* strains stop their metabolism [56]. In addition, high temperatures may result in significant evaporation, leading to increased salt concentrations in the medium and causing osmotic stress. The tolerance to temperature extremes (10 °C to 50 °C

and high salt concentrations [60,70] reflects specific adaptation to the climatic conditions in their natural habitat.

Finally, the effect of stirring (automatic or manual) on growth was scrutinized (Hiri medium, 30 °C, pH = 9.5, 2000 lx). No significant difference was observed during the first 18 days (Fig. 5). Automatic stirring resulted always the highest biomass (Table S3). Whereas, from day 27 to 30, a significant difference ($p < 0.001$) in biomass was recorded between the two stirring modes. The highest biomass at the end of the experiment (day 30) was recorded for the automatic stirring with an average of 5.90 ± 0.25 g/L.

Concerning the stirring mode, our tests have shown that the stirring mode has no significant effect on the *Limnospira* sp. AlgLouSa11 growth. Although, the highest biomass was observed with automatic stirring. Apart from natural lake cultures that require no artificial agitation, various methods of stirring are employed in the mass production of this organism. One method is electrical agitation, such as air bubbling, as utilized in Dr. Hiri's farm in Tamanrasset, Algeria. Other approaches are the use paddlewheels or alike, which can range from large wheels (e.g., 2 m in diameter) to smaller variants, blades or more complex networks of leaf-shaped devices that generate vortices and double photosynthetic efficiency [6,60,70–73]. In addition, tubular reactors induced by appropriate pump flow are also utilized [60,74]. Stirring probably improves the dissolution of the culture medium constitution [75] and is essential for improving CO_2 solubility and eliminating inhibitory oxygen [65]. Insufficient agitation can result in oxygen oversaturation that inhibits photosynthesis and growth, potentially leading to culture loss [70]. Other aspects of stirring that impact cultivation are the accumulation of filaments at the surface during still periods, which hinders proper photosynthesis or even photolysis [6], and turbulence, which affects the efficiency of photosystem II [76].

3.3. General features of the *Limnospira* sp. AlgLouSa11 genome

The draft genome of *Limnospira* sp. AlgLouSa11 consisted of 364 contigs with a total length of 5,341,162 bp and a GC content of 44.57 % (Fig. 6). The distribution of the *Limnospira* sp. AlgLouSa11 coding sequences (CDSs) in COGs (Fig. 7) showed that the majority of the CDSs have unknown functions (1024) (Table S4). The others are involved in different functionalities namely defense mechanisms (80), replication, recombination and repair (303), secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism (100), amino acid transport and metabolism (172), lipid transport and metabolism (70), inorganic ion transport and metabolism (166). Multiple Cas operons were identified, with two

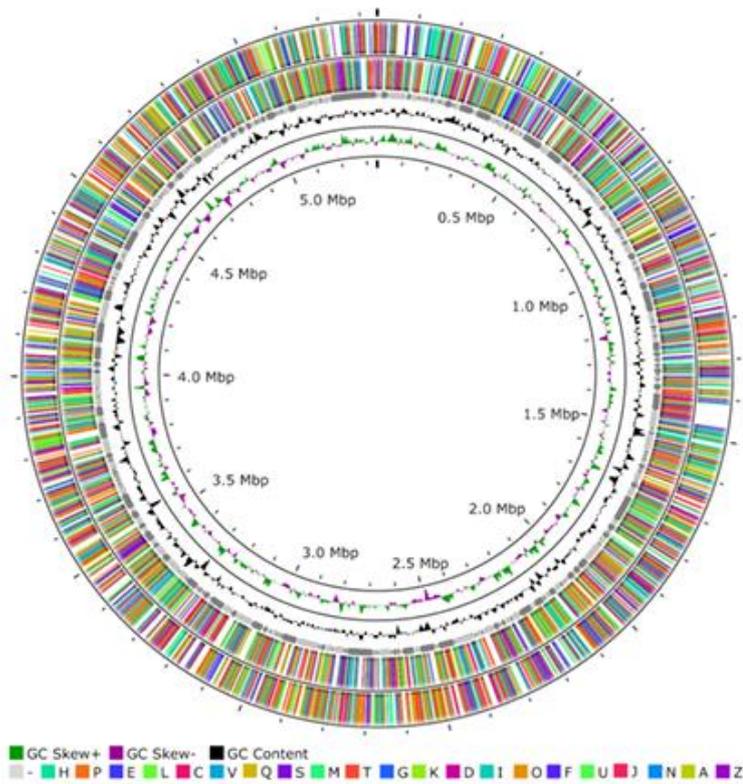


Fig. 6. Circular representation of the *Limnospira* sp. AlgLouSa11 genome.

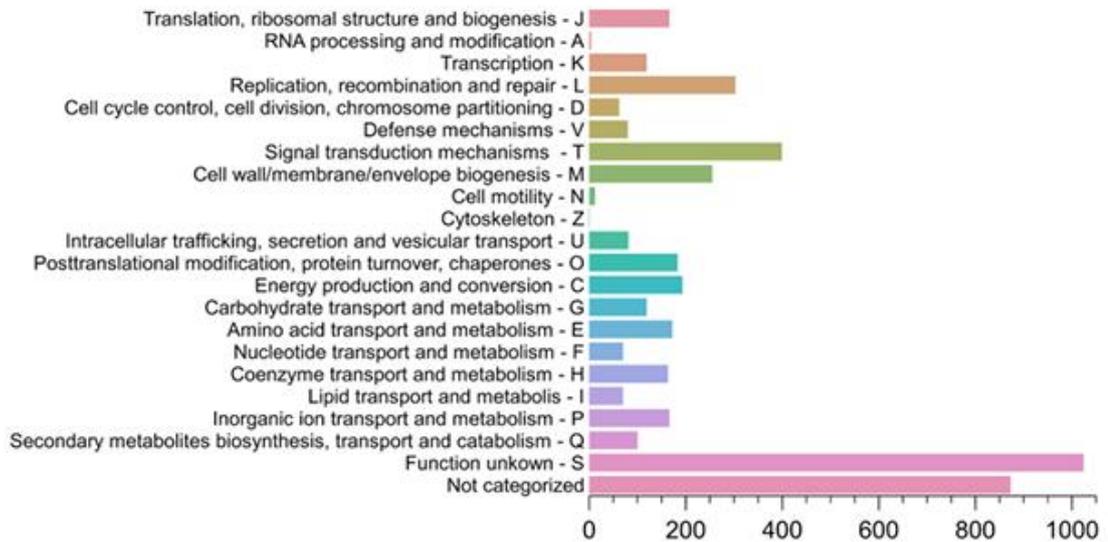


Fig. 7. EggNOG classification of all coding sequences in the *Limnospira* sp. AlgLouSa11 genome.

S. Lounici et al.

CRISPR-Cas regions (Fig. S3). This number is comparable with that of the other genomes used in this study (Table S5). BLAST analysis of the spacers resulted either in no hits or to other *Arthrospira/Limnospira* genomes (Table S6).

3.4. Secondary metabolites

Secondary metabolites produced by cyanobacteria encompass a wide range of structurally diverse molecules that possess bioactive properties and are of great pharmaceutical interest [77,78]. *Limnospira* sp. AlgLouSa11 harbors around 100 CDSs in its genome responsible for the biosynthesis, transport and catabolism of secondary metabolites (Table S4). Notably, these CDSs include those involved in the synthesis of cyanobactin, terpenes and class V lanthipeptides (Table S7; File S1).

Limnospira sp. AlgLouSa11 carries CDSs encoding proteins involved in the synthesis of enzymes belonging to the large terpene synthase (TPS) family [79]. TPS enzymes play a crucial role in terpenoid biosynthesis. Terpenes are volatile organic compounds synthesized and released by microalgae and cyanobacteria [80]. They have significant nutritional potential and are involved in a variety of biological processes. Microalgae use terpenes as pigments, while they also serve as constituents of chlorophyll, carotenoids and vitamin A [81,82]. In addition, terpenes produced by cyanobacteria are thought to exert allelopathic effects on phytoplankton, influencing the growth and development of other organisms in their environment [83]. For example, an extract of *Limnospira* (*Arthrospira platensis*) containing terpenes had antifungal and antioxidant properties [84]. Understanding the genetic and biochemical pathways involved in terpene synthesis improves our knowledge of these compounds and their potential applications in various fields. Indeed, several studies have demonstrated a relationship between light and terpene synthesis [85]. In addition, the viscosity of *Limnospira* (*A. platensis*) culture medium can be modified by terpenes [86].

More than 100 natural cyanobactins are known and other cyanobactins have emerged through genetic methods [87]. They are present in terrestrial freshwater cyanobacteria [88] and in foods [87]. Furthermore, cryptic cyanobactin CDSs have been found in the genomes of *A. platensis* NIES-39 and strain Paraca, and are common in the *Oscillatoria*, *Arthrospira* and *Microcystis* genera [87]. These bioactive molecules with diverse biological activities have medicinal properties [78,89]. Cyanobactins are a group of compounds that encompass both cyclic [90,91] and linear peptides [92]. These peptides undergo post-translational modifications facilitated by various biosynthetic enzymes, leading to a diverse array of structurally and chemically distinct compounds [93,94]. The process responsible for the formation of cyanobactins is known as heterocyclization, which is catalyzed by PatD-type heterocyclases. This enzymatic reaction relies on magnesium as cofactors, which is typically present in the culture medium of *Limnospira* [95]. Additionally, zinc has been found to play a structural role in certain cyanobactin heterocyclases [96,97]. Thus, the presence of a specific peptide recognition sequence is crucial for the proper functioning of these enzymes [98]. The identification of new gene clusters will uncover new enzymatic activities and potentially facilitate the in vitro production of cyanobactins [95]. Overall, the interplay of enzymatic reactions, cofactors and genetic factors plays a crucial role in cyanobactin biosynthesis. Understanding the mechanisms and genetic components involved in this synthesis can lead to a better understanding of their production, their potential applications and the exploration of new enzymatic activities in biotechnology.

Genes encoding a class V lanthipeptide, which exhibits high antimicrobial potential [99,100], were also identified in *Limnospira* sp. AlgLouSa11. Lanthipeptides, or lantibiotics, are peptides synthesized by the ribosome that undergo post-translational modifications, resulting in a wide range of structurally diverse scaffolds and, consequently, different molecules [101,102]. Lanthipeptides are characterized by the presence of rings, lanthionine (Lan), or methylanthionine (MeLan),

formed through the birecticulation of β -thioether amino acids derived from serine or threonine residues [103]. These peptides are classified into five classes.

The interaction between nitrogen and carbon sources can have both positive and negative effects on secondary metabolite biosynthetic pathways. Growth-promoting sources of carbon and nitrogen, such as glucose and ammonium salts, can have a negative impact on secondary metabolite production [104]. On the other hand, certain amino acids or nitrates can stimulate the production of secondary metabolites [105]. Furthermore, the presence of specific minerals, notably zinc, can also affect the biosynthetic pathways of secondary metabolites [103].

4. Conclusion

The AlgLouSa11 isolate from Tamanrasset was assigned to the *Limnospira* genus, with *Limnospira fusiformis* KN01 being its closest relative. *Limnospira* sp. AlgLouSa11 grew preferentially in Hiri culture medium, which contains the natural element trona. It's a cost-effective medium with potential for large-scale cultivation because of the natural source of sodium bicarbonate and nitrogen. Stirring and temperature appeared to play a significant role in optimal biomass production. The ease of cultivation and its ability to generate bioactive molecules make *Limnospira* sp. AlgLouSa11 an excellent food alternative. Genome exploration has demonstrated that AlgLouSa11 contains multiple CDSs for the biosynthesis of secondary metabolites, including cyanobactins, terpenes, and class V lanthipeptides. The further exploration, production and extraction of such secondary metabolites could present promising strategies with potential pharmaceutical, medicinal, agricultural or industrial applications. Moreover, understanding AlgLouSa11's biosynthetic capabilities could provide input in developing strategies for environmental management and sustainability, thereby contributing to the broader field of biotechnology.

CRedit authorship contribution statement

Safia Lounici: Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Lynda Boutekrabet:** Investigation. **Amel Doumandji:** Investigation. **Selma Salhi:** Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing. **Rob Van Houdt:** Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – review & editing. **Natalie Leys:** Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no financial or personal relationships that could potentially create a conflict of interest with respect to this article. We have no employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, or grants or other funding that could inappropriately bias our work. This article is presented with full transparency regarding any potential conflicts, and none exist.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103569>.

References

- [1] P. Nowicka-Krawczyk, R. Muhlsteinova, T. Hauer, Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria), *Sci. Rep.* 9 (2019) 694.

S. Lounici et al.

- [2] D.Y. Sumner, I. Hawes, T.J. Mackey, A.D. Jungblut, P.T. Doran, Antarctic microbial mats: a modern analog for Archean lacustrine oxygen oases, *Geology* 43 (2015) 887–890.
- [3] A.L. Sessions, D.M. Doughty, P.V. Welander, R.E. Summons, D.K. Newman, The continuing puzzle of the great oxidation event, *Curr. Biol.* 19 (2009) R567–R574.
- [4] W.V. Farrar, *Tecuilatl: a glimpse of aztec food technology*, *Nature* 211 (1966) 341–342.
- [5] V.B. Wittrock, O. Nordstedt, *Algae Aquae Ducia Exsicc.*, Fascicule XIV, Descriptions Systematicae Dispositae, 1844, p. 59.
- [6] R.D. Fox, *La Spiruline: Technique, Pratique et Promesse*, Edisud, 1999.
- [7] A. Vonshak, L. Tomaselli, *Arthrospira (Spirulina): systematics and Ecophysiology*, in: B.A. Whitton, M. Potts (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, Springer, Netherlands, Dordrecht, 2002, pp. 505–522.
- [8] J. Komárek, J.W.G. Lund, What is <<Spirulina platensis>> in fact? *Algalogical Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 58 (1990) 1–13.
- [9] F.Z. Benbelkhir, S. Medjekal, Microalgal carotenoids: a promising alternative to synthetic dyes, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 66 (2022) 102823.
- [10] F. Marty, F. Busson, Données cytologiques sur deux Cyanophycées: *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler et *Spirulina gelifera* J. de Toni, *Schweiz. Z. Hydrol.* 32 (1970) 559–565.
- [11] M.L. Wells, P. Potin, J.S. Craigie, J.A. Raven, S.S. Merchant, K.E. Hellwell, A. G. Smith, M.E. Camire, S.H. Brawley, Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding, *J. Appl. Phycol.* 29 (2017) 949–982.
- [12] M.A. Furmaniak, A.E. Misztak, M.D. Franczuk, A. Wilimotte, M. Waleron, K. F. Waleron, Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 2541.
- [13] B.W. Jester, H. Zhao, M. Gewe, T. Adame, L. Perruzza, D.T. Bolick, J. Agosti, N. Khuong, R. Kuestner, C. Gamble, K. Cruickshank, J. Ferrara, R. Lim, T. Paddock, C. Brady, S. Ertel, M. Zhang, A. Pollock, J. Lee, J. Xiong, M. Tasch, T. Saveria, D. Doughty, J. Marshall, D. Carrieri, L. Goetsch, J. Dang, N. Sanjaya, D. Fletcher, A. Martinez, B. Kadis, K. Sigmair, E. Afreen, T. Nguyen, A. Randolph, A. Taber, A. Kreszowski, B. Robinett, D.B. Volkin, F. Grassi, R. Guerrant, R. Takeuchi, B. Finrow, C. Behnke, J. Roberts, Development of spirulina for the manufacture and oral delivery of protein therapeutics, *Nat. Biotechnol.* 40 (2022) 956–964.
- [14] Z.L. Ma, F. Ahmed, B. Yuan, W. Zhang, Fresh living *Arthrospira* as dietary supplements: current status and challenges, *Trends Food Sci. Technol.* 88 (2019) 439–444.
- [15] A. Trincone, Polysaccharides produced by microalgae, in: J. Oliveira, H. Radhouani, R.L. Reis (Eds.), *Polysaccharides of Microbial Origin*, Springer International Publishing, Cham, 2021, pp. 1–22.
- [16] S.P. de Souza da Silva, D. Perrone, A.F. do Valle, Optimization of *Arthrospira maxima* cultivation for biomass and protein production and biomass technological treatment to color, flavor, and aroma masking for addition to food products, *J. Appl. Phycol.* 34 (2021) 65–80.
- [17] K. Kim, D. Hoh, Y. Ji, H. Do, B. Lee, W. Holzappel, Impact of light intensity, CO₂ concentration and bubble size on growth and fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* KMMCC CY-007, *Biomass Bioenergy* 49 (2013) 181–187.
- [18] V.P. Barros de Medeiros, W.K.A. da Costa, R.T. da Silva, T.C. Plimintel, M. Magnani, Microalgae as source of functional ingredients in new-generation foods: challenges, technological effects, biological activity, and regulatory issues, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62 (2022) 4929–4950.
- [19] Z.Y. Li, S.Y. Guo, L. Li, M.Y. Cai, Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 700–705.
- [20] D.Y.Y. Tang, K.S. Khoo, K.W. Chew, Y. Tao, S.H. Ho, P.L. Show, Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products, *Bioresour. Technol.* 304 (2020) 122997.
- [21] S. Rechter, T. König, S. Auerochs, S. Thulke, H. Walter, H. Dornenburg, C. Walter, M. Marschall, Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances, *Antivir. Res.* 72 (2006) 197–206.
- [22] O. Babich, S. Sukhikh, V. Larina, O. Kalashnikova, E. Kashirskikh, A. Prosekov, S. Noskova, S. Ivanova, I. Fendri, S. Smaoui, S. Abdelkafi, P. Michaud, V. Dolganyuk, Algae study of edible and biologically active fractions, their properties and applications, *Plants (Basel)* 11 (2022).
- [23] P.P. Nass, T.C. do Nascimento, A.S. Fernandes, P.A. Gaetano, V.V. de Rosso, E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka, Guidance for formulating ingredients/products from *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* considering carotenoid and chlorophyll bioaccessibility and cellular uptake, *Food Res. Int.* 157 (2022) 111469.
- [24] E.D. Revellame, R. Aguda, A. Chistoserdov, D.L. Fortela, R.A. Hernandez, M. E. Zappi, Microalgae cultivation for space exploration: assessing the potential for a new generation of waste to human life-support system for long duration space travel and planetary human habitation, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 55 (2021) 102258.
- [25] L. Poughon, C. Laroche, C. Creuly, C.G. Dussap, C. Paille, C. Lasseur, P. Monsieus, W. Heylen, I. Coninx, F. Mastroiolo, N. Leys, *Limnospira indica* PCC8005 growth in photobioreactor: model and simulation of the ISS and ground experiments, *Life Sci Space Res (Amst)* 25 (2020) 53–65.
- [26] O. Ciferri, O. Tiboni, The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*, *Annu. Rev. Microbiol.* 39 (1985) 503–526.
- [27] R.W. Castenholz, R. Rippka, M. Herdman, A. Wilimotte, Form- *Arthrospira*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2015, pp. 1–3.
- [28] J.P. Jourdan, *Cultivez Votre Spiruline, Manuel de Culture Artisanale de la Spiruline*, 2013.
- [29] M. Miklaszewska, M. Waleron, N. Morin, M. Calusinska, A. Wilimotte, N.T. De Marsac, R. Rippka, K. Waleron, Elucidation of the gas vesicle gene clusters in cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanophyta) and correlation with ITS phylogeny, *Eur. J. Phycol.* 47 (2012) 233–244.
- [30] M. Mühling, P.J. Somerfield, N. Harris, A. Belay, B.A. Whitton, Phenotypic analysis of *Arthrospira (Spirulina)* strains (cyanobacteria), *Phycologia* 45 (2006) 148–157.
- [31] G. Papapanagiotou, S. Gkelis, Taxonomic revision of commercially used *Arthrospira* (Cyanobacteria) strains: a polyphasic approach, *Eur. J. Phycol.* 54 (2019) 595–608.
- [32] D. Baurain, L. Renquin, S. Grubisic, P. Scheideman, A. Belay, A. Wilimotte, Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* ('Spirulina') (Cyanophyceae, Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year-old dried samples from Africa, *J. Phycol.* 38 (2002) 384–393.
- [33] P. Scheideman, D. Baurain, R. Bouhy, M. Scott, M. Mühling, B.A. Whitton, A. Belay, A. Wilimotte, *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 Microbiol. Lett.* 172 (1999) 213–222.
- [34] M. Hicks, T.K. Tran-Dao, L. Mulrone, D.L. Bernick, De-novo assembly of *Limnospira fusiformis* using ultra-long reads, *Front. Microbiol.* 12 (2021) 657995.
- [35] J.F. Manen, J. Falquet, The *cpb-cpca* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 861–867.
- [36] K. Comte, T. Coursin, A. Carre-Mlouka, A new genotype in the genus (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by a mosaic-like structure of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region in strain PCC 9901, *Phycologia* 52 (2013) 333–337.
- [37] J. Komárek, K. Anagnostidis, Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/2: Cyanoprokaryota, Bd. 2/Part 2: Oscillatoriales, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2005.
- [38] A. Aouir, M. Amiali, A. Bitam, A. Benchabane, V.G. Raghavan, Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA, *Journal of Food Measurement and Characterization* 11 (2017) 913–923.
- [39] I. Chentir, M. Hamdi, A. Doumandji, A. HadjSadok, H.B. Ouada, M. Nasri, M. Jridi, Enhancement of extracellular polymeric substances (EPS) production in *Spirulina (Arthrospira sp.)* by two-step cultivation process and partial characterization of their polysaccharidic moiety, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 1412–1420.
- [40] I. Chentir, M. Hamdi, S.M. Li, A. Doumandji, G. Markou, M. Nasri, Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira sp.* strain, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 35 (2018) 395–406.
- [41] I. Chentir, H. Kchaou, M. Hamdi, M. Jridi, S.M. Li, A. Doumandji, M. Nasri, Biofunctional gelatin-based films incorporated with food grade phycocyanin extracted from the Saharian cyanobacterium *Arthrospira sp.*, *Food Hydrocol.* 89 (2019) 715–725.
- [42] C. Zarruk, Contribution à l'étude Cyanophycée: Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la Croissance et la Photosynthèse de *Spirulina maxima*, Setch et Gardner Gettler, 1966.
- [43] M.M. Allen, R.Y. Stanier, Selective isolation of blue-green algae from water and soil, *J. Gen. Microbiol.* 51 (1968) 203–209.
- [44] N. Morin, T. Vallaeys, L. Hendrickx, L. Natalie, A. Wilimotte, An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*, *J. Microbiol. Methods* 80 (2010) 148–154.
- [45] A. Pribelski, D. Antipov, D. Meleshko, A. Lapidus, A. Korobeynikov, Using SPAdes de novo assembler, *Curr. Protoc. Bioinformatics* 70 (2020) e102.
- [46] Z. Wang, P. Huang, R. You, F. Sun, S. Zhu, MetaBinner: a high-performance and stand-alone ensemble binning method to recover individual genomes from complex microbial communities, *Genome Biol.* 24 (2023) 1.
- [47] D.H. Parks, M. Imelfort, C.T. Skennerton, P. Hugenholtz, G.W. Tyson, CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes, *Genome Res.* 25 (2015) 1043–1055.
- [48] P.A. Chaumeil, A.J. Mussig, P. Hugenholtz, D.H. Parks, GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database, *Bioinformatics* 38 (2022) 5315–5316.
- [49] F. Asnicar, A.M. Thomas, F. Beghini, C. Mengoni, S. Manara, P. Manghi, Q. Zhu, M. Bolzan, F. Cumbo, U. May, J.G. Sanders, N. Segata, Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlan 3.0, *Nat. Commun.* 11 (2020) 2500.
- [50] T. Seemann, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics* 30 (2014) 2068–2069.
- [51] J. Russel, R. Pinilla-Redondo, D. Mayo-Munoz, S.A. Shah, S.J. Sorensen, CRISPR-CasTyper: automated identification, annotation, and classification of CRISPR-Cas loci, *CRISPR J* 3 (2020) 462–469.
- [52] D. Arndt, J.R. Grant, A. Marcu, T. Sajed, A. Pon, Y. Liang, D.S. Wishart, PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) W16–W21.
- [53] K. Blin, S. Shaw, H.E. Augustijn, Z.L. Reitz, F. Bliermann, M. Alanjary, A. Fetter, B. R. Terlou, W.W. Metcalf, E.J.N. Helfrich, G.P. van Wezel, M.H. Medema, T. Weber, antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation, *Nucleic Acids Res.* 51 (2023) W46–W50.

S. Lounici et al.

- [54] I. Lee, Y. Ouk Kim, S.C. Park, J. Chun, OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (2016) 1100–1103.
- [55] G. Goussarov, I. Cleenwerck, M. Mysara, N. Leys, P. Monsieurg, G. Tahon, A. Carlier, P. Vandamme, R. Van Houdt, PaSIT: a novel approach based on short-oligonucleotide frequencies for efficient bacterial identification and typing, *Bioinformatics* 36 (2020) 2337–2344.
- [56] A.E. Misztak, M. Waleron, M. Furmaniak, M.M. Waleron, O. Bazhenova, M. Daroch, K.F. Waleron, Comparative genomics and physiological investigation of a new *Arthrospira/Limnospira* strain O9.13F isolated from an alkaline, winter freezing, Siberian Lake, *Cells* 10 (2021).
- [57] Z. Li, Y. Liu, T. Zhou, L. Cao, Y. Cai, Y. Wang, X. Cai, H. Yan, R. Ruan, Q. Zhang, Effects of culture conditions on the performances of *Arthrospira platensis* and its production of exopolysaccharides, *Foods* 11 (2022) 2020.
- [58] F. Delrae, E. Alaux, L. Moudjaoui, C. Gaignard, G. Fleury, A. Perilhou, P. Richard, M. Petitjean, J.-F. Sassi, Optimization of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) growth: from laboratory scale to pilot scale, *Fermentation* 3 (2017) 59.
- [59] H. Sudo, J.G. Burgess, H. Takemasa, N. Nakamura, T. Matsunaga, Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*, *Curr. Microbiol.* 30 (1995) 219–222.
- [60] A. Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, 1st ed., CRC Press, London, 1997.
- [61] M. Mahadevaswamy, L.V. Venkataraman, Bacterial contaminants in blue-green-alga *Spirulina* produced for use as biomass protein, *Archiv Fur Hydrobiologie* 110 (1987) 623–630.
- [62] K.H. Ogbonda, R.E. Aminigo, G.O. Abu, Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2207–2211.
- [63] C.B. Hills, *The Secrets of Spirulina: Medical Discoveries of Japanese Doctors*, University of the Trees Press, 1980.
- [64] X.H. Zeng, M.K. Danqqaq, S.D. Zhang, X. Zhang, M.Y. Wu, X.D. Chen, L.S. Ng, K. J. Jing, Y.H. Lu, Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycoerythrin production, *Chem. Eng. J.* 183 (2012) 192–197.
- [65] J. Cheng, H. Lu, X. He, W. Yang, J. Zhou, K. Cen, Mutation of *Spirulina* sp. by nuclear irradiation to improve growth rate under 15% carbon dioxide in flue gas, *Bioresour. Technol.* 238 (2017) 650–656.
- [66] B.H. Zhu, T.F. Xiao, H. Shen, Y. Li, X.B. Ma, Y. Zhao, K.H. Pan, Effects of CO₂ concentration on carbon fixation capability and production of valuable substances by *Spirulina* in a columnar photobioreactor, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 56 (2021) 102310.
- [67] A. Vonshak, S.M. Cheung, F. Chen, Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (cyanobacteria) cells to light, *J. Phycol.* 36 (2000) 675–679.
- [68] F.J. Marquez, K. Sasaki, T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions, *J. Ferment. Bioeng.* 76 (1993) 408–410.
- [69] P.J.L. Williams, L.M.L. Laurens, Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics, *Energy Environ. Sci.* 3 (2010) 554–590.
- [70] A. Vonshak, A. Richmond, Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview, *Biomass* 15 (1988) 233–247.
- [71] E.A. Laws, K.L. Terry, J. Wickman, M.S. Chalup, A simple algal production system designed to utilize the flashing light effect, *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1983) 2319–2335.
- [72] A. Vonshak, A. Abellovich, S. Boussiba, S. Arad, A. Richmond, Production of *spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density, *Biomass* 2 (1982) 175–185.
- [73] K. Wagener, Mass cultures of marine algae for energy farming in coastal deserts, *Int. J. Biometeorol.* 27 (1983) 227–233.
- [74] L. Tomaselli, G. Torzillo, L. Giovannetti, B. Pushparaj, F. Bocci, M. Tredici, T. Papuzzo, W. Balloni, R. Materassi, Recent Research on *Spirulina* in Italy, Springer, Netherlands, Dordrecht, 1987, pp. 79–82.
- [75] C.M. Ek, La dissolution du carbonate de calcium, *Bulletin de la Société Géographique de Liège* 9 (1973) 55–87.
- [76] A. Vonshak, S. Laorawat, B. Bunnag, M. Tanticharoen, The effect of light availability on the photosynthetic activity and productivity of outdoor cultures of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), *J. Appl. Phycol.* 26 (2014) 1309–1315.
- [77] M. Welker, H. von Dohren, Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (2006) 530–563.
- [78] A.M. Burja, B. Banalgs, E. Abou-Mansour, J.G. Burgess, P.C. Wright, Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products, *Tetrahedron* 57 (2001) 9347–9377.
- [79] B. Blerot, L. Martinelli, C. Prunier, D. Saint-Marcoux, S. Legrand, A. Bony, L. Sarabere, F. Gros, N. Boyer, J.C. Caissard, S. Baudino, F. Jullien, Functional analysis of four terpene synthases in rose-scented *Pelargonium* cultivars (*Pelargonium x hybridum*) and evolution of scent in the *Pelargonium* genus, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1435.
- [80] T.D. Santos, B.C.B. de Freitas, J.B. Moreira, K. Zanfonato, J.A.V. Costa, Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 37 (2016) 216–220.
- [81] S. Bhavanimaya, S. Vishnupriya, M.S. Al-Aboudy, R. Vijayakumar, D. Baskaran, Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications, *Grain & Oil Science and Technology* 2 (2019) 49–55.
- [82] T. Lafarga, Effect of microalgal biomass incorporation into foods: nutritional and sensorial attributes of the end products, *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts* 41 (2019) 101566.
- [83] J.A.V. Costa, A.P.A. Cassurlaga, L. Moraes, M.G. Moraes, Biosynthesis and potential applications of terpenes produced from microalgae, *Bioresource Technology Reports* 19 (2022) 101166.
- [84] S. Gheda, E.H.F. Abd El-Zaher, A.M. Abou-Zeid, N.A. Bedair, L. Pereira, Potential activity of *Arthrospira platensis* as antioxidant, cytotoxic and antifungal against some skin diseases: topical cream application, *Mar. Drugs* 21 (2023).
- [85] T. Yamaura, S. Tanaka, M. Tabata, Participation of phytochrome in the photoregulation of terpenoid synthesis in thyme seedlings, *Plant Cell Physiol.* 32 (1991) 603–607.
- [86] M. Gouda, Z. Huang, Y. Liu, Y. He, X. Li, Physicochemical impact of bioactive terpenes on the microalgae biomass structural characteristics, *Bioresour. Technol.* 334 (2021) 125232.
- [87] M.S. Donia, E.W. Schmidt, Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family, *Chem. Biol.* 18 (2011) 508–519.
- [88] N. Ziemert, K. Ishida, P. Quillardet, C. Bouchier, C. Hertweck, N.T. de Marsac, E. Dittmann, Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 1791–1797.
- [89] X. Salvatella, J.M. Caba, F. Albericio, E. Giralt, Solution structure of the antitumor candidate trunkamide A by 2D NMR and restrained simulated annealing methods, *J. Organomet. Chem.* 69 (2003) 211–215.
- [90] C. Ireland, P.J. Scheser, Ulicyclamide and ulithiacyclamide, two new small peptides from a marine tunicate, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (2002) 5688–5691.
- [91] E.W. Schmidt, M.S. Donia, Chapter 23. Cyanobactin ribosomally synthesized peptides—a case of deep metagenome mining, in: *Methods Enzymol.* 458, 2009, pp. 575–596.
- [92] N. Leikko, L. Liu, J. Jokela, M. Wahlsten, M. Gugger, A. Calteau, P. Permi, C. A. Kerfeld, K. Sivonen, D.P. Fewer, Genome mining expands the chemical diversity of the cyanobactin family to include highly modified linear peptides, *Chem. Biol.* 20 (2013) 1033–1043.
- [93] W. Gu, S.-H. Dong, S. Sarkar, S.K. Nair, E.W. Schmidt, Chapter four - the biochemistry and structural biology of cyanobactin pathways: enabling combinatorial biosynthesis, in: B.S. Moore (Ed.), *Methods Enzymol*, Academic Press, 2018, pp. 113–163.
- [94] T. Le, W.A. van der Donk, Mechanisms and evolution of diversity-generating RIPP biosynthesis, *Trends in Chemistry* 3 (2021) 266–278.
- [95] C.M. Czekster, Y. Ge, J.H. Naismith, Mechanisms of cyanobactin biosynthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 35 (2016) 80–88.
- [96] J. Koehnke, A.F. Bent, D. Zollman, K. Smith, W.E. Housen, X. Zhu, G. Mann, T. Lebl, R. Scharff, S. Shirran, C.H. Botting, M. Jaspars, U. Schwarz-Linek, J. H. Naismith, The cyanobactin heterocyclase enzyme: a processive adenylase that operates with a defined order of reaction, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 52 (2013) 13991–13996.
- [97] J. Wang, Y. Chen, Role of the Zn(2+) motif of E1 in SUMO adenylation, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 23732–23738.
- [98] Y. Goto, Y. Ito, Y. Kato, S. Tsunoda, H. Suga, One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase, *Chem. Biol.* 21 (2014) 766–774.
- [99] F.J. Ortiz-Lopez, D. Carretero-Molina, M. Sanchez-Hidalgo, J. Martin, I. Gonzalez, F. Roman-Hurtado, M. de la Cruz, S. Garcia-Fernandez, F. Reyes, J.P. Deisinger, A. Muller, T. Schneider, O. Genilloud, Cacaoidin, first member of the new Lanthidin RIPP family, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 59 (2020) 12654–12658.
- [100] F. Roman-Hurtado, M. Sanchez-Hidalgo, J. Martin, F.J. Ortiz-Lopez, O. Genilloud, Biosynthesis and heterologous expression of Cacaoidin, the first member of the Lanthidin family of RIPPs, *Antibiotics* (Basel) 10 (2021).
- [101] J.A. McIntosh, M.S. Donia, E.W. Schmidt, Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 537–559.
- [102] P.G. Arnison, M.J. Bibb, G. Blerbaum, A.A. Bowers, T.S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D.J. Campopiano, G.L. Challis, J. Clardy, P.D. Cotter, D.J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P.C. Dorrestein, K.D. Entian, M. A. Fischbach, J.S. Garavelli, U. Goransson, C.W. Gruber, D.H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A.R. Horswill, M. Jaspars, W.L. Kelly, J. P. Klinman, O.P. Kuipers, A.J. Link, W. Liu, M.A. Marahiel, D.A. Mitchell, G. N. Moll, B.S. Moore, R. Muller, S.K. Nair, I.F. Nes, G.E. Norris, B.M. Olivera, H. Onaka, M.L. Patchett, J. Piel, M.J. Reaney, S. Rebuffat, R.P. Ross, H.G. Sahl, E. W. Schmidt, M.E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L.P. Smith, T. Stein, R. D. Sussmuth, J.R. Tagg, G.L. Tang, A.W. Truman, J.C. Vederas, C.T. Walsh, J. D. Walton, S.C. Wenzel, J.M. Willey, W.A. van der Donk, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature, *Nat. Prod. Rep.* 30 (2013) 108–160.
- [103] H. Liang, J.J. Lopez, M. Sanchez-Hidalgo, O. Genilloud, W.A. van der Donk, Mechanistic studies on dehydration in class V lanthipeptides, *ACS Chem. Biol.* 17 (2022) 2519–2527.
- [104] S. Sanchez, A.L. Demain, Metabolic regulation of fermentation processes, *Enzym. Microb. Technol.* 31 (2002) 895–906.
- [105] G. Awad, F. Mathieu, Y. Coppel, A. Lebré, Characterization and regulation of new secondary metabolites from *Aspergillus ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis, *Can. J. Microbiol.* 51 (2005) 59–67.