

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

THESE DE DOCTORAT

En Biotechnologie

Spécialité: Biotechnologie Végétale et Agroalimentaire

Thème

***Optimisation des méthodes d'extraction de la
phycocyanine à partir de la spiruline HTAM***

Par

LAFRI Imène

Devant le jury composé de :

S. SNOUSSI	(Professeur)	(USDB)	(Président)
L.BOUTEKRABT-BENHADJA	(Professeur)	(USDB)	(Directrice de thèse)
D.EL HADI	(Professeur)	(USDB)	(Examineur)
D.KHELIFI	(Professeur)	(ENSB)	(Examineur)
D.BOURAS	(Professeur)	(UHBC)	(Examineur)

Blida, Septembre 2018

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Pr SNOUSSI Sid Ahmed qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Sincère remerciements.

A Madame Pr BOUTEKRABT née BENHDJA Lynda qui m'a encadré et m'a fait le très grand honneur de me superviser de très proche. Je la remercie pour sa confiance et la patience dont elle a fait preuve. Quelle trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur Pr EL Hadi Djamel qui m'a fait l'honneur en prenant part à ce jury et en acceptant de l'examiner Sincères remerciements.

Je tiens à remercier le Professeur Douadi KHELIFI de l'école Nationale Supérieure de Biotechnologie Constantine, qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury. Merci d'avoir fait le déplacement et d'avoir examiné mon travail.

A Monsieur Pr Dilmi BOURAS qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury et en acceptant d'examiner mon travail. Sincères remerciements.

Un grand hommage et reconnaissance au personnel du Centre de Recherche des Régions Arides de Médenine Tunisie pour leur flexibilité, esprit scientifique et soutien.

Un remerciement particulier au Dr JEMNI Mounia Du centre de recherche des Oasis Degheuche Tunisie, pour m'avoir accueilli au sein de son service, et ses précieux conseils, je lui serai toujours reconnaissant.

Mes remerciements s'adressent également au staff technique du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'université de Limoges (Vincent Sol) pour leur aide et leur disponibilité.

Merci à ma famille à laquelle je dois cette réussite professionnelle,

À mes parents pour avoir fait ce que je suis.

Sans votre soutien à tous niveaux, je n'y serais jamais arrivée.

À ma Mère pour tous les conseils avisés.....

Et pour avoir fourni la matière première

À mon père pour m'avoir donné cette vocation et l'amour de la science

Ta vie est un modèle

Ce travail vous est dédié, en témoignage de mon affection

À ma très chère sœur Asma, mes frères Smail et Lyes ma belle sœur

Yasmina et mon beau-frère Maamar.

Mes anges : Anis, Alla et youyou

Pour avoir contribué à ma réussite.

Pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi

À tous mes ami(e)s de l'équipe Célia

Imène

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
REMERCIEMENT	7
TABLES DES MATIERES	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	13
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 01 : LA SPIRULINE	
1. GENERALITE	18
2. HISTORIQUE	19
3. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DANS LE MONDE	20
4. APPELATION	21
5. TAXONOMIE	21
6. MORPHOLOGIES ET CARACTERES GENERAUX	22
7. CYCLE BIOLOGIQUE	23
8. CULTURE DE LA SPIRULINE	24
8.1. Biologie de la micro-algue	24
8.2. Bases techniques de la production	25
8.3. Le milieu de culture	26
8.4. Lumière et agitation	27
8.5. Optimisation du rendement	28
8.6. Suivi des cultures	29
CHAPITRE 02 : LA SPIRULINE : UN ALICAMENT PAR EXCELLENCE	
1 . LEGISLATION	31
2. QUALITE NUTRITIONELLE	32

2.1 : Les protéines	32
2.2 : Les lipides	34
2.3 : Les glucides	35
2.4 : Les vitamines	36
2.4.1 Les vitamines hydrosolubles	37
2.4.2 Les vitamines liposolubles	40
2.5: Les minéraux et les oligoéléments	42
3 APPLICATION DE LA SPIRULINE	46
3.1 Domaine agro-alimentaire	46
3.1.1 Adjuvant de régimes amaigrissants	47
3.1.2 Domaine d'utilisation de la spiruline pour usage animal	48
3.2 Domaine de l'industrie cosmétique	49
3.3 Domaine de la santé	50

CHAPITRE 3 : LA PHYCOCYANINE

1. LES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA SPIRULINE	52
2. DEFINITION DE LA PHYCOCYANINE	55
3. LES METHODES D'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE	55
4. LES UTILISATIONS DE LA PHYCOCYANINE	56
5. PROPRIETES PHYSICO- CHIMIQUES DE LA PHYCOCYANINE	58

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJET DES TRAVAUX	60
MATERIELS ET METHODES	61
1. CARACTERISATION DES SOUCHES DE SPIRULINE	61

1.1 Matériel végétal	61
1.6 Analyses physico chimiques des souches de spiruline	63
1.6.1 Détermination du potentiel d'hydrogène pH	63
1.6.2 Détermination du taux de l'humidité	64
1.6.3. Détermination de la teneur en protéine (Méthode Kjeldhal)	65
1.6.4. Détermination du taux des cendres	66
1.6.5. Détermination de la teneur en sucres solubles (méthode d'anthrone)	67
1.6.6 Détermination de la teneur en matière grasse (NF V 03-905)	68
1.6.7 La composition en acides gras	69
1.6.8. Détermination des pigments	71
2. METHODES D'EXTRACTIONS DE LA PHYCOCYANINE	73
2.1 Extraction par l'eau	73
2.2. Extraction par sonification	73
2.3. Extraction par congélation	74
2.4. Extraction par solvant	75
2.5. Extraction par séparation aqueuse à double phase	76
2.6 Extraction par le glycérol	77
2.7 La conservation de la phycocyanine	77
3. CARACTERISATION DE LA PHYCOCYANINE OBTENUE	78
3.1 Activité antioxydante	78
3.2 Poly phénols totaux	80
3.3 Flavonoïde	82
4. FORMULATION ET CONCEPTION D'UNE CREME ANTIRIDE A BASE DE PHYCOCYANINE	83
4.1 La formulation	83

4.2 Analyses physico-chimiques	85
4.3 Analyses microbiologiques	95
5. ELABORATION DES CREMES ANTIRIDES TRANSDERMIQUES	101
5.1 Suivi de la stabilité de la crème élaborée	102
5.2 Test rhéologique	103
5.3 Etude microscopique des crèmes antiride à base de phycocyanine à 1%	104
5.4 Evaluation sensorielle	105

RESULTATS ET DISCUSSION

1. REACTIVATION DES SOUCHES DE SPIRULINE	108
2. PURIFICATION DE LA SPIRULINE	108
3. OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA SPIRULINE	108
4. RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOUCHES DE SPIRULINE	109
5. EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE	119
6. CARACTERISATION DE LA PHYCOCYANINE	123
6.1 Poly phénols totaux	123
6.2 Les Flavonoïdes	124
6.3 L'activité anti oxydante	125
6.4 Le Pouvoir réducteur	125
7. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES CONSTITUANTS DE LA CREME	127
7.1 Analyses physico-chimiques des matières premières	127
7.2. Analyses physico-chimiques du produit semi fini et du produit fini	132
7.3 Analyses microbiologiques des matières premières	132
7.4 Analyses microbiologiques du produit semi fini et produit fini	134
8. SUIVI DE LA STABILITE DU PRODUIT FINI	135

9 .RESULTATS ET DISCUSSION DES TESTS RHEOLOGIQUES	137
10. ETUDE MICROSCOPIQUE DE LA CREME ANTIRIDE A 1% DE PHYCOCYANINE	140
11. RESULTATS ET DISCUSSION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	140
12.EVALUATION SENSORIELLE	140
CONCLUSION GENERALE	144
PERSPECTIVES	147
APPENDICE	
LISTE DES ABREVIATIONS	
REFERENCES	
PUBLICATION	

TABLE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1: Morphologies typiques de la spiruline	22
Figure 2: Cycle biologique de la Spiruline	23
Figure 3 : Représentation schématique d'un phycobilisome classique	53
Figure 4 : Formule de la phycocyanine	55
Figure 5 : Spirulina Platensis Djerba (source : station de Djerba)	61
Figure 6: Spirulina Platensis Tamanrasset (source : station de Hiri)	61
Figure 7 : Les étapes de l'estérification de la spiruline	70
Figure 8: La phycocyanine lyophilisée	78
Figure 9 : Aspect microscopique de Spirulina Platensis (Gr : 100 .1,25 . 10 0,25)	108
Figure 10 : Profil des acides gras de Spirulina Platensis Algérienne	113
Figure 11 : Profil des acides gras de Spirulina Platensis Tunisienne	114
Figure 12 : Concentration et pourcentage de pureté de phycocyanine des souches algérienne et tunisienne	121
Figure 13: Extraction de la Phycocyanine (source : laboratoire de chimie industriel CRROT)	122
Figure 14: Extraction par macération avec le glycérol (source : laboratoire de Biotechnologie Végétale USDB)	122
Figure 15 : Concentration des polyphènes totaux issus de la phycocyanine algérienne	123
Figure 16: Concentration des polyphènes totaux issus de la phycocyanine tunisienne	123

Tableau 1 : Site géographique ou pousse naturellement la spiruline	21
Tableau 2 : Caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiées	54
Tableau 3 : Composition de la phase mobile pour l'étude des polyphénols par HPLC	82
Tableau 4 : Caractéristiques des matières premières (principes actifs et excipients)	84
Tableau 5 : Masse de la prise d'essai pour la mesure de l'indice d'acide	88
Tableau 6 : Masse de la prise d'essai pour la mesure de l'indice de saponification	90
Tableau 7 : Résultats des analyses physico-chimiques des deux souches de spiruline	109
Tableau 8 : Composition en acides gras de <i>Spirulina platensis</i>	114
Tableau 9 : Composition minérale de la poudre de la spiruline (mg/g)	118
Tableau 10 : Teneur en phytonutriments de <i>Spirulina Platensis</i>	119
Tableau 11 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline algérienne et tunisienne en fonction du mode d'extraction	120
Tableau 12 : Concentration en flavonoïdes pour la spiruline (algérienne et tunisienne)	124
Tableau 13 : Valeurs (en %) d'activité anti oxydante pour la spiruline (algérienne et tunisienne)	125
Tableau 14 : Pouvoir réducteurs des deux souches de phycocyanine	125
Tableau 16 : Résultats de l'EST% et H%	127
Tableau 17 : Teneur en cendre de la phycocyanine séchée en (MS%)	128
Tableau 18 : Indice d'acide des matières premières	128
Tableau 19 : Indice de réfraction des matières premières à 20°C	129
Tableau 20 : Valeurs du PH des matières premières	130
Tableau 21 : Indice de saponification des matières premières	130
Tableau 22 : Densité des matières premières	131
Tableau 23 : Analyses physico chimiques de l'eau	131
Tableau 24 : Viscosité et densité des produits semi fini et fini	132
Tableau 26 : Microbiologie de l'eau	133
Tableau 27 : Microbiologie des produits semi fini et fini	134
Tableau 28 : Modélisation	137
Tableau 29 : Résultats pour la crème de référence choisie	138
Tableau 30 : Résultats pour les crèmes antirides à base de phycocyanine algérienne et tunisienne	139
Tableau 31 : Evaluation sensorielle	141

RESUME

La spiruline (*spirulina platensis*) est une algue bleu-vert de par la présence de chlorophylle (vert) et de phycocyanine (bleu) contenue dans les phycobilisomes, eux-mêmes entourés dans les thylakoïdes. En raison de ses applications pharmaceutiques et alimentaires les méthodes d'extraction de la phycocyanine, pourraient constituer un facteur déterminant pour une récupération maximale des phycobiliprotéines dans l'état naturel des algues.

Nos travaux ont porté tout d'abord, sur la caractérisation de deux souches de spiruline, l'une provenant de la région de Tamanrasset (Algérie) et l'autre d'origine Tunisienne (de la région de Djerba). Puis, nous avons évalué plusieurs méthodes d'extraction de la phycocyanine issue de deux types de spiruline dans le but de pouvoir déterminer la méthode optimale en termes de rendement.

Six méthodes d'extraction ont été ainsi testées sur les deux souches de spiruline considérées : par l'eau, la congélation, la sonication, par solvant, par séparation de phase et enfin par macération avec le glycérol. Un effet significatif du pays de production sur la concentration d'extraction a été observé, quelque soit la méthode d'extraction utilisée.

L'extraction aqueuse à double phase a donné des rendements supérieurs comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant), (0,39 vs 0,19 mg/ml). Nous avons obtenu avec la spiruline algérienne 2,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de 0,62 mg/ml et une pureté de 1,37. Avec la spiruline tunisienne nous avons obtenu un rendement plus élevé de 50% avec une concentration de 1,90 mg/ml et une pureté de 2,3..

La deuxième partie de nos travaux a porté sur la formulation de crèmes anti rides transdermique à base de phycocyanine (0,5% ,1%, 2%, 5% et 10%). Plusieurs paramètres ont été considérés pour son contrôle tel que la mesure de PH, viscosité, densité et la recherche d'éventuels germes.

De même, un test rhéologique et un test de stabilité ont été entrepris afin de permettre la sélection de la ou les crèmes conformes pour une application et résistante au stockage. La crème antiride enrichie à 1% de phycocyanine semble représenter le produit fini pouvant être commercialisé car renfermant les caractéristiques recherchées.

Elle peut se conserver à des températures basses et ambiantes, par contre ses caractéristiques se modifient à des températures élevées.

Mots clés : spiruline, méthode d'extraction, phycocyanine, crème anti ride

SUMMARY

Spirulina (*Spirulina platensis*) is a blue-green algae by the presence of chlorophyll (green) and phycocyanin (blue) contained in phycobilisomes, themselves surrounded in thylakoids. Due to its pharmaceutical and food applications, phycocyanin extraction methods could be a determining factor for maximum recovery of phycobiliproteins in the natural state of algae. Our work focused first of all on the characterization of two spirulina strains, one from the region of Tamanrasset (Algeria) and the other of Tunisian origin (from the region of Djerba). Then, we evaluated several methods of phycocyanin extraction from two types of spirulina in order to be able to determine the optimal method in terms of yield.

Six extraction methods were thus tested on the two spirulina strains considered: by water, freezing, sonication, by solvent, by phase separation and finally by maceration with glycerol. A significant effect of the country of production on the extraction concentration was observed, regardless of the extraction method used. Double phase aqueous extraction gave higher yields compared to other methods (water, solvent) (0.39 vs 0.19 mg / ml). We obtained with Algerian spirulina 2.5 l of filtrate and 7.5 l of retentate and a phycocyanin concentration of 0.62 mg / ml and a purity of 1.37. With Tunisian spirulina we obtained a higher yield of 50% with a concentration of 1.90 mg / ml and a purity of 2.3 ..

The second part of our work focused on the formulation of phycocyanin-based transdermal anti-wrinkle creams (0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%). Several parameters were considered for its control such as the measurement of PH, viscosity, density and the search for possible germs. Similarly, a rheological test and a stability test were undertaken to allow the selection of the one or more creams that are compliant for an application and resistant to storage. The anti-wrinkle cream enriched with 1% phycocyanin seems to represent the finished product that can be marketed because it contains the desired characteristics. It can be stored at low and ambient temperatures, but its characteristics change at high temperatures.

Key words: spirulina, extraction method, phycocyanin, anti-wrinkle cream

ملخص

(سبيرولينا بلاتنسيس) هي طحالب خضراء زرقاء من خلال وجود الكلوروفيل (الأخضر) وفيكوسيانين (الأزرق) الواردة في phycobilisomes ، أنفسهم محاطة في الثايلاكويد. نظرًا لتطبيقاتها الدوائية والغذائية ، يمكن أن تكون طرق استخراج فيكوسيانين عاملاً حاسماً لأقصى قدر ممكن من استعادة phycobiliproteins في الحالة الطبيعية للطحالب.

ركز عملنا في المقام الأول على توصيف سلالتين سبيرولينا ، واحدة من منطقة تمرناست (الجزائر) والأخرى من أصل تونسي (من منطقة جربة). ثم قمنا بتقييم العديد من طرق استخراج فيكوسيانين من نوعين من السبيرولينا من أجل أن نكون قادرين على تحديد الطريقة المثلى من حيث العائد.

تم اختبار ستة طرق استخراج على سلالتين سبيرولينا النظر: من خلال المياه ، والتجميد ، صوتنة ، عن طريق المذيبات ، عن طريق فصل الطور ، وأخيراً عن طريق النقع مع الجلوسرين. لوحظ تأثير كبير لبلد الإنتاج على تركيز الاستخلاص ، بغض النظر عن طريقة الاستخراج المستخدمة.

أعطى الاستخراج المائي المزدوج المرحلة إنتاجية أعلى مقارنة بالطرق الأخرى (الماء ، المذيب) (0.39 مقابل 0.19 ملغم / مل). حصلنا على سبيرولينا الجزائري 2.5 لتر من الترشيح و 17.5 من retentate وتركيز فيكوسيانين من 0.62 ملغ / مل ونقاء 1.37. مع السبيرولينا التونسية حصلنا على محصول أعلى بنسبة 50٪ بتركيز 1.90 ملغم / مل ونقاوة 2.3.

ركز الجزء الثاني من عملنا على صياغة الكريمات المضادة للتجاعيد التي تحتوي على فيكوسيانين (0.5٪ ، 1٪ ، 2٪ ، 5٪ و 10٪). تم الأخذ بعين الاعتبار عدة عوامل للتحكم بها مثل قياس PH ، اللزوجة ، الكثافة والبحث عن الجراثيم المحتملة.

وبالمثل ، تم إجراء اختبار انسيابي واختبار استقرار للسماح باختيار واحد أو أكثر من الكريمات المتوافقة مع تطبيق ومقاومة للتخزين. يبدو أن كريم مكافحة التجاعيد المخصب بنسبة 1٪ من فيكوسيانين يمثل المنتج النهائي الذي يمكن تسويقه لأنه يحتوي على الخصائص المرغوبة.

يمكن تخزينه في درجات حرارة منخفضة ودرجة الحرارة المحيطة ، ولكن تتغير خصائصه عند درجات الحرارة المرتفعة.

الكلمات الرئيسية: سبيرولينا ، وطريقة الاستخراج ، وفيكوسيانين ، كريم المضادة للتجاعيد

INTRODUCTION

La plupart des micro-algues présentes dans l'eau marine et fraîche sont des algues vertes ou des algues bleu-vert. Ces algues utilisent l'énergie solaire, du dioxyde de carbone, et des minéraux au sein de l'eau pour croître avec un taux de croissance très élevé (Colla L.M et al ,2004). En outre, les micro-algues peuvent produire divers produits de la photosynthèse au cours de leur croissance.

Spirulina platensis, qui est une des algues bleu-vert, est connue pour sa richesse en nutriments.

En effet, elle est composée de 55% à 70% de protéines, 6% à 9% de matière grasse, de 15% à 20% de glucides et est riche en minéraux, vitamines, fibres et pigments. Elle appartient au groupe des cyanobactéries qui constitue une composante omniprésente de picophytoplancton maritime qui contribue de manière significative à la biomasse totale en carbone et la productivité primaire des océans (Chorus I, and Bartram J 2006).

Les phycobiliprotéines, que l'on regroupe généralement sous le terme phycocyanines, phycoérythrine et allophycocyanines constituent des protéines pigmentaires photosynthétiques présentes chez certaines algues (algues rouges et cryptophycées) et chez toutes les cyanobactéries (H.Ben Ouada et J. Ammar 2016).

Actuellement, ces pigments connaissent un regain d'intérêt. Cette tendance s'explique d'une part, par l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels eu égard aux impératifs sanitaires, écologiques et de protection de l'environnement et d'autre part, par l'évolution de la législation qui vise à favoriser les produits naturels par rapport à ceux de synthèse (H. Ben Ouada et J. Ammar 2016).

La phycocyanine est une protéine colorée trouvée exclusivement chez les algues bleues. Elle n'est pas synthétisable par voie chimique. Elle est largement indiquée pour colorer en bleu certains produits alimentaires (glacés ou sucrés du genre boissons glacés, crèmes glacées, pâtes, gâteaux et biscuits)(H. Ben Ouada et J.Ammar 2016).

Aussi, elle peut être introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires. Elle remplace avantageusement les pigments de synthèse considérés comme suspects.

Actuellement, les applications connues de la phycocyanine à une échelle industrielle se limitent à quelques produits alimentaires (les massepains; les jus sucrés; les glaces, sorbets et accessoirement des chocolats) ou à quelques formulations cosmétiques (crèmes et gels). (Mishima T et al ,2007). Les seules ventes de la phycocyanine sur le marché sont monopolisées par quelques compagnies (essentiellement japonaises) et n'arrivent à couvrir que 2% au maximum du marché américain de colorants naturels alimentaires. (H.Ben Ouada et J.Ammar 2016).

L'objet de nos travaux a porté sur la caractérisation de deux souches de *spirulina platensis* provenant de deux régions géographiquement différentes, l'une Algérienne (région de Tamanrasset) et l'autre Tunisienne (région de Djerba).

Puis, nous avons visé l'obtention d'une bonne masse de phycocyanine à partir des deux souches considérées.

Nous avons pour cela, procédé à une comparaison du rendement d'extraction de plusieurs méthodes d'extraction (par l'eau, la congélation, la sonication, par solvant, par séparation de phase et enfin par macération avec le glycérol) pour les deux souches tout en préservant leurs qualités intrinsèques.

Les phycocyanines obtenues étant caractérisées, nous avons proposé une formulation de crèmes anti rides. Ainsi, plusieurs essais à différentes concentrations (0,5% ,1%, 2%, 5% et 10%) ont été réalisés et de nombreux contrôles ont été opérés ; tels que mesure de PH, viscosité, densité et la recherche de certains germes pour le suivi de la qualité des crèmes élaborées.

La réalisation d'un test rhéologique nous a permis de sélectionner les crèmes conformes pour l'application. Enfin, une évaluation sensorielle de nos crèmes antirides à base de phycocyanine, a été réalisée à l'aide d'un jury naïf.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LA SPIRULINE

1. GÉNÉRALITÉS

La spiruline est définie comme un organisme microscopique bleu procaryote. Elle se présente sous la forme d'un filament dont la longueur moyenne du filament est de 250 μm lorsqu'il a 7 spires et son diamètre est d'environ 10 μm (Cruchot, 2008). Les cyanobactéries ou encore cyanophycées selon les préférences, sont la famille d'algues bleues-vertes à laquelle appartient la spiruline, qui elle-même peut être indifféremment appelée *Arthrospira* sp. ou *Spirulina* sp.. Contrairement aux algues et aux plantes également dotées d'un pouvoir photosynthétique, elle appartient à l'embranchement des procaryotes, car elle n'a pas de noyau bien individualisé. À noter que cette appartenance à la classe des cyanobactéries est récente. En effet, elle est longtemps restée classée parmi les «algues bleu-vert», et ce, pour plusieurs raisons (Fox D. et R., 1999) :

- sa morphologie proche de celle des algues, et son habitat aquatique,
- sa couleur liée à sa teneur en pigments bleu (phycocyanine) et vert (chlorophylle).
- la présence d'un système photosynthétique producteur d'oxygène.
- son aptitude à développer des biomasses importantes.

Il existe à ce jour 200 genres et environ 1 500 espèces de cyanobactéries connues mais étant très difficiles à détecter, il en reste sans doute encore beaucoup à découvrir. Du point de vue taxonomique, elles appartiennent à l'ordre des *Nostocales*, à la famille des *Oscillatoriaceae* et au genre *Arthrospira* (Scheldeman P et al, 1999).

En pratique, il faut retenir que le terme "Spiruline" correspond au nom commercial d'une espèce de cyanobactérie alimentaire appartenant toujours au genre *Arthrospira*. Le mot "Spirulina" est le nom commercial anglophone de la spiruline, mais il désigne également un genre de cyanobactérie assez éloigné de *Arthrospira*, et surtout non comestible (par exemple : *Spirulina major*, *Spirulina subtilissima*, *Spirulina princeps*, *Spirulina gigantea* ou *Spirulina subsalsa*) . (Fox , 1999)

2. HISTORIQUE

La spiruline est une très ancienne forme de vie, dont l'apparition sur terre remonte à près de 3,5 milliards d'années (Perez, 1997). La spiruline a contribué à l'enrichissement en oxygène et de quoi était déjà consommée par les Aztèques et les Mayas (Challem, 1999; Dardoize, 2010). Elle est avant tout destinée à devenir un complément alimentaire (Gaudez, 2007). Un des premiers êtres vivants à réaliser la photosynthèse ; récoltée et consommée depuis des siècles par le peuple tchadien des Kanembous (Afrique) et par les anciens Aztèques (Mexique, vallée du Texcoco), elle apparaît pour la première fois dans la littérature sous la plume de Cortès, qui en ses mémoires de conquérant, rédigées vers 1521, nous explique qu'elle était consommée sous forme de galettes obtenues par séchage au grand soleil. Redécouverte au Tchad en 1930 par un pharmacien des troupes coloniales françaises, elle attira en 1959 l'attention de Brandilly, anthropologue et cinéaste, qui lui consacra un article aussitôt oublié qu'écrit, malgré son titre prophétique : « Depuis des lustres, une tribu africaine du Tchad exploite la nourriture de l'an 2000 ». La spiruline, si elle est l'une des premières formes de vie terrestre, n'en a pas moins suscité que tardivement l'intérêt des scientifiques occidentaux (Girardin-Andréani, 2011). Depuis les années 80, la spiruline a fait l'objet de plusieurs dizaines d'études scientifiques, par des chercheurs du monde entier, et nous sommes encore loin de connaître tous les effets bénéfiques d'une consommation quotidienne de spiruline (Girardin-Andréani, 2011).

L'histoire de la spiruline au vingtième siècle est liée à celle d'un personnage tout à fait fascinant, Christopher Hill. Cet Américain s'aperçut que la spiruline, cette petite algue dont personne ne s'occupait à l'époque offrait une solution extraordinaire aux problèmes nutritionnels de notre temps. Facile à « cultiver », puisqu'elle pousse toute seule dès qu'il y a un peu d'eau et de soleil, la spiruline représente l'un des aliments les plus fabuleux qui existent sur terre (Schaller et Razanamahay, 2002 ; König, 2007).

3. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DANS LE MONDE

La spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (Castenholz et *al.*, 2001); son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud.

Aussi, sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande) (Tableau 1).

Cet organisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe.

Tableau 1 : Sites géographique où pousse naturellement la spiruline (Fox, 1999)

Noms des pays	Localisation précises
AFRIQUE	
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du Kanem : lacs latir, Ouna, Borkou,
Djibouti	Lac Abber
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Nakourou, Chiltu, Navasha
Congo	Mougounga
Tunisie	Lac Tunis, Chott El Jerid
ASIE	
Inde	Lacs Lonar et Nagpur, Lacs Twyn Ttaung
Thaïlande	Mares près de Lahore
Sri Lanka	Lac Beira
AMERIQUE DU SUD	
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas Presqu'île d'Amantani dans le lac Titicaca
Mexique	Lac Texcoco ; lacs Cratère
Uruguay	Montevideo
Equateur	Lac Quilotoa
AMERIQUE DU NORD	
Californie	Oakland ; Del Mar Beach
Haïti	Lac Gonâve
République Dominicaine	Lac Enriquillo
EUROPE	
France	Camargue

4. APPELLATION

Il faut retenir que le terme “Spiruline” correspond au nom commercial d’une cyanobactérie appartenant toujours au genre *Athrospira*. “*Spirulina*” est le nom commercial anglais de la même cyanobactérie (Fox, 1999 ; Legeard, 2005)..

La spiruline avait dans le passé, différentes appellations dont on peut citer (Fox, 1999) :

- La Potion magique : Mentionnée par Christophe Colomb ;
- Le Dihé : Par les Kanembous, tribu du Tchad (Donon, 1998);
- Le Tecuitlatl : Par les Aztèques

5. TAXONOMIE

La spiruline appartient à l’ordre des Nostocales (Oscillatoriales), la famille des Oscillatoriaceae, le genre *Oscillatoria* et le sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira* (Charpy *et al.*, 2008).

La spiruline est classée selon Ripley Fox (1999) dans :

Règne :	Monera
Groupe ou Sous Règne	Procaryotes
Embranchement	Cyanophyta
Classe	Cyanophyceae
Ordre	Nostocales (Oscillatoriales)

Les Nostocales sont des cyanophycées filamenteuses, unisériées, ramifiées (fausses ramifications simples ou géminées) ou non ramifiées. Elles se multiplient le plus souvent par hormogonies pluricellulaires et parfois par akinètes.

Les Oscillatoriaceae se caractérisent par des trichomes cylindriques, unisériées, simples, qui sont atténués parfois à l’apex par une courbure ou par la présence d’une coiffe, mais jamais en poils articulés. Les trichomes sont nus ou pourvus d’une gaine. Il n’y a pas de ramification et pas d’hétérocyste. Les trichomes sont libres, solitaires et dépourvus de gaine. Ils sont droits ou flexueux et parfois tordus en une hélice régulière. (Charpy *et al.*, 2008)

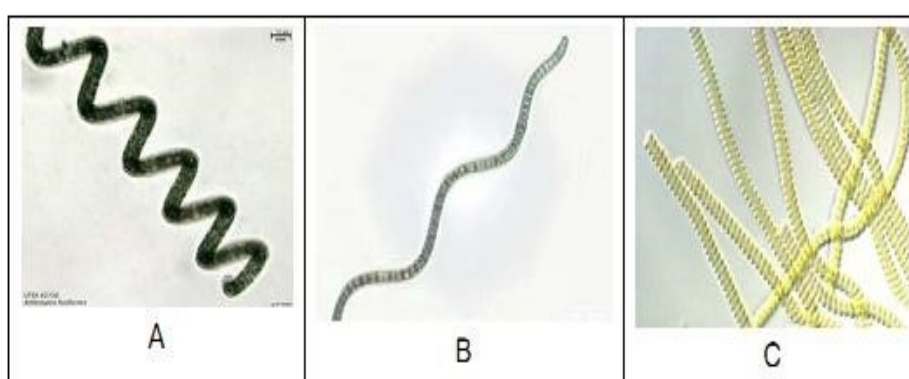
Le sous genre *Spirulina* qui groupe les espèces à trichome régulièrement enroulé en hélice plus ou moins serrée, soit une trentaine d'espèces dans les eaux douces en généra (Dardoise, 2010).

Leur déplacement s'effectue en se vrillant dans l'eau à la façon d'une vis. Les spirulines sont abondantes dans les eaux salées et natronées sahéliennes, et une espèce *Spirulina platensis* forme des fleurs d'eau particulièrement denses ; dans certaines régions du Tchad (Kanem) (Durand et Lévêque, 1980).

Cette micro-algue change de forme en fonction des caractéristiques physiques et chimiques du milieu dans lequel on la trouve. Mais on remarque aussi que dans un même milieu, on trouve des variétés de formes (Fox, 1999).

6. MORPHOLOGIE ET CARACTERES GENERAUX

La spiruline a une longueur moyenne de 250 μm quand elle possède 7 spires. Elle est composée de filaments mobiles (de 10 à 12 μm de diamètre) non ramifiés et enroulés en spirales, qui ressemble à un minuscule ressort à boudin, d'où le nom de «Spiruline». Cependant les spirulines présentent différentes formes. On trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites (Figure 1). Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat (Geitler, 1932 ; Charpy et al., 2008).



A = Forme spiralée (*Arthrospira fusiformis*) ; B= Forme ondulée (*Spirulina maxima*) ;

C = forme Spirulé *Arthrospira platensis*

Figure 1: Morphologies typiques de la spiruline (Charpy et al.,2008)

Plus précisément, la spiruline est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament ou trichome. L'enroulement du trichome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au dessus de la spirale. Les facteurs environnementaux tels la température auraient cependant une influence sur l'orientation de l'hélice. Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis (Muhling et *al.*, 2003).

Le système pigmentaire de la spiruline est constitué de chlorophylle a; de pigments hydrosolubles, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleu (phycocyanine) ; de caroténoïdes (β -carotène, cryptoxanthine) (Sakho et Crouzet, 2009).

7. LE CYCLE BIOLOGIQUE

Le filament de spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées nécriidies. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies (Figure 2).

Les hormogonies vont croître en longueur par division binaire (chacune des cellules va donner deux cellules par scissiparité) et prendre la forme typique hélicoïdale (Watanabe Y, 1995).

En conditions expérimentales, le temps de génération (passage d'une génération à une autre) maximal de la spiruline est de l'ordre de 7 heures (König, 2007 ; Feng et Yue, 2013).

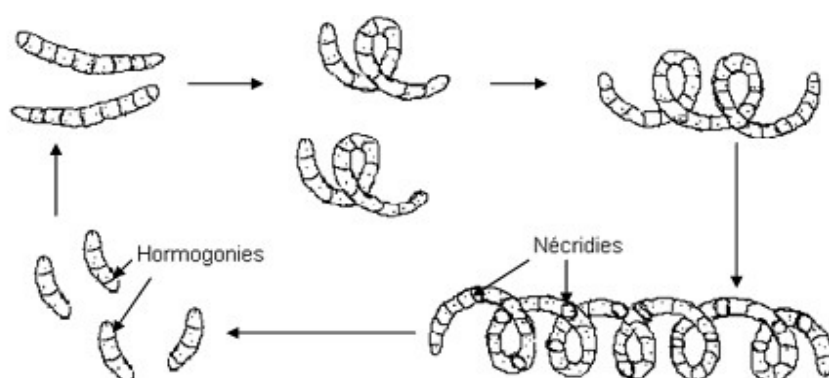


Figure 2: Cycle biologique de la spiruline (Charpy et *al.*, 2008)

8. CULTURE DE LA SPIRULINE

8.1. Biologie de la micro-algue

Les cyanobactéries, famille de microorganismes à laquelle on inclut la spiruline, sont des bactéries Gram négative, faisant le même type de photosynthèse que les végétaux supérieurs (Lindblad et *al.*, 1998).

Elles colonisent des milieux très divers : eau douce, eau de mer, eau saumâtre, et même en écosystème terrestre. Plusieurs d'entre elles peuvent fixer l'azote atmosphérique : ce sont les espèces à hétérocyste qui pullulent dans les étangs piscicoles riches en phosphate.

Certaines sont toxiques. D'autres, qui sont utilisées comme engrais, aliment, source d'énergie ou de produits chimiques présentent un intérêt économique véridique (Richmond, 1986 ; Watanabe et *al.*, 1995).

Comme les cyanobactéries se trouvent à la frontière du monde des végétaux et des bactéries, plusieurs définitions ont été attribuées à la spiruline. C'est un microorganisme à filaments bleu-vert, mobiles, composés de cellules cylindriques disposées en trichomes hélicoïdaux. Ces filaments tournent autour de leur axe ; la spiruline n'a pas d'hétérocyste, elle ne peut donc pas fixer l'azote libre. (Richmond, 1986).

La forme hélicoïdale du trichome, observable uniquement en milieu liquide qui caractéristique du genre, mais les paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur) varient selon les espèces, et même chez une même espèce (Richmond, 1986 ; Fox, 1996).

L'espèce mexicaine *Spirulina maxima* se caractérise par des trichomes de 7 à 9µm de diamètre, de 70 à 80µm de long, légèrement effilés aux extrémités, formant une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60µm de diamètre. Les cellules constituant des trichomes mesurent 5 à 7µm de long et ne rétrécissent pas au niveau des articulations (Fox, 1999).

L'espèce du Tchad *Spirulina platensis* se compose de trichomes atteignant 350µm de long, de 5 à 11µm de diamètre, un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50µm, diminuant légèrement vers les extrémités (Fox, 1999).

8.2. Bases techniques de la production

L'environnement doit comprendre une zone de température convenant à la plante, de la lumière fournissant l'énergie pour la photosynthèse, et de l'eau ; avec en plus en algoculture, un certain mouvement de l'eau pour assurer une répartition moyenne de la lumière et des éléments nutritifs.

Un équilibre acido-basique et un pH favorables à la plante doit être maintenu, un rythme de récolte et d'ajout d'éléments nutritifs doit être établi et la culture doit se faire dans un système ou un bassin convenablement conçu (Jourdan, 1997 ; Jourdan, 2012).

Dans le cas de la spiruline, la croissance optimale est obtenue pour une température de 25°C à 40°C, avec une population dense, un ensoleillement généreux, un pH de 8,5 à 10,5 ; les éléments nutritifs essentiels doivent être en quantité suffisante (le manque d'un d'entre eux inhibe la croissance), l'eau doit être suffisamment agitée (Jourdan, 2007).

Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduit à la photolyse des micro-algues. Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donne la croissance optimale.

Tous les filaments reçoivent des charges de lumière fréquentes et sont ensuite rapidement protégés d'une exposition trop longue par les autres filaments. En lumière et agitation faibles, la croissance est lente, mais la pigmentation plus marquée, c'est-à-dire que la couleur est d'un vert plus foncé et le bleu de la phycocyanine apparaît (Fox, 1999).

Le CO₂ étant moins soluble dans l'eau chaude que dans l'eau froide, l'élévation de la température réduit son taux, limitant la croissance. Une température trop basse réduit aussi la croissance. En absorbant le CO₂ par photosynthèse, les algues

remontent le pH. Le pH optimum pour la croissance de la spiruline est entre 8,5 et 10,5 (Jourdan, 2012).

8.3. Le milieu de culture

Les spirulines poussent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable (toutefois sans excès de chlore à défaut de tuer les algues) ou au moins filtrée, le plus important étant l'élimination des algues étrangères. Une eau dure produira des boues minérales (plus ou moins abondantes selon la teneur en calcium, magnésium et fer), qui décantent rapidement et n'encombrent pas particulièrement la culture, à condition que l'ensemencement initial en spirulines soit assez concentré.

La composition des milieux de culture peut varier énormément, selon la disponibilité des produits chimiques nécessaires à leur élaboration. Les limites de salinité et

d'alcalinité permises sont généralement assez larges mais on se place souvent vers les minima, cela pour des raisons d'économie et de productivité, avec une salinité totale de 13g/L ; lorsque le carbone est apporté par le bicarbonate (Jourdan, 1997).

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), mais ce dernier peut être remplacé en partie par de la soude caustique ou du carbonate de sodium (Na_2CO_3) pour relever le pH initial du milieu de culture (par exemple 5g/L de bicarbonate et 1,6 g/L de soude donnent un pH de 10) ; le carbonate ou la soude peuvent même être la seule source d'alcalinité à condition de les transformer en bicarbonates par addition de CO_2 ou par exposition à l'air avant usage. La salinité complémentaire est apportée par les différents engrais et du chlorure de sodium (Hassan et al, 1989). Le milieu de culture contenant des engrais va assurer la croissance des spirulines comme en agriculture habituelle: l'azote, le phosphore, le potassium sont les éléments classiques, mais le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau Leborn Y, 1986).

Une analyse de l'eau et du sel est utile pour calculer la dose de Mg, Ca et Fe à ajouter car un excès de ces éléments est nocif (perte de phosphore, floculation). L'eau, le sel et les engrais apportent généralement assez de micro-éléments (bore,

zinc, cobalt, molybdène, cuivre, etc.). Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite à respecter impérativement. C'est pourquoi on préfère souvent, au moins lors de la préparation du milieu de culture, utiliser un nitrate que l'on peut mettre à forte dose, constituant une réserve d'azote à long terme. Les spirulines consommeront d'abord l'ammoniac ou l'urée s'il y en a de disponibles (Jacquet G, 1974) . Une odeur persistante et forte indique qu'on a dépassé la limite en ammoniac et qu'il faut s'attendre à un mauvais état de la culture, passager ou irréversible selon la dose d'ammoniac présente (Jourdan, 1997).

8.4. Lumière et agitation

Comme en diminuant l'éclairement on diminue aussi la photosynthèse totale, il faut si possible éviter la photolyse autrement. Deux conditions sont nécessaires.ensemencer le bassin avec assez d'algues pour que la lumière ne puisse pas atteindre le fond du bassin.

La vérification peut se faire avec un simple disque de Secchi. Agiter suffisamment la culture pour que les filaments individuels ne restent pas plus d'une demi-minute à la surface en plein soleil, mais plongent et remontent fréquemment (Jourdan et al, 2012).

Les roues à aubes constituent les systèmes d'agitation les plus utilisés; le but est de remuer l'eau et non de créer un dénivellement comme on le croit généralement (Fox, 1999).

L'emploi de longues roues à aubes flottantes est tout à fait possible dans de grands bassins peu profonds, car plus le bassin est grand, plus il est difficile de maintenir une roue à aubes conventionnelle. Au-delà de 4 à 5 m de longueur, il faut un palier intermédiaire qui sera dans le courant. Avec un bassin garni d'un film plastique, c'est difficile à réaliser en gardant l'étanchéité. La solution des longues roues est moins chère et demande moins d'énergie. Théoriquement, la photosynthèse la plus rapide serait obtenue avec une cadence des cycles ombre – lumière de mille par seconde ou plus. Pour le moment, ce n'est possible qu'en laboratoire (Konig C, 2007) . On peut tout de même obtenir une alternance de lumière et d'ombre toutes les quelques

secondes, en mettant des déflecteurs dans le courant d'eau pour induire des turbulences; ainsi, on peut tripler facilement la production de biomasse - environ 30 g d'algue sèche par m² et par jour – par rapport à celle d'un bassin simplement agité par une roue à aubes (Fox, 1999).

8.5. Optimisation du rendement

La turbulence induite ramène le risque de photolyse pratiquement à rien. Après le couple de paramètres lumière/agitation, reste la température. Comme tout être photosynthétique, la spiruline perd de la biomasse sous forme de CO₂ pendant la respiration. Cette perte est plus grande si l'eau est plus chaude.

Si la température nocturne est basse, il y a peu de perte de la biomasse produite pendant le jour. Le mieux serait une nuit froide et un réchauffement immédiat de l'eau au lever du soleil pour avoir une photosynthèse maximale pendant le jour, en tenant compte que la spiruline présente une croissance optimale à 35°C. Comme elle possède des pigments aptes à absorber l'énergie de tout le spectre visible, la photosynthèse est là à son maximum.

Si on crée une turbulence à l'aide de déflecteurs creux, dans lesquels circule de l'eau chaude au lever du soleil, la photosynthèse démarre tout de suite à plein quand il faudrait environ 3 heures pour que l'eau soit suffisamment chauffée par le soleil seul.

Avec ces améliorations, la production d'un bassin enrichi en CO₂ et agité par des roues à aubes peut être considérablement améliorée. 10 g d'algue sèche par jour et par m² est un chiffre fréquent chez les producteurs commerciaux. Comme signalé précédemment, les déflecteurs peuvent tripler cette production. Si la culture est chauffée au lever du soleil, elle produit pendant un temps allongé de 30%. En ajoutant la moindre perte pendant la nuit, on peut compter sur environ 40g d'algue sèche/m /j (Fox, 1999).

8.6. Suivi des cultures:

Le diagnostic des couleurs fournit généralement une bonne appréciation de l'état de la culture, une couleur pâlie indique souvent un manque d'azote fixé et/ou de CO₂ et aussi, que du magnésium est nécessaire. Si l'examen au microscope ne montre qu'une couleur pâlie, il faut vérifier le pH. Une couleur pâlie, surtout manquant de pigment bleu (phycocyanine), avec un pH en dessous de 10,5, indique le manque d'azote fixé.

Si la couleur pâle est due à des cellules « vides », la culture a probablement été stressée, soit par un changement brusque de pH, soit surtout par une brusque modification de la pression osmotique dans les cellules. (Fox et al, 1999).

S'il y a de l'écume, cela peut indiquer qu'en essayant d'équilibrer la pression dans les cellules avec celle du milieu brusquement plus chargé, la cellule a concentré son cytoplasme en expulsant les molécules plus légères.

Dans ce cas, il faut ramener la salinité totale à son niveau d'origine. Bien des algues mourront si le choc osmotique a été sévère. D'autres survivront et redémarreront la culture à la nouvelle salinité. Le problème est d'éliminer les cellules mortes et les polysaccharides gélatineux libérés dans l'eau. Les masses gélatineuses piègent les filaments d'algues vivants, et finalement les entraînent au fond, où ils meurent faute de lumière et d'accès aux éléments nutritifs. (Fox et al, 1999 ; Clement, G., Rebeller, M., 1974).

Une agitation renforcée de la culture aide à maintenir à flot les polysaccharides et aide aussi les filaments à ne pas être pris dans les amas de polysaccharides, où les algues mourront. Les bactéries consommeront les polysaccharides, seront à leur tour consommées par les protozoaires. Ceux-ci mourront quand ils auront dévoré les bactéries au point de dépenser plus d'énergie à les poursuivre qu'ils n'en tirent de leur absorption.

Dans les conditions les plus sévères: forte intensité lumineuse, sursaturation en oxygène et faible température, on peut perdre la culture en quelques heures. Une agitation renforcée peut réduire la concentration en oxygène et si possible la culture doit être ombragée. Quand la lumière est très intense, il faudra aussi une

température élevée (38°C), une population dense et une forte agitation (turbulence) de la culture. (Fox et al, 1999 ; Clement, G., Rebeller, M., 1974).

Ces conditions favorisent la meilleure productivité. Une couleur jaunâtre avec écume peut signifier que les parois des cellules sont rompues, en expulsant des polysaccharides dans l'eau. Là aussi, il faut ombrager. Pour de petits bassins, on peut employer du filet plastique noir comme dans les serres horticoles, ou du tissu, ou des feuilles de palmier. On peut aussi abaisser le pH en jouant sur le CO₂ ou le bicarbonate et ajouter de l'azote fixé et du potassium. Si la culture est jaunâtre sur un fond d'eau grisâtre ou laiteux, les algues souffrent d'un défaut de carbone et peut-être d'azote, et de plus il y a beaucoup de bactéries.

Quand il n'y a plus de polysaccharides pour les bactéries, elles meurent. S'il n'y a pas de couleur, les algues sont piégées dans des amas de polysaccharides et entraînées au fond ou prises dans des cristaux de carbonate de calcium ou de phosphate. Ou peut-être ont-elles été dévorées par des prédateurs : larves de moustiques, larves d'*Ephydra* (mouche des marais salés), protozoaires tels l'amibe et les rotifères. Il n'y a rien d'autre à faire que de nettoyer le bassin et recommencer. Moins de filaments peut être le signe d'une récolte trop poussée : le poids journalier de la récolte doit être constant ou en augmentation. (Fox et al, 1999 ; Clement, G., Rebeller, M., 1974).

CHAPITRE 2 : LA SPIRULINE, UN ALICAMENT PAR EXCELLENCE

En 1940, Dangeard mentionnait pour la première fois l'importance de l'utilisation des spirulines dans l'alimentation humaine. Il s'en suivait en 2006, où l'agence spatiale européenne à utiliser la spiruline dans ses longues missions sur la Lune: "Se cultivant facilement, la spiruline est directement comestible, pouvant être produite sur la Lune ou Mars ». C'est sur elle qu'avait reposé en partie la survie de l'équipage» expliquait Christophe Lasseur, chef du projet spatial Melissa.

1. LEGISLATION

La spiruline répond à la législation sur les compléments alimentaires. Un décret a permis de fournir un cadre juridique complet pour les compléments alimentaires en transposant dans le droit national la majeure partie de la directive européenne n° 2002/46/CE. Ce nouveau décret n° 2006/352 du 20 mars 2006, publié au Journal Officiel du 25 mars 2006, reprend la définition européenne des compléments alimentaires :

« On entend par compléments alimentaires, les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité » .

L'étiquetage de ces produits doit comprendre la dénomination de vente de

« Complément alimentaire », ainsi que d'autres informations comme le mode d'emploi détaillé, la dose journalière recommandée, la liste de toutes les substances utilisées lors de la fabrication, les précautions d'emploi. Dans plusieurs états africains, une autorisation de mise sur le marché (AMM) est prévue pour la distribution de la spiruline.

2. QUALITE NUTRITIONNELLE.

La composition nutritionnelle de la spiruline dépend des éléments chimiques dont elle dispose dans le milieu. La plupart des études des constituants de la spiruline ont été réalisées sur *Spirulina platensis* (connue aussi sous l'appellation de *arthrospira platensis* ou *S. geitler*). Cette espèce sert de référence car sa composition est relativement constante même si elle varie selon la souche, les conditions de culture et le mode de conditionnement (Pierlovisi G,2008).

2.1 Protéines

Les protéines sont indispensables à l'être humain car elles lui apportent des éléments essentiels à la vie : les acides aminés. Ceux-ci sont à la base des cellules qui composent notre corps. Certains de ces acides aminés sont dits essentiels car l'organisme ne peut pas les synthétiser, seule l'alimentation peut les apporter.

Le rôle des protéines est multiple: la croissance, la reproduction, la nutrition, l'immunité (système de reconnaissance et de défense de l'organisme) leur sont liées. Les protéines jouent donc un rôle dans la défense de l'organisme qui les transforme en anticorps, elles sont aussi nécessaires à la fabrication des enzymes qui effectuent les réactions chimiques à l'intérieur de l'organisme. Parce que les cellules vieillissent et meurent et qu'il lui faut sans cesse en créer de nouvelles, le corps humain a sans cesse besoin de protéines, d'autant plus qu'il ne peut pas en faire des réserves à la différence des lipides et des glucides (Leonard G 1967).

Les principales sources de protéines dans notre alimentation sont : les viandes, les poissons, les œufs, les produits laitiers, et les légumes secs. Avec une teneur en protéines à hauteur de 55 à 70 %, la spiruline est plus riche en protéines que la plupart des aliments courants. Pour comparaison, dans la viande et le poisson la moyenne est de 15-20 %, dans le soja, 35 % et les œufs, 12 %. (Babadzhanov A.S.et al, 2004).

D'un point de vue quantitatif, la spiruline est donc un aliment de choix pour un apport protéique majeur et d'autant plus que la digestibilité de ses protéines, accrue par

l'absence de paroi cellulosique des cellules, s'élève entre 75 et 83%. (Charpy L et al, 2006).

D'un point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels y figurent (excepté le tryptophane mais évoqué dans certaines publications tel que Fox *et al.* (1999) et représentent entre 47 et 60% du poids total des protéines (Babadzhanov A.S. et al, 2004).

Le spectre large en acides aminés essentiels et non-essentiels apportés par la spiruline explique la haute valeur biologique de cette cyanobactérie.

Les protéines de la spiruline apportent un pourcentage non négligeable en acides aminés essentiels pouvant parfois couvrir la quasi-totalité des besoins recommandés par la FAO, pour exemple, les acides aminés phénylalanine et tyrosine qui sont apportés à plus de 73% par rapport à la valeur recommandée par la FAO.

La spiruline présente l'avantage d'avoir un spectre en acides aminés essentiels large dont l'optimum pourrait être facilement atteint par complémentation alimentaire à l'aide d'une source d'acides aminés adéquat qui font défauts comme par exemple l'apport de céréales ou d'oléagineux (riz, blé, mil, sésame...). (Babadzhanov A.S. et al, 2004).

Bien que la composition en acides aminés de la spiruline soit idéale, pour devenir une source alimentaire de premier choix, il est nécessaire que ces protéines soient assimilables par l'organisme. Cette caractéristique peut être déterminée par le calcul de l'efficacité protéique (PER). Ce PER se calcule comme le rapport « Gain de poids de l'animal ou de l'individu / poids de protéines ingérées ». (Babadzhanov A.S. et al, 2004).

Les protéines de références sont la lactalbumine ou la caséine, lesquelles présentent un PER de 2,5. La spiruline seule, au cours d'expériences menées sur le rat, a un PER de 1,90, tandis qu'accompagnée de riz dans une proportion égale, cette valeur s'élève à 2,40 (Anusuya D.M et al, 1983).

2.2. Lipides

Outre un rôle énergétique évident, avec un rendement calorique de 9 kcal/g, les lipides présentent également un rôle structural essentiel en contribuant au maintien de l'architecture cellulaire. Cependant le rôle majeur des lipides présents dans la spiruline, est fonctionnel.

En effet, la composition lipidique de la spiruline se caractérise d'une part par un bon équilibre acides gras saturés/acides gras insaturés et d'autre part, la présence d'acides gras polyinsaturés dits essentiels (AGE).

On range actuellement les acides gras essentiels en deux groupes (oméga-3 et oméga-6) caractérisés par la position de l'insaturation la plus proche du groupe méthyle terminal. (Wong GN et al, 2006).

Pour la famille des oméga-6, la position de la première double liaison par rapport au CH₃ terminal se situe entre les positions 6 et 7 et pour la famille des oméga-3, la position de la première double liaison par rapport au CH₃ terminal se situe entre les positions 3 et 4.

Cette présence est bénéfique car ces acides vont jouer un rôle sur l'activité des fonctions cibles de l'organisme, directement ou indirectement impliqués dans l'état de santé et de bien être de l'homme. Ces A.G.E contribuent à la synthèse des eicosanoïdes, tel que les prostaglandines, le thromboxane et les leucotriènes, médiateurs impliqués dans le processus immunitaire et inflammatoire.

Les eicosanoïdes dérivent des acides gras essentiels de la famille des oméga-6 et de la famille des oméga-3 par l'intermédiaire de dérivés supérieurs (acide arachidonique, acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA) (Jacotot B., Campillo B).

Autre particularité de *Spirulina platensis*, la présence d'acide gamma-linoléique, acide gras à haute valeur alimentaire, rare dans les aliments courants. Cet acide gras essentiel du groupe des oméga-6 est présent en quantité relativement élevée de 20,3 % (Tableau 8) et jusqu'à 40 % , soit environ 4 % du poids sec selon certains auteurs (Hudson B.J.F. et Karis I.G 1974) .

La spiruline peut être considérée comme l'une des meilleures sources connues d'acide gamma-linoléique, après le lait humain et quelques huiles végétales peu courantes et fort chères (huiles d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre) (Falquet J. et Hurni J-P , 2008).

Normalement synthétisé chez l'homme à partir de l'acide linoléique (omega-6) d'origine végétale, l'acide gamma-linoléique peut être directement assimilé avec profit en cas d'insuffisance endogène. En effet, souvent lors du vieillissement ou par carence héréditaire, l'enzyme Δ -6- desaturase vient à manquer et par conséquent diminue la production de prostaglandines, donc l'efficacité du système immunitaire. Ainsi, une consommation de spiruline, riche en acide gamma-linoléique, permettrait de shunter l'action de l'enzyme défaillante et de restaurer la production de prostaglandines. (Falquet J. et Hurni J-P , 2008)

2.3. Glucides

Les glucides, indispensables au fonctionnement des muscles et du cerveau, constituent la source d'énergie la plus rapidement utilisable par l'organisme et sont impliqués dans l'anabolisme des protéines. Les glucides ont donc un rôle essentiellement énergétique. Certains glucides ont un rôle dit de "constitution".

Ils rentrent dans la composition de tissus fondamentaux de l'organisme : les cartilages, les acides nucléiques, le mucus, les substances antigéniques. Constituant une part importante de la matière sèche de la spiruline (15 à 25%), les polysaccharides qui la composent, offrent une énergie rapide sans fatiguer le pancréas et avec une perte minime en insuline (Babadzhanov A.S et al, 2004).

Les glucides simples sont eux en très faible quantité, ce qui est plutôt un avantage sur le plan diététique. Outre ce rôle énergétique, les hydrates de carbone sont nécessaires pour les échanges hormonaux de protéines et de lipides. D'un point de vue plus thérapeutique, les polysaccharides de la spiruline présentent de multiples intérêts, notamment dans la stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN, dans son effet radio-protecteur et dans la neutralisation des radicaux libres. Les glucides contenus chez la spiruline sont donc à leur échelle un constituant bénéfique pour l'homme.

2.4. Vitamines

Les vitamines sont des substances sans valeur énergétique mais vitales. A l'exception de deux d'entre elles (vitamines K et D), l'homme n'est pas capable de les fabriquer et leur apport par l'alimentation est primordial pour le fonctionnement harmonieux de l'organisme. Contrairement aux macronutriments (protéines, glucides ou sucres, lipides ou graisses) elles exercent leurs actions a très faibles doses. On distingue deux groupes de vitamines :

- les vitamines liposolubles sont solubles dans les graisses et l'organisme peut les mettre en réserve. Elles sont essentiellement apportées par les aliments d'origine animale et les huiles végétales. Ce sont les vitamines A, D, E et K

- les vitamines hydrosolubles sont solubles dans l'eau et ne sont pas stockées dans l'organisme (à l'exception de la vitamine B12) ; leurs apports doivent donc être assurés quotidiennement par notre alimentation. Ces vitamines sont apportées par la quasi-totalité des groupes d'aliments (viande, poisson, œufs, produits laitiers, céréales, fruits et légumes). Ce sont la vitamine A, la vitamine C et les vitamines du groupe B (B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8, B9 et B12).

Chaque vitamine exerce un rôle bien spécifique. Globalement, elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques : construction (croissance, développement du squelette...), fonctionnement et entretien (transformation et utilisation des macronutriments, vision, coagulation du sang, systèmes musculaire, nerveux, immunitaire, fabrication d'ADN, antioxydants...).

Le rôle d'un apport adéquat en vitamines dans la prévention de nombreuses pathologies (maladies liées au vieillissement, maladies cardiovasculaires, cancers) est de plus en plus démontré, mais la surconsommation de vitamines peut avoir des effets néfastes à long terme (Cnerma-Afssa, 2001).

2.4.1. Vitamines hydrosolubles

Les vitamines hydrosolubles sont principalement les vitamines du groupe B. Les vitamines du groupe B sont des cofacteurs impliqués dans tous les métabolismes, la synthèse des hormones et des enzymes, la transmission de l'influx nerveux, la production d'énergie, le système immunitaire.

a) Vitamine B1

La thiamine mise en circulation sous forme libre est rapidement phosphorylée en TPP ou carboxylase. La TPP est le coenzyme d'un grand nombre de systèmes enzymatiques intervenant dans les réactions de trans-cétolisation et la décarboxylation oxydative du cycle de Krebs et autres acides α -cétoniques.

La thiamine joue un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides et celui de l'alcool. Le métabolisme de la vitamine B1 interfère soit directement, soit par l'intermédiaire de voies métaboliques plus ou moins complexes avec celui des vitamines B2, B6, PP, acide pantothénique et les folâtres.

Une carence en vitamine B1 est cause de béribéri, cette maladie se caractérise par des symptômes neurologiques dans sa forme sèche ou cardiaques dans sa forme humide. Le béribéri reste présent dans de nombreux pays où la dénutrition est présente (Cnera-Afssa, 2001).

b) Vitamine B2

La vitamine B2 ou riboflavine intervient sous forme de 2 coenzymes, le flavine mono nucléotide (FMN) et le flavine adénine di nucléotide (FAD) qui jouent un rôle dans :

- le catabolisme des acides gras, celui de certaines acides amines et celui des bases puriques
- la transformation du succinate en fumarate (entrée dans le cycle de Krebs)
- la chaîne respiratoire

Une carence en vitamine B2 est exceptionnelle dans les pays développés. Elle est responsable de symptômes cutaneo-muqueux (dermites, chéilite, stomatite) et de symptômes oculaires (sécheresse, infections cornéennes) (Cnera-Afssa,2001)

c) Vitamine B3

Les fonctions biochimiques de la vitamine B3 ou PP ou niacine reposent essentiellement sur une action en tant que coenzyme. Elle intervient dans le mécanisme de respiration cellulaire.

En synergie avec la vitamine B12, elle contribue aussi à la synthèse de l'ADN et de l'ARN et est donc indispensable à la fabrication des cellules sanguines. C'est une vitamine antianémique. (Cuny A, 2005).

d) Vitamine B5 (absente dans spiruline)

Appelée aussi acide pantothénique, elle est un des constituants du coenzyme A dans sa partie structurale. Par ce biais, cette vitamine joue un rôle essentiel à la formation de certaines hormones et substances régulatrices du système nerveux. Elle joue un rôle nécessaire dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides.

Une carence en vitamine B5 est exceptionnelle car on la trouve dans de nombreux aliments. Les premiers signes sont des désordres neuromoteurs, une asthénie, des douleurs et brûlures des extrémités. (Cnera-Afssa, 2001) .

e) Vitamine B6

La vitamine B6 ou piroxydine participe à de nombreux systèmes enzymatiques catalysant la synthèse et la dégradation des acides aminés, la synthèse des neurotransmetteurs, la dégradation du glycogène musculaire, le métabolisme du tryptophane et la synthèse de l'hème (Jacotot B., Campillo B., 2003).

f) Vitamine B8 (absente dans spiruline)

La vitamine B8 ou biotine est nécessaire à la synthèse des acides gras et à la dégradation des protéines et des glucides en molécules plus petites. Elle contribue également au maintien de la thyroïde et des glandes surrénales, du système nerveux, de l'appareil reproducteur et de la peau . (Jacotot B., Campillo B., 2003).

g) Vitamine B9

La vitamine B9 ou acide folique intervient dans le métabolisme des acides aminés (dont la méthionine à partir de l'homocystéine) et des acides nucléiques (acide thymidilique nécessaire à la production d'ADN). Son rôle métabolique est donc essentiel pour les cellules à renouvellement rapide principalement. Elle est donc nécessaire à la formation des globules rouges, de certaines protéines et de matériel génétique contenu dans le noyau cellulaire (Jacotot B., Campillo B., 2003). Une carence peut aboutir à une anémie macrocytaire ou des problèmes liés à la formation du fœtus lors de la grossesse (Cnera-Afssa, 2001).

h) Vitamine B12

La vitamine B12 ou cobalamine intervient dans la formation de l'ADN et des globules rouges sains. Elle participe également au maintien du système nerveux et est essentielle au maintien d'une bonne fonction mentale (Jacotot B., Campillo B., 2003). La carence en vitamine B12 (anémie pernicieuse) provient soit d'un défaut d'apport alimentaire en cette vitamine (cas de régimes végétaliens stricts) soit d'un défaut d'absorption.

i) Vitamine C

La vitamine C intervient dans deux grands types de réactions :

Les réactions d'hydroxylation d'une part, nécessaires à la synthèse du collagène (hydroxylation de la lysine et de la proline), des catécholamines (DOPA et noradrénaline) et de la carnitine essentiellement, et les réactions d'oxydoréduction

d'autre part, où elle joue principalement un rôle réducteur (réduction des nitrites et du fer ferreux...).

De plus elle intervient dans les réactions radicalaires, comme piègeur de radicaux libres et intervient grâce à ses propriétés anti oxydantes dans le système immunitaire de l'organisme . (Cnera-Afssa, 2001).

En conclusion :

Bien que la spiruline ne couvre pas la totalité des besoins, elle dispose d'une balance vitaminique optimale pour la plupart des complexes en vitamine B, notamment pour une consommation chez le jeune enfant. Seules les vitamines B5 et B8 sont absentes chez la spiruline.

Il faut toutefois souligner la teneur exceptionnelle en vitamine B12 (cobalamine) qui est de loin la vitamine la plus difficile à obtenir dans un régime sans viande car aucun végétal courant n'en contient. L'apport de seulement quelques grammes de spiruline permettrait de couvrir la totalité des besoins en vitamine B12.

2.4.2. Vitamines liposolubles

a) Vitamine A et provitamine A

Dans l'alimentation de l'homme, la vitamine A existe sous forme de rétinol et de ses esters, exclusivement présents dans les produits animaux, et sous forme de caroténoïdes pro vitaminiques, majoritairement d'origine végétale.

Ces différentes formes présentent aussi des fonctions variées. Le rétinol est la forme de transport et un produit intermédiaire du métabolisme, le rétinal, est un élément indispensable intervenant dans la vision, l'acide rétinoïque exerce une action marquée sur la prolifération et la différenciation des tissus tels que l'épithélium respiratoire, la muqueuse digestive, la peau, les différentes cellules notamment embryonnaires.

Le beta carotène ou provitamine A, a une action antioxydant particulièrement efficace, fondamentale au niveau cellulaire, membranaire et surtout nucléaire . (Cuny A, 2005).

Une carence en vitamine A, problème de sante publique majeur dans les pays en voie de développement, se traduit par des atteintes oculaires (héméralopie,

xérophtalmies et cécité irréversible), elle s'accompagne d'une baisse sensible des défenses immunitaires notamment chez le jeune enfant. L'avitaminose A est également un facteur de mortalité maternelle dans les régions pauvres (Cnera-Afssa, 2001).

b) Vitamine D

La vitamine D agit après conversion en 1,25-di-hydrox-vitamine D, son métabolite actif principal. Deux actions essentielles sont exercées par ce métabolite : assurer une minéralisation optimale des tissus minéralisés pendant et après la croissance et contribuer au maintien de l'homéostasie du calcium et du phosphore au niveau rénal, osseux et intestinal (Cnera-Afssa, 2001).

Une carence en vitamine D induit principalement un défaut de minéralisation du squelette (ostéomalacie chez l'adulte et rachitisme chez l'enfant) et des troubles cliniques dus à l'hypocalcémie (convulsions, laryngospasme, crise tétanique...)

c) Vitamine E

La vitamine E ou tocophérol a comme principale propriété de piéger et d'empêcher la propagation des radicaux libres peroxydes, formés à partir des acides gras polyinsaturés par l'action de l'oxygène. C'est donc un protecteur des lipides membranaires et des lipoprotéines (Cnera-Afssa, 2001).

Une carence vraie en vitamine E est exceptionnelle chez l'homme adulte. Son incidence est plus importante chez l'enfant et surtout le prématuré, en raison de réserves corporelles très faibles. Dans de cas, une anémie hémolytique peut être observée.

d) Vitamine K (absente dans la spiruline)

Le terme vitamine K regroupe un ensemble de cofacteurs nécessaires à l'activation de protéines dont les plus connues ont un rôle important dans la coagulation sanguine.

Les teneurs de cette vitamine dans la spiruline ne sont pas connues mais les besoins de l'homme adulte étant compris entre 0,1 et 1 µg/j, ils sont largement couverts par une alimentation même faible car elle se trouve principalement dans les feuilles des légumes verts, les produits laitiers et la flore intestinale.

La beta carotène ou provitamine A est présent dans des quantités largement suffisantes pour couvrir plus de 3 fois les besoins quotidiens sans être toxique pour l'homme. Ce caroténoïde est convertible par l'homme en vitamine A dont les besoins sont estimés a moins de 1g par jour. Bien que, chez l'humain, la conversion provitamine A - vitamine A soit d'environ 20 % seulement, ce taux est suffisant pour couvrir les besoins quotidiens (Tableaux 16 et 17). La biodisponibilité des caroténoïdes de la spiruline a été démontrée chez l'homme. (Gireesh T, et al, 2001).

La vitamine E est présente en quantité comparable a celle des germes de blé et couvre près de 50 % des besoins de l'enfant pour une dose quotidienne de 10 g de spiruline. Il faut tout de même souligner que les carences en vitamines peuvent provenir soit d'un défaut d'apport alimentaire en cette vitamine (cas de régimes végétaliens stricts) soit d'un défaut d'absorption. (Youdim et al, 2000.)

Dans ce dernier cas, un supplément de vitamines par la spiruline ne pourra être donné par voie orale, seules des injections permettront d'améliorer durablement l'état du patient.

2.5. Minéraux et oligoéléments

2.5.1. Minéraux et oligoéléments indispensables

Les minéraux entrent dans la composition intime de tous les tissus du corps. Ils se trouvent en quantités considérables dans certaines structures telles que les os, les dents, les ongles et, pour une moindre part, dans les muscles, le sang, etc. Quant aux oligoéléments, malgré leur faible dosage, ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. On les classe en deux catégories :

- Les éléments minéraux majeurs ou macroéléments comprenant le sodium (Na), le potassium (K), le chlore (Cl), éléments qualifiés d'électrolytes, ainsi que le calcium (Ca), le phosphore (P) et le magnésium (Mg) ;
- Les oligoéléments ou éléments traces, comprenant le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), l'iode (I), le sélénium (Se), le chrome (Cr), le molybdène (Mo), le fluor (F), le cobalt (Co), le silicium (Si), le vanadium (V), le nickel (Ni), le bore (B), l'arsenic (As).

a) Fer et spiruline

Présent en quantité élevée d'environ 1g/kg, la spiruline est une source en fer non négligeable couvrant la quasi totalité des besoins (Tableau 18), d'autant plus que le fer contenu est hautement assimilable.

La biodisponibilité du fer de la spiruline a été démontré par une étude menée par Johnson sur des rats carencés, les rats ayant consommé de la spiruline avaient absorbé 60 % de fer de plus que le groupe qui recevait une supplémentation en fer (Sall M.G , 1999) . Cette biodisponibilité a aussi été démontrée chez l'homme (Puyfoulhoux G et al, 2001). Cette dernière étude démontre que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande, ce qui est exceptionnel pour un fer non-hémique.

Selon les mêmes travaux, le taux de formation de ferritine après digestion de spiruline serait plus de six fois plus élevé que dans le cas d'une même quantité de fer apporté par digestion de viande. (Puyfoulhoux G et al, 2001)

La spiruline est donc potentiellement une bonne source alimentaire en fer pour lutter contre les anémies ferriprives. De plus, les aliments présentant cet avantage sont rares, ainsi pour comparaison, les céréales complètes n'en contiennent que 150 à 250 mg/kg (Falquet J et Hurni J-P, 2008).

L'organisme adulte renferme 4 g de fer. Il joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques. Il intervient dans la constitution de l'hémoglobine (pigment respiratoire des globules rouges qui assure les échanges gazeux avec le milieu extérieur), de la myoglobine (pigment respiratoire du muscle) et d'enzymes

jouant un rôle capital dans de nombreuses fonctions métaboliques (Cnera-Afssa, 2001).

Les pertes basales journalières de fer varient, chez l'adulte, de 0,9 à 1 mg. Pour les femmes, de la puberté à la ménopause, la médiane des pertes menstruelles se situe entre 25 et 30 ml par mois, ce qui correspond à des pertes en fer de 12,5 à 15 mg par mois, soit 0,4 à 0,5 mg/j, qui viennent s'ajouter aux pertes basales habituelles.

L'absorption du fer non hémique (non incorporé dans la structure de l'hème) est très variable, souvent très inférieure à 10 % et dépend de la nature du repas. Certains facteurs favorisent ou compromettent la biodisponibilité du fer non hémique. Selon l'action de ces facteurs, l'absorption du fer d'un repas peut varier de 1 à 20%.

b) Zinc et spiruline

Le zinc intervient dans l'activité de plus de 200 enzymes, notamment celles qui participent à la protection contre les radicaux libres et celles qui sont impliquées dans la synthèse protéiques (d'où son importance dans les phénomènes de renouvellement des cellules, de cicatrisation et d'immunité).

La spiruline cultivée sans apport intentionnel de zinc au milieu de culture n'en contient généralement que des traces (21-40 µg/g), alors qu'on peut en trouver dans certaines spirulines naturelles près de 400 µg/g (Campanella L et al, 1999).

Ces valeurs sont insuffisantes pour que ces spirulines puissent être considérées comme de bonnes sources de zinc, car les apports nutritionnels conseillés (ANC) sont de 0,6 à 6 mg/j chez un nourrisson/enfant (ces variations dépendent du type de régime alimentaire associé), de 10 à 13 mg/j pour un adolescent et de 10 à 12 mg/j chez l'adulte.

c) Calcium et spiruline

Outre son action sur la minéralisation osseuse, ce cation joue un rôle de second messager indispensable à tous les échanges cellulaires et dans le couplage électromécanique des membranes cellulaires. La quasi-totalité (99 %) du calcium corporel (1,0 à 1,2 kg) se trouve dans le squelette et la calcémie est maintenue constante aux dépens du calcium échangeable de l'os.

Les besoins calciques de l'organisme se réduisent donc aux besoins de l'os. Chez l'homme adulte, le besoin minimum d'entretien est estimé à 260 mg de Ca par jour, reparti entre les pertes urinaire (130 mg), fécale (110 mg) et sudorale (20 mg). La quantité de calcium retenue dans le squelette est variable et peut atteindre 400 mg par jour au moment du "pic" pubertaire. Il est admis que la minéralisation osseuse maximale génétiquement possible est acquise avant 18 ans, même si une certaine consolidation peut se poursuivre jusqu'à 30 ans.

Ce pic de masse osseuse, dont l'acquisition est favorisée par une forte consommation de calcium (en majorité apportée par le lait et les produits laitiers) pendant l'enfance et l'adolescence, détermine le risque ultérieur d'ostéoporose. Le fœtus retient environ 20 g de calcium pendant le dernier trimestre de la grossesse, soit en moyenne 220 mg par jour. Pour une teneur de 320 mg de Ca par litre de lait et un volume journalier de 800 ml, le besoin moyen de lactation est de 250 mg de Ca par jour. (Cnera-Afssa, 2001).

c) Phosphore et spiruline

Le phosphore est presque exclusivement présent sous forme de phosphates de calcium, de sodium, de potassium dans l'organisme. Il participe à la formation d'hydroxapatite au niveau des os. Sous la forme d'esters phosphoriques (dont l'ATP), il intervient dans la mise en réserve et le transport de l'énergie. Le phosphore est aussi un élément important de toutes les cellules (nucléotides, acides nucléiques) et membranes biologiques (phospholipides). Le corps humain adulte contient environ 700g de phosphore dont 85 % environ associés au calcium dans le squelette et les dents (Cnera-Afssa).

Les besoins en phosphore selon les individus sont présentés dans le tableau ci-après mais d'une manière générale, les apports nutritionnels conseillés varient entre 350 et 850 mg/j selon l'âge. La spiruline est riche en phosphore et permet un apport de 9 mg/kg et couvrirait plus de 20 % des besoins du jeune enfant si celui-ci en mangeait seulement 10g par jour.

d) Magnésium et spiruline

Le magnésium est le second cation intracellulaire présent à 60 % dans les os et le cofacteur de plus de 300 systèmes enzymatiques. Il est nécessaire à la fois à la formation de substrats (MgATP) et à l'activation d'enzymes.

Il joue un rôle dans un grand nombre de fonctions cellulaires, notamment celles impliquant la phosphorylation oxydative, la glycolyse, la transcription de l'ADN et la synthèse protéique. En quantité d'environ 25 g dans le corps humain, le besoin moyen en Mg est de 5 mg.kg⁻¹.j⁻¹ quel que soit le sexe (Cnera-Afssa, 2001).

La spiruline est donc une bonne source en magnésium car pour un apport de seulement 10 g par jour, elle couvre entre 8 et 34 % des besoins du jeune enfant.

Calcium, phosphore et magnésium sont présents en quantités comparables voire supérieures à celles trouvées dans le lait, la spiruline est de ce fait bénéfique pour lutter contre la décalcification osseuse.

3. APPLICATIONS DE LA SPIRULINE

En 1999, Borowitzka, M.A. avait montré la possibilité de faire pousser l'algue dans l'espace sous microgravité avec des fibres optiques. Cette fraction magique a été également utilisée dans le traitement des effluents industriels et comme source d'énergie durable et de biocarburant (HO M.W, 2006).

3.1 Domaine Agro-alimentaire

L'industrie agroalimentaire, utilise les spirulines pour l'alimentation animale et la fabrication d'aliments diététiques destinés aux régimes hyperprotéiques : la spiruline fait partie des innovations de la technologie agro-alimentaire.

En agriculture ou biologie, le groupe des cyanobactéries produit une variété de métabolites secondaires dans leur milieu de culture (Harrigan, G.G et al 2002.). Beaucoup de ces produits naturels ont des activités antibiotiques, algicide, antiviral et fongicide (Mundt, S et al 2001) .

En aquaculture, la spiruline est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage, plus souvent soumis à des infections virales et/ou bactériennes que les poissons sauvages. Ainsi, Watanuki et al., 2006 ont mis en évidence l'effet immunostimulant de *Spirulina platensis* chez la carpe *Cyprinus carpio*.

La spiruline est utilisée pour ses pigments :

- En aquariophilie pour accentuer la coloration des poissons d'ornement .
- En aquaculture pour améliorer la pigmentation des crevettes et des poissons
- En agroalimentaire pour rendre les œufs et la chair de poulet plus attrayants au consommateur par les caroténoïdes qu'elle contient.

3.1.1. Adjuvants de régime amaigrissant

La spiruline, grâce à son apport naturel et équilibré en vitamines, minéraux et oligo-éléments, peut donc être considérée comme une véritable alliée pour les personnes qui veulent entamer un régime. De plus, par son effet détoxifiant, elle aide à éliminer les toxines. (Gutteridge GM et al 2000).

Ainsi , après quelques jours d'utilisation, l'effet énergisant de la spiruline fait que la personne, non seulement ne se sent pas fatiguée (puisqu'elle n'est pas carencée), mais en plus elle se sent plus dynamique qu'avant le début de son régime. Cette constatation émane de nombreux témoignages de femmes (et d'hommes aussi) qui l'ont testée (Algosopette.com 2010) .

Par ailleurs, la prise de 5 à 10 g de spiruline 20 à 30 minutes avant les repas, entraîne un sentiment de satiété lequel facilite le suivi d'un régime hypocalorique. Ce phénomène est lié à sa teneur en phénylalanine (2,8 g pour 100 g de matière sèche) : cet acide aminé est métabolisé dans l'intestin en phényléthylamine, laquelle déclenche la sécrétion d'une hormone (la cholécystokinine) qui donne au cerveau un signal de satiété, c'est en quelque sorte un coupe-faim naturel et sans danger. (Ballinger,A .B 1994) .

3.1.2. Utilisation de la Spiruline pour usage animal

La spiruline est utilisée dans les domaines d'élevage : comme un complément alimentaire pour les animaux (favoriser la croissance et la fertilité et pour augmenter la pigmentation des animaux), Elle est vendue comme additif à la nutrition des taureaux, elle donne une robe plus brillante chez les chevaux et exerce une action énergisante. (Henrikson R , 2000)

Des études sur les poissons d'aquarium tels le *Xiphophorus helleri* et la crevette *Fenneropenaeus chinensis*. Kim, C, G et al, 2006 ont montré les effets bénéfiques de spirulina platensis. Ainsi l'influence bénéfique de la spiruline sur la croissance et l'incorporation de spiruline dans les poulets de chair a été étudié par (Razafindrajaona , 2008).

En aquaculture, la spiruline est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage plus souvent soumis à des infections virales. Watuniki et al , 2006 ont mis en évidence l'effet immunostimulant de spirulina platensis chez la carpe *Cyprinus carpio*.

Chez les chiens et les chats, la spiruline permet d'améliorer l'état de la peau et des poils et d'éviter les carences en calcium. (Henrikson R , 2000) La dose dépend du poids de l'animal . Elle prévient les infections respiratoires chez les lapins. (Henrikson R , 2000). Surmonte la fatigue physique et les états de stress en période de mue chez les oiseaux et favorise un plumage doux et solide (Pastre G, 2007).

Actuellement, ces pigments connaissent un regain d'intérêt. Il existe en effet à l'heure actuelle une forte tendance de substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Cette tendance s'explique d'une part, par l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels pour des impératifs sanitaires, écologiques et de protection de l'environnement et d'autre part, par l'évolution de la législation qui vise à favoriser les produits naturels par rapport à ceux de synthèse. Cet état de fait explique l'accroissement considérable de la demande du marché en colorant naturels (Boldirev, 2005).

Plusieurs colorants naturels disponibles sur le marché font apparaître un manque considérable de colorants bleus. Les seuls indiqués sont la Chamazulène (extraite des fleurs de la camomille) et l'Indigo (issu de la fermentation des feuilles de l'indigotier).

La disponibilité de ces deux colorants reste cependant en deçà des besoins du marché, en raison des faibles rendements d'extraction qui ne dépassent pas pour les deux cas 0,1 % du poids sec. Parmi les phycobiliprotéines, la phycocyanine détient un monopole de fait en raison de sa couleur bleue unique.

3.2 Domaine de l'industrie cosmétique :

On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles (Fabius, 1998, Ciferi, 1983).

La spiruline, en cosmétique applicable, constitue un véritable allié pour la beauté, utilisée pour la variété de couleurs qu'elle peut donner lors de son mélange avec d'autres composées. Depuis de nombreuses années, elle rentre ainsi dans la composition de rouges à lèvres et de crayons pour souligner les yeux, les cheveux retrouvent vigueur et brillance, tandis que les ongles fortifiés cassent moins facilement (Bergendi et al, 1999).

La fabrication des pommades, des masques, des savons, des gel-douches et des crèmes à base de spiruline donnent à la peau toutes ces vertus grâce à sa richesse en éléments nutritifs essentiellement la phycocyanine, qui est le seul pigment bleu naturel qui ne soit ni cancérigène ni toxique (Chopra A et al, 2007). On attribue à cela une activité anti-inflammatoire, hépatoprotectrice et détoxifiante, protectrice contre les radiations, une action activatrice sur le système immunitaire provoquant une augmentation de la réponse de l'organisme, une action anti-radicalaire et une activité anti-oxydante exceptionnelle (Dupire, 2010).

En cosmétique, la spiruline est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge, par son action sur le renouvellement cellulaire et la tonicité des tissus. (Spolaore, P et al 2006) .

La phycocyanine extraite de la spiruline est aussi utilisée dans le domaine de la cosmétologie, elle rentre ainsi dans la composition de rouges à lèvres et de crayons pour souligner les yeux. (Henrikson,R 2000) ainsi, en utilisant de la spiruline en complément d'une alimentation équilibrée, la peau devient plus nette et fraîche, les cheveux retrouvent vigueur et brillance, tandis que les ongles fortifiés cassent moins facilement . (Merceron, M, 2006)

De façon un peu plus détaillée, sa teneur en vitamine A permet un bronzage plus rapide et plus uniforme au soleil.

à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment

Sa teneur en vitamine B5 permet à la peau de conserver son hydratation et sa souplesse ; elle aide aussi à renforcer les cheveux contre les agressions chimiques et mécaniques. La vitamine B8, en diminuant l'excrétion de sébum, réduit la principale cause de chute des cheveux (Delattre et al, 2005) .

3.3. Domaine de la santé :

La spiruline renferme une teneur élevée en acide qui exerce une action thérapeutique importante sur le derme : atténuation de certains phénomènes inflammatoires (notamment après des brûlures) et amélioration de la qualité des cicatrisations cutanées. Cet acide étant très rare dans la nature (onagre, bourrache, cassis), son extraction à partir de la spiruline pourrait constituer une offre intéressante pour l'industrie cosmétique (Haliwell , 1995), .

La spiruline, grâce à son apport naturel et équilibré en vitamines, minéraux et oligo-éléments, peut donc être considérée comme une véritable alliée pour les personnes qui veulent entamer un régime. De plus, par son effet détoxifiant, elle aide à éliminer les toxines. (Merceron, M , 2006)

Après quelques jours d'utilisation, l'effet énergisant de la spiruline fait que la personne, non seulement ne se sent pas fatiguée (puisqu'elle n'est pas carencée), mais en plus elle se sent plus dynamique qu'avant le début de son régime. Cette constatation émane de nombreux témoignages de femmes (et d'hommes aussi) qui l'ont testée (Merceron, M, 2006) .

Par ailleurs, la prise de 5 à 10 g de spiruline 20 à 30 minutes avant les repas, entraîne un sentiment de satiété lequel facilite le suivi d'un régime hypocalorique (Lee GB et al, 2004). Ce phénomène est lié à sa teneur en phénylalanine (2,8 g pour 100 g de matière sèche) : cet acide aminé est métabolisé dans l'intestin en phényléthylamine, laquelle déclenche la sécrétion d'une hormone (la cholécystokinine) qui donne au cerveau un signal de satiété ; c'est en quelque sorte un coupe-faim naturel et sans danger. (Ballinger, A .B 1994) .

La spiruline dite potion magique a révolutionnée tous les domaines que ce soit médical par ses propriétés thérapeutique potentielle, en se basant sur la composition de cette micro-algue et les études sur les activités de ses composantes, depuis peu, certains chercheurs étudient les effets de la spiruline qui semble être un excellent antiviral. Un anti herpes, un anti bactéries, un anti-inflammatoire et lutte aussi contre le HIV-1 (Charaf et al. 2010). Elle baisse le taux de cholestérol et des lipides sanguins. Son effet hypo-glycémiant a été prouvé (Ray et al, 2007) ainsi que son effet contre l'hypertension artérielle (Mani., 2000).

Cette portion magique stimule le système immunitaire elle aurait une activité anti-tumorale et peut induire à un mécanisme d'apoptose des cellules cancéreuses donc prévient et régresse l'activité cancéreuse (Rasool, 2009).

Toutefois, elle exerce une activité anti-oxydante, une activité protectrice contre les radiations en stabilisant l'ADN, une activité sur la flore intestinale (Wu, 2007). Elle provient l'anémie (Ribadeneira et al, 2000).

La spiruline, possède une propriété de réduire les métaux lourds et des substances néphro-toxique de l'organisme (Misbahuddin, 2006). C'est un hépato-protecteur (Wu, 2007), lutte contre toxicité cardiaque (Khan, 2006), empêche le développement de l'athérosclérose (Mascher et al, 2005), elle est anti-plaquette, anti cataracte ; prévient la rhinite allergique voire même le parkinson (Man, 2009). L'efficacité de la spiruline

pour perdre de poids (Ho, 2006), paradoxalement, elle permet une meilleure croissance de la musculature et du bien-être corporel (Voltarelli et De Mello, 2008). La spiruline est unique dans le règne végétarien ou végétalien car elle apporte toutes les protéines importantes et de très bonnes qualités, elle évite aussi les carences en nutriments (très utilisée en malnutrition). Il faut bien noter que la spiruline n'est pas un médicament ni un traitement médical (Mundt, 2001).

CHAPITRE 3 : LA PHYCOCYANINE

1. LES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA PHYCOCYANINE :

Les cyanobactéries possèdent une large variété de composants colorés incluant les caroténoïdes, les chlorophylles et les phycobiliprotéines.

Les phycobilisomes sont attachés en matrices régulières à la surface externe de la membrane du thylacoïdal, siège de la photosynthèse. Leur principale fonction est de servir de récepteur des rayons lumineux pour l'appareil photosynthétique de la spiruline et convertir cette énergie lumineuse en énergie électrochimique ; ces macro-complexes protéiques sont composés d'un cœur sur lequel sont fixées des projections radiales (ou bras). Pour la spiruline, le cœur est composé de molécules d'allophycocyanine entourées de molécules de phycocyanine périphériques (Zhang , 1994).

Les phycobiliprotéines, dont fait partie la phycocyanine, sont des chromoprotéines constitués d'une partie protéique et d'un pigment. Leur agrégation en complexe macromoléculaire forme le phycobilisome.

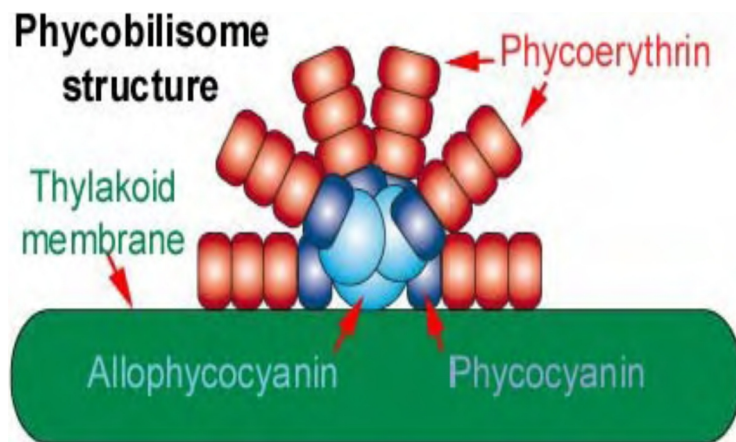


Figure 03 : Représentation schématique d'un phycobilisome classique

Les phycobiliprotéines sont constituées d'une partie protéinique de haute masse moléculaire portant, par des liaisons covalentes, des **chromophores à noyau tétra pyrrolique ouvert**, responsables de leur couleur (Handelman et al, 1991).

Les principaux chromophores décrits sont :

- la phycocyanobiline,
- la phycoérythrobliline,
- la phycourobiline
- la cryptovioiline.

Chacun d'eux présente un spectre d'absorption spécifique modifié par les interactions avec l'apoprotéine (Zhigang, 1997). Les principales phycobiliprotéines sont :

- l'allophycocyanine (APC),
- les phycocyanines (CPC),
- les phycoerythrines (R-PE et B-PE)
- la phycoerythrocyanine (PEC).

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiées :

Tableau N° 2 : Caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiés

Phycobiliprotéine	Maximum d'absorption (nm)	Maximum d'émission (nm)	Masse moléculaire (daltons)	Coefficient d'extinction molaire (cm-1.M-1)	Rendement quantique
R-PE	565, 545 (épaulement), 498	576	240000	1,96 x 10 ⁶	0,84
B-PE	545, 565, 498 (épaulement)	576	104000	0,7 x 10 ⁶	0,98
APC	652, 620 (épaulement)	660	240000	2,41 x 10 ⁶	0,68
C-PC	615	647	220000	1,54 x 10 ⁶	0,81
PEC	575	625	100000	0,85 x 10 ⁶	

La partie protéique ou apoprotéine est formée par deux sous-unités protéiques α et β de 15 à 20 kDa formant un hétérodimère appelé aussi « monomère ». Les groupes bilins ou phycobilines constituant le chromophore correspondent à des groupements prosthétiques linéaires isométriques de type tétrapyrrole.

Ils sont classés selon leur configuration moléculaire qui diffère par la disposition des doubles liaisons et leur confère des propriétés spectroscopiques nettement distinctes visualisée par une absorbance significative dans les UV.

- la phycourobiline de couleur orange absorbe dans le bleu-vert,
- la phycoerythrobiline de couleur rouge absorbe dans le vert,
- la phycobilivoline absorbe dans l'orange
- la phycocyanobiline de couleur bleue absorbe dans le rouge.

Les classes de phycobiliprotéines se distinguent par l'un de leur chromophore appelé "accepteur terminal d'énergie" :

- Pour les phycoérythrine, c'est toujours une phycoerythrobiline.
- Pour la phycocyanine, la phycoerythrocyanine et l'allophycocyanine, ce chromophore est toujours une phycocyanobiline .

2. DEFINITION DE LA PHYCOCYANINE :

La phycocyanine est le principal pigment de la spiruline (10 à 20% du poids sec). Il se représente sous forme d'extrait liquide, il est un des rares colorants alimentaires naturels de couleur bleue. Il est vendu sous le nom de (linabule ou sérum bleu). Il est constitué d'une structure protéique reliée à un chromophore : molécule de phycocyanobiline constituée du groupe bilin. Ce dernier est constitué du noyau tétra pyrrolique de la chlorophylle ouvert et sans magnésium. (Gupta et al , 2011).

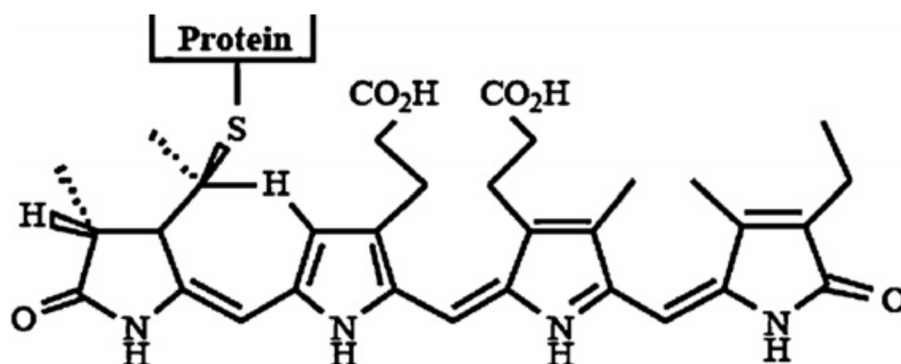


Figure 4 : Formule de la phycocyanine.

3. LES METHODES D'EXTRACTIONS DE LA PHYCOCYANINE :

Divers chercheurs ont mis au point plusieurs méthodes pour l'extraction et purification de la phycocyanine citant (l'eau, congélation, extraction par des solvants,...).

Cependant, presque toutes ces méthodes d'extraction impliquent de nombreuses étapes de précipitation, centrifugation et dialyse dans la purification initiale, et la chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie de filtration sur gel sont utilisés dans la purification finale (Kitagawa et al, 2004).

Inconvénient majeur de ces protocoles est le grand nombre d'étapes impliqués, et il est connu que plus le nombre de marches plus haut plus la perte de rendement du produit n'est élevé. En outre, la mise à l'échelle de ces méthodes est difficile et cher. Il convient de noter que 50-90% du coût de production réside dans les

étapes de purification. Par conséquent, il est nécessaire de chercher des méthodes efficaces de bio séparation à grande échelle, qui permettront d'atteindre de hautes puretés, ainsi que rendement élevé, tout en maintenant l'activité biologique des molécules. Une méthode de purification telle qui répond à tous ces critères est l'extraction aqueuse à deux phases extraction (ATPE) (Ganapathi et Raghavaro, 2007).

4 LES UTILISATIONS DE LA PHYCOCYANINE :

Divers aliments renfermant de la phycocyanine extraite de spirulines, sont commercialisés sous la marque "Linablue" créée par le groupe Dainippon Ink and Chemicals. Nous pouvons citer par exemple (Cruchot, 2008):

- des chewing-gums
- sorbets
- sucettes glacées
- Bonbons
- boissons sans alcool
- gelées
- produits laitiers

La phycocyanine est une protéine colorée trouvée exclusivement chez les algues bleues. Elle n'est pas synthétisable par voie chimique. Elle est largement indiquée pour colorer en bleu certains produits alimentaires glacés ou sucrés du genre boissons glacés, crèmes glacées, pâtes, gâteaux et biscuits, etc.).

Elle peut-être, introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires. Elle remplace avantageusement des pigments de synthèse considérés comme suspects.

A l'heure actuelle, les applications connues de la phycocyanine à échelle industrielle se limitent à quelques produits alimentaires (les massapains; les jus sucrés; les glaces, sorbets et accessoirement des chocolats) ou à quelques formulations cosmétiques (crèmes et gels).⁵⁷

Les seules ventes de la phycocyanine sur le marché sont monopolisées par quelques compagnies (essentiellement japonaises) et n'arrivent à couvrir que 2% au maximum du marché américain de colorants naturels alimentaires.

Actuellement, ces pigments connaissent un regain d'intérêt. Il existe en effet à l'heure actuelle une forte tendance de substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Cette tendance s'explique d'une part, par l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels pour des impératifs sanitaires, écologiques et de protection de l'environnement et d'autre part, par l'évolution de la législation qui vise à favoriser les produits naturels par rapport à ceux de synthèse.

Cet état de fait explique l'accroissement considérable de la demande du marché en colorants naturels. Plusieurs colorants naturels disponibles sur le marché font apparaître un manque considérable de colorants bleus. Les seuls indiqués sont la Chamazulène (extraite des fleurs de la camomille) et l'Indigo (issu de la fermentation des feuilles de l'indigotier). La disponibilité de ces deux colorants reste cependant en deçà des besoins du marché, en raison des faibles rendements d'extraction qui ne dépassent pas pour les deux cas 0,1 % du poids sec. Parmi les phycobiliprotéines, la phycocyanine détient un monopole de fait en raison de sa couleur bleue unique.

5. PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES DE LA PHYCOCYANINE :

Les groupements prosthétiques de la phycocyanine représentent 4% de la masse de l'algue, soit 16 chromophores par unité de masse moléculaire (Dalton) sachant que la masse moléculaire du monomère de phycocyanine est de 37468,5 Da (détermination par ionisation par electrospray couplée à une spectrométrie de masse).

Ce monomère est composé de deux sous unités α et β de taille respective de 18186,56 et 19281,94 Da, et de trois chromophores de phycocyanobiline attachés à la sous-unités α (α 84) et à la sous-unités β (β 84, β 155) .

La phycocyanine peut se retrouver sous forme de mélanges complexes d'agrégats en tant que trimère ($\alpha\beta$), hexamère ($\alpha\beta$) et dodecamere ($\alpha\beta$).

Selon le pH, la force ionique, la température et la concentration en protéines, la quantité relative de ces agrégats est variable.

En général, la structure de la phycocyanine chez *Spirulina platensis* est formée de l'association de deux hexamères qui se font face formant une unité asymétrique.

Au total sur cette unité asymétrique, 36 chromophores de phycocyanobiline sont liés par un pont thioether à la partie protéique.

PARTIE
EXPERIMENTALE

L'objet de nos travaux a porté sur l'obtention de phycocyanine extraite à partir de la spiruline provenant de deux régions géographiquement différentes, l'une algérienne (région de Tamanrasset) et l'autre tunisienne (région de Djerba).

Nous avons après caractérisation des deux souches de spiruline, procédé à l'extraction de leurs phycocyanine par plusieurs méthodes tout en préservant leurs qualités intrinsèques. Nous avons procédé à une comparaison des résultats obtenus pour arriver à désigner la méthode optimale d'extraction en termes de rendement.

Puis, nous nous sommes fixés comme objectif de formuler une crème anti rides à base de phycocyanine qui pourrait estamper les rides apparentes chez l'homme.

A ce niveau, plusieurs essais à différentes concentrations (0,5% ,1%, 2%, 5% et 10%) ont été réalisés et de nombreux contrôles ont été opérés tels que mesure de PH, viscosité, densité et la recherche de certains germes pour le suivi de la qualité des crèmes élaborées.

La réalisation d'un test rhéologique nous a permis de sélectionner la crème ou les crèmes conformes pour l'application et résistant au stockage et aux différentes agressions possibles.

Matériels et méthodes :

1. CARACTERISATION DES SOCHES DE SPIRULINE :

1.1 Matériel végétal :

La spiruline algérienne est actuellement produite dans son environnement naturel (El Guelta, région de Tamanrasset, Sud de l'Algérie). Sa production artisanale et expérimentale dans un bassin est actuellement maîtrisée (Hiri A, 2013).

Mr Hiri nous a remis de la spiruline qu'il avait récoltée en juin 2014, séché et conservé dans des flacons en verre à l'abri de la lumière.

La spiruline tunisienne est produite au niveau de la station de Djerba par la société Algae Stream .Elle a subi un séchage à basse température et elle a été emballée sous vide.



Figure 5 : Spirulina platensis de Djerba (source : station de djerba)



Figure 6 : Spirulina platensis de Tamanrasset (source : station de hiri)

1.2. Réactivation des souches :

La réactivation de la poudre de spiruline pour chacune des souches s'est faite dans un milieu liquide constitué d'eau distillée (1 ml) et de bicarbonate (0,2%).

Nous avons prélevé 100 ml pour chaque solution que nous avons chauffé pendant 15 minutes à 55°C puis nous avons ajouté 3 gramme de poudre sèche de *S. platensis* de chacune des deux souches après 15 minutes.

Une agitation a été réalisée doucement jusqu'à homogénéisation totale. (Li Z-Y et al., 2000)

1.3. Purification des souches:

La spiruline est filtrée à l'aide de papier filtre (Wattman N°4).

Le principe consiste à purifier la spiruline par l'augmentation de la concentration de bicarbonate de sodium de 2% à 8% puis 15%. Les filaments obtenus par la filtration sont recueillis dans le milieu liquide d'isolement N°1 dont la composition est citée en annexe I.

Nous avons prélevé stérilement 100 ml de ce milieu dans un bécher de 200 ml dans lequel nous avons plongé le filtre. Puis, nous avons enlevé le filament du filtre et nous avons procédé à son lavage 5 fois avec le même milieu.

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

Après 48 h, nous avons ajouté 2 ml dans chaque tube à essai de la solution N°2 (Voir Annexe I) à une concentration de 8% de bicarbonate de sodium (Annexe I).

Après 24 heures, nous avons rajouté 4 ml de la solution N°3, la teneur de bicarbonate est à raison de 15% (Annexe A)

Les solutions de spiruline des deux souches obtenues, ont été conservées dans des flacons recouverts de papier aluminium (obscurité). Cette méthode de conservation réduit la croissance de la spiruline et élimine certains contaminants tels que les bactéries photosynthétiques.

1.4. Isolement sur boîte de pétrie :

Nous avons également réalisé des essais d'isolement de la spiruline des deux souches sur un milieu solide dont la composition est en Annexe II.

Après stérilisation, nous avons coulé le milieu dans des boîtes Pétri. Après refroidissement, nous avonsensemencé une goutte de la spiruline pour chaque souche (algérienne et tunisienne) réactivée par étalement.

Puis, nous avons procédé à l'incubation dans une étuve à 37°C en aérobiose. Après 48heures, jusqu'à une semaine, nous avons observé l'apparition des filaments 'une manière progressive et quotidienne et cela jusqu'à une semaine.

1.5. Examen microscopique :

A l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire, nous avons prélevé une goutte d'une solution de la spiruline pour chaque souche réactivée et l'avons déposé sous le microscope. L'examen microscopique a été effectué avec grossissement (Gr: 100.1, 25. 10. 0,25).

1.6 Analyses physico chimiques des souches de spiruline :

1.6.1 Détermination du potentiel d'hydrogène pH (selon la norme ISO 1842, NA 2233, 1993).

Principe :

Selon Dégrément (1978), le pH correspond au logarithme décimal négatif de la concentration en ions $[H^+]$, son principe est basé sur la détermination, en unité de la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans le produit à analyser à l'aide d'un pH-mètre.

Mode opératoire :

Nous avons déterminé le pH de la solution de spiruline à 4 % que ce soit pour la souche algérienne ou tunisienne (4g de poudre de spiruline diluée dans 100 ml d'eau distillée) à l'aide d'un pH mètre de paillasse.

1.6.2 Détermination de la teneur en humidité:

Mode opératoire :

La détermination de la teneur en humidité s'est faite par étuvage à $103 \pm 2^\circ$ jusqu'à stabilité du poids selon la méthode officielle AOCS (American Oil Chemist's Society).

Expression des résultats :

Les résultats exprimés en pourcentage du poids d'eau par rapport au poids initial, sont exprimés par l'équation suivante :

$$H = \frac{m_1 - m_2 \times 100}{m_1 - m_0}$$

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

m₀ : masse, en gramme, de la capsule vide ;

m₁ : masse, en gramme, de la capsule et de la prise d'essai

m₂ : masse, en gramme, de la capsule et le résidu sec.

Il faut signaler que cette méthode ne mesure pas la teneur en eau proprement dite, le terme « humidité » que nous avons utilisé pose problème également. Le terme correct pour le résultat de ces méthodes devrait être « perte de masse » ce qui ne correspond pas seulement à de l'eau, mais à tous les composés volatils dans les conditions opérationnelles de séchage (Le Mestre et *al.*, 2002).

1.6.3. Détermination de la teneur en protéine (Méthode Kjeldhal) :

Principe :

La 1^{re} étape est la minéralisation. Son but est de dégrader la matière organique azotée sous la forme de sel d'ammonium.

Le pH acide permet au sel d'ammonium d'apparaître sous sa forme acide de l'ammonium NH_4^+ .

La dégradation de la matière organique azotée se fait à l'aide d'un catalyseur (du sulfate de cuivre et du sulfate de potassium), de l'acide sulfurique à haute température (421 °C).

La 2^e étape est la distillation de l'ammonium par l'ajout de soude : on cherche à transformer l'ammonium sous sa forme volatile, l'ammoniac.

Équation de distillation :

La soude est ajoutée en excès afin de changer le pH acide en un pH basique, ce qui a pour effet d'obtenir de l'ammoniac. L'ammoniac est entraîné par la vapeur d'eau par distillation. Les vapeurs d'ammoniac sont condensées au contact d'un réfrigérant.

La troisième étape est le dosage: soit directement ou indirectement

Mode opératoire

Après minéralisation d'une prise d'essai d'environ un (01) gramme par chauffage à 350°C dans l'acide sulfurique concentré 0,25 N en présence de catalyseur (sulfate de cuivre et sulfate de potassium), une alcalinisation du minéralisât obtenu est réalisée après une éventuelle dilution. Après un traitement à la vapeur de l'ammoniac, nous procédons à un titrage par de l'acide chlorhydrique 0,25N.

Expression des résultats :

Les résultats exprimés en pourcentage du poids de protéines par rapport au poids total de la prise d'essai, sont donnés par l'équation suivante :

$$P = \frac{1,4 \times n \times (V_1 - V_0)}{m} \times 6,25$$

P : Taux de protéines, exprimé en pourcentage (%) en masse

N : Normalité de Hcl utilisé pour la détermination

V₁ : Volume, en ml, d'Hcl utilisé pour la détermination

V₀ : Volume, en ml, de Hcl utilisé pour la détermination sur blanc

M : Masse, en gramme, de la prise d'essai initiale

6,25 : Facteur de conversion des protéines de la spiruline.

1.6.4. Détermination du taux de cendres :

Mode opératoire :

La teneur en cendres (minéraux) a été estimée par incinération au four à 550°C de façon à obtenir la totalité des cations sous forme de carbonate et autres sels minéraux anhydres (AOCS, 1990).

Expression des résultats :

Les résultats, exprimés en pourcentage du poids de cendres par rapport au poids initial, ont été obtenus à partir de l'expression suivante :

$$C = \frac{m_3 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

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

m₀ : Masse, en gramme, du creuset vide ;

m₁ : Masse, en gramme, du creuset et de la prise d'essai ;

m₃ : Masse, en gramme, du creuset et son contenu (cendres) après incinération.

1.6.5. Détermination de la teneur en sucres solubles (méthode d'anthrone)

Principe

Le dosage des sucres solubles totaux se fait par colorimétrie à l'anthrone. Cette méthode est basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide à chaud.

Les dérivés obtenus se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés bleu-vert avec les hexoses et rouge avec les pentoses (Sanchez-Miron, 2003) .

Mode opératoire :

Extraction des sucres

Nous pesons 20 mg de la spiruline algérienne et 20 mg de la spiruline tunisienne

Un broyage fin de la spiruline à l'aide d'un mortier dans 5mL d'éthanol 80% bouillant est réalisé puis la centrifugation de chaque solution se fait à 5000 trs/min pendant 20 minutes. Les surnageant (A) et (A') sont récupérés dans deux tubes.

Nous couvrons chaque culot avec 5mL d'éthanol 80% qui après agitation il y a une centrifugation à 5000 trs/min pendant 15minute ;

Les surnageant (B) et (B') sont récupérés, nous les mélangeons avec les surnageant (A) et (A') dans deux fioles de 100mL : (B)avec (A) et (B') avec (A') .

Nous les ajustons avec l'eau distillée jusqu'à 100 mL (solution C) et (solution C')

Les différentes densités optiques sont rapportées sur la courbe d'étalonnage du glucose établie. (Annexe B)

Echantillon à doser

Dans un tube à essai, 50 μ L de la solution C sont prélevé et 950 μ L d'eau distillée sont ajoutés.

Après addition de 2mL d'anthrone, le mélange est réalisé à l'aide d'un vortex et la lecture de la densité optique se fait grâce à un spectromètre à 625nm.

Après avoir établi la courbe d'étalonnage, la densité optique de l'échantillon est déduite.

Expression des résultats :

En effet, la teneur en sucre totale est exprimée en mg/g de spiruline à analyser :

$$Q_s = C \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{1000}{p}$$

Q_s: Teneur en sucres (mg/g) ;

C: Concentration de sucres dans le volume à doser (mg/ml)

V : Volume de l'extrait (100mL);

v : Volume à doser (ml);

P : Poids de la prise d'essai (g).

Le même protocole a été adopté sur la souche tunisienne.

1.6.6 Détermination de la teneur en matière grasse (NF V 03-905)

Principe :

La détermination des matières grasses est obtenue selon la méthode d'extraction par le SOXHLET (chauffe ballon, ballon, cartouche, réfrigérant) en utilisant l'hexane comme solvant

Mode opératoire :

50 g d'échantillon sont placées dans le SOXHLET et 500 ml d'hexane sont introduits dans le ballon, puis la température est réglée à 60°C.

Nous avons repris le même protocole pour la souche tunisienne.

La majeure partie du solvant est éliminée à l'aide de l'évaporateur rotatif pour éviter l'ébullition de l'huile qui, à la longue, pourrait modifier les indices d'acidité.

Le ballon contenant les lipides est placé à l'étuve pendant 30 min à 103°C, puis au dessiccateur pendant 30 min. Le poids des lipides est obtenu par la différence entre le poids final et le poids initial du ballon.

Expression des résultats :

Les résultats sont donnés par la formule suivante:

$$\text{Teneur en MG (\% MS)} = (A-B) \cdot 100 / C \cdot MS / 100$$

A: poids du ballon + extrait en gramme

B: poids du ballon vide en gramme

C: poids de la prise d'essai en gramme

MS: matière sèche en pourcentage

1.6.7. La composition en acides gras :

Principe :

La composition en acides gras de la spiruline a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La matière grasse testée, est obtenue par le soxhlet ou par l'estérification de la spiruline.

Mode opératoire :

L'estérification des acides gras est une réaction de chimie organique au cours de laquelle un groupe fonctionnel ester -COOR est obtenu par condensation d'un groupe acide carboxylique -COOH et d'un groupe alcool -OH.

L'estérification :

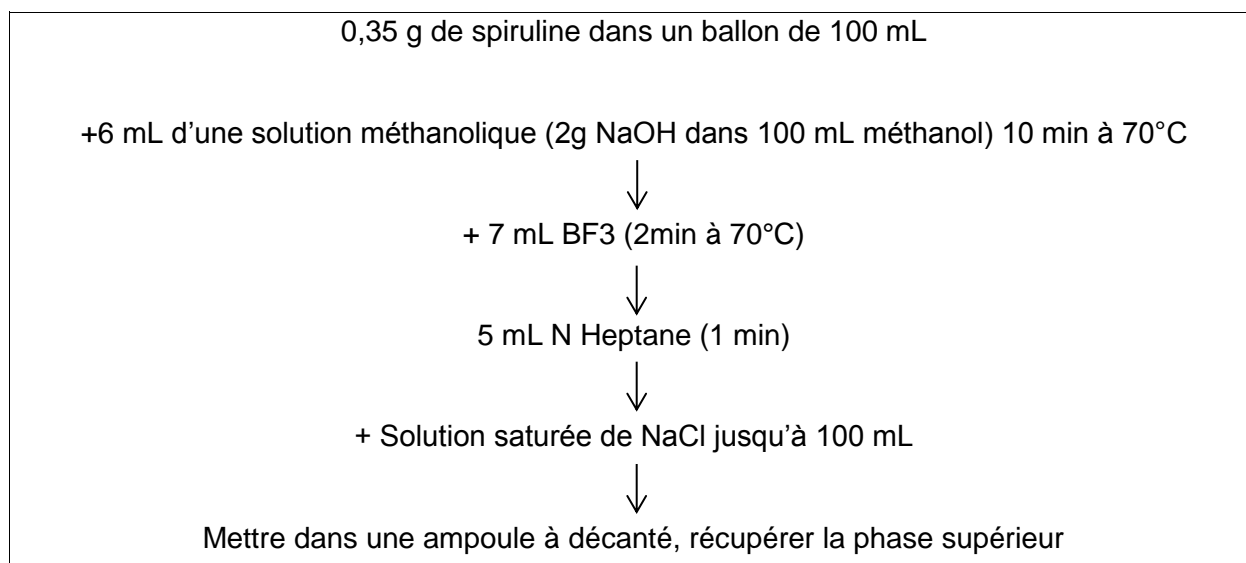


Figure 7: Les étapes de l'estérification de la spiruline

Les conditions opératoires de l'analyse de CPG sont:

Chromatographie : Chrompack

Détecteur : CP9002

Injecteur : FID

SPLIT
1/100

Gaz vecteur : Azote

DB23

Colonne capillaire :

Longueur : 30m

Diamètre inferieur : 0,32 mm

Epaisseur : 0,25µm

Température

Injecteur : 250°C

Détecteur : 250°C

Four : 220°C (4°C/mn)

Quantité injectée : 0,2 µL

Vitesse du papier : 0,5 Cm/Mn

1.6.8. Détermination des pigments:

1.6.8.1 Dosage colorimétrique simplifié des Caroténoïdes:

Principe :

Un dosage colorimétrique est un type de dosage possible lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés et si l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Les dosages colorimétriques s'appuient sur la loi de Berr-Lambert.

Mode opératoire :

A 4g de spiruline sont additionnés 100 ml d'acétone (25 %) ou, d'alcool à 90°, la suspension ainsi obtenue est maintenue 24 heures au réfrigérateur.

Après centrifugation, nous prélevons 0,5 ml de la solution et ajoutons à 100mL l'acétone ou à l'alcool.

La mesure de la densité optique s'effectue à 450 nm (Jourdan, 2012).

La concentration en caroténoïdes dans la spiruline s'obtient par la formule:

$$\text{DO450} \times \text{DIL} / 2,8 / \text{C}, \text{ mg/g}$$

DIL: le facteur de dilution en volume

C : concentration de la spiruline.

1.6.8.2. Détermination de la teneur en Chlorophylle :

Principe :

L'étude spectrophotométrique des solutions de pigments a été menée en mesurant l'absorption des différentes longueurs d'onde de la lumière visible par les différentes solutions de pigments bruts.

Le principe consiste à observer la solution de chlorophylle brute avec un spectrophotomètre et lister les couleurs (et les longueurs d'onde qui y sont associées) qui ont été absorbées par la solution. Puis, comparer ces données avec un document montrant les propriétés d'absorption de la chlorophylle b

Mode opératoire :

3g de spiruline en poudre sont mélangés à 0,1g de CaCO₃ et quelque grain de sable. Puis, 20 ml d'acétone (85% acétone et 15% d'eau) sont ajoutés au mélange. Une macération de ce dernier est réalisée pendant quelques minutes suivie d'une filtration. Le filtrat ainsi obtenu est porté jusqu'à 100ml avec de l'acétone à 84%. 50 ml de cet extrait est prélevé et mélangé avec 50 ml d'éther de pétrole dans une fiole à décantation.

Un lavage avec l'eau distillé (100mL et la solution 3fois) est réalisé afin d'enlever les traces de l'acétone.

Le Chlorophylle obtenu est déshydraté par le Na₂SO₄ est ajusté avec l'éther de pétrole à 50mL (Jourdan, 2012).

Expression des résultats :

Après l'extraction de la chlorophylle nous déterminons la densité optique et l'extrait obtenu à 660nm et à 642,5nm. La quantité de la Chlorophylle est obtenue en utilisant les formules suivantes :

Chlorophylles totales : 7,12 A660 – 16,8 A642,5

1.6.8.3 Détermination de la teneur en phycocyanine :

Notre sujet portant sur l'optimisation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline produite dans deux régions : une à Sahara algérienne et l'autre dans la région de Djerba Tunisie en vue de leur caractérisation et leurs valorisations, nous présenterons **cette partie seule pour la mettre en évidence.**

2. METHODES D'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE (M'Baye et al., 2011):

2.1 Extraction par l'eau :

Parmi Les méthodes les plus précises pour mesurer la teneur en pigments, il ya la colorimétrie.

Mode opératoire

Une suspension de 4 % de spiruline dans l'eau a été préparée à l'obscurité.

Nous l'avons décanté, puis nous avons prélevé la solution bleue et procédé à une centrifugation (9000 tours/15 min) à 4°C. Nous avons prélevé le surnageant et nous avons dilué d'un facteur de 100 environ avec de l'eau.

Expression des résultats

Nous mesurons la densité optique à 615 nm, 652 nm, 620 nm et 280 nm. Soit DIL ce facteur de dilution en volume. Le calcul du % en phycocyanine est réalisé selon la formule suivante :

$$1.873 \times (DO_{620} - 0.474 \times DO_{652}) = DIL/C$$

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

La pureté de phycocyanine est égale à DO_{620}/DO_{280} (M'Baye et al., 2011).

2 .2. Extraction par sonification (Bennett, A al.,1973):

Principe :

Depuis quelques années, les ultrasons font partie de l'arsenal des méthodes mises en œuvre pour isoler les sporomorphes des roches sédimentaires, dissocier les agrégats de fins débris insolubles ou prévenir leurs dénaturations.

Mode opératoire :

Nous mettons 10 mg de spiruline en suspension dans 100 ml de tampon, la solution est mise sous l'action de l'ultrason pendant 5 min. Après une centrifugation (9000 tours/15min à 4°C).

Nous prélevons le surnageant et nous ajoutons de nouveau au culot 100 ml de tampon puis nous le remettons à l'action de l'ultrason pendant 2 à 3 min. Une centrifugation ultime est réalisée afin de prélever le surnageant et le mélanger avec le premier et mesurer les DO à 615, 652, 620 et 280 nm. Enfin, le calcul du pourcentage en phycocyanine est fait par la formule Bennett et Bogorad (1973) :

$$PC = [DO_{615} - 0.474 \times DO_{652}] / 5.34. \text{ (Bennett .A al.,1973):}$$

La pureté de phycocyanine par la formule : DO_{620}/DO_{280}

DO à 620 nm indique la concentration de phycocyanine

DO à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.3. Extraction par congélation :

Principe :

On appelle congélation toute technique visant à faire passer un produit à l'état solide par des techniques de refroidissement forcé. On parle de congélation principalement pour l'eau et les produits qui en contiennent. La congélation est une technique de conservation des produits biologiques.

Mode opératoire :

Nous mettons 100 mg d'algues secs dans 200 ml de tampon. La solution subit des cycles de congélation/décongélation (congélation à -20°C) jusqu'à l'éclatement de cellule. La solution obtenue est centrifugée.

Au surnageant, nous ajoutons 20% de saturation de $(NH_4)_2SO_4$ et nous le laissons reposer 2 heures .

Une deuxième centrifugation est réalisée (9000 tours/15 min) à 4°C. Au surnageant obtenu, nous ajoutons 45% de saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Une troisième centrifugation est effectuée directement. Enfin, le culot est récupéré.

Expression des résultats :

Une lecture de DO a été effectuée à 615nm, 620nm, 652nm et 280nm.

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

$$\text{Pureté} = \text{DO}_{620} / \text{DO}_{280} \quad (\text{Li et al., 2001})$$

2.4. Extraction par solvant (Chen et al., 2006) :

Principe :

L'extraction par solvant peut être utilisée lorsque l'on souhaite extraire une espèce chimique d'une solution où elle est dissoute et pour extraire une espèce chimique dissoute dans une solution, un autre solvant est utilisé (d'où l'appellation d'extraction liquide-liquide) qui va dissoudre également cette espèce:

Lors du contact entre la solution et le solvant d'extraction l'espèce chimique passe de l'un à l'autre, par conséquent, en fin d'extraction nous obtiendrons une nouvelle solution d'où le protocole suivant :

Mode opératoire

Nous versons 4 g de spiruline dans 120 ml du tampon phosphate, au début nous l'incubons à l'obscurité à 4 °C pendant 12h (pour permettre la lyse des cellules à l'hypotonicité de mise), puis nous centrifugeons une première fois et récupérons le surnageant bleu. Ensuite, nous ajoutons 120 ml du tampon phosphate au précipité et nous incubons 12h à l'obscurité.

Après la deuxième centrifugation, les deux surnageants sont mélangés afin de lire la densité optique à 615nm, 652nm, 620nm, 280nm.

Expression des résultats :

Le calcul du pourcentage en phycocyanine et de sa pureté est basé selon les équations suivantes (Chen et al., 2006) :

$$\text{PC (mg/ml)} = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 0.34$$

$$\text{Pureté} = DO_{620} / DO_{280}$$

2.5. Extraction par séparation aqueuse à double phase (Bulgariu, L et al., 2008) :

L'extraction de la phycocyanine par la méthode de séparation biphasique est une technique de purification aussi très employée d'où le protocole expérimental est le suivant :

Mode opératoire

Une solution de spiruline de 90 % est préparée à l'obscurité. Puis, nous lui ajoutons une solution de 40% PEG (w/w) : 40 g PEG dans 60 g d'eau et une solution de sels 20% (W/W) : 10 g de K_2HPO_4 + 10 g de KH_2PO_4 dans 60 g d'eau (nous avons utilisé une solution glucosée à 20%) (Bulgariu et al., 2008).

En se référant à la méthode d'Albertson (1994), nous avons prélevé 1 g de 40 % (W/W) PEG, 1.25 g de 20 % (W/W) sels, 0.5 g spiruline et 2.25 g d'eau.

Puis, après mélange, le produit obtenu est mis à l'obscurité sous une agitation pendant 20 min à l'aide d'un shaker suivie d'une centrifugation.

Expression des résultats :

La mesure de volumes des phases, lecture de la densité optique à 620nm, 652 nm, 615 nm, 280 nm et calcul du pourcentage en phycocyanine et sa pureté par les équations suivantes :

$$\text{PC (mg/ml)} = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 4.34$$

$$\text{Pureté} = DO_{620} / DO_{280} \quad (\text{Albertson et Tjerneld, 1994})$$

2.6 Extraction par le glycérol (pottcher, F .,2014):

Principe :

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles, ou bien pour que le liquide sera absorbé afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, pour le conserver ou pour qu'il s'y décompose.

Mode opératoire :

Nous mélangeons 800 g de poudre de spiruline algérienne dans 10 kg de glycérol. Nous laissons macérer pendant 15 j à température ambiante à l'obscurité. Une filtration frontale lente est ensuite effectuée, avec un filtre compatible alimentaire (exemple pris : un filtre en nylon) d'une finesse de 25 microns, sachant que la finesse du filtre doit être comprise entre 2 et 50 microns).

Expression des résultats :

La mesure de volumes des phases, lecture de la densité optique à 620nm, 652 nm, 615 nm, 280 nm et calcul du pourcentage en phycocyanine et sa pureté par les équations suivantes :

$$PC \text{ (mg/ml)} = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 4.34$$

$$\text{Pureté} = DO_{620} / DO_{280} \text{ (Albertson et Tjerneld, 1994)}$$

2.7 La conservation de la phycocyanine :

La phycocyanine collectée grâce aux différentes méthodes d'extraction, a subi une ultrafiltration par utilisation de membranes semi-perméables dont le diamètre des pores est compris entre 0,001 et 0,1 micromètre. Puis, nous avons procédé à une lyophilisation. Nous avons utilisé un Lyophilisateur COSMOS pilote de pailleasse

Il est équipé de 1 à 5 plateaux thermo statés par fluide caloporteur de -60 à +60 °. Chaque plateau présente une surface de 0,1 m².

Son piège est d'une capacité de 3 à 4 kg de glace et est refroidi à $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une meilleure conservation.



Figure 8 : La Phycocyanine lyophilisée

3. CARACTERISATION DE LA PHYCOCYANINE OBTENUE :

3.1 Activité antioxydante :

Principe :

Un antioxydant est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaînes destructrices.

Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

Mode opératoire :

L'activité antioxydante a été déterminée par deux méthodes :

***Par le DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil) (Moukette , B et all.,2015):**

Au départ, nous préparons la solution de DPPH : 12 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol et on l'incube pendant 30 mn à l'obscurité à 4°C avec agitation. Cette solution doit être préparée 2 heures avant l'essai et elle reste stable 5 jours à l'obscurité à 4 °C).

De la solution précédente nous prélevons un volume de 3 ml pour le diluer dans 7 ml de méthanol. Puis, nous prenons 0.21 ml de l'extrait de phycocyanine (algérienne ou tunisienne) dans 1.94 ml DPPH dilués et l'incubés à l'obscurité pendant 30 min à 20°C pour lire la densité optique à 517 nm.

Nous calculons l'activité antioxydante pour chacune des souches par la formule suivante :

$$\text{Delta-DPPH} = \text{ADPPH} - [A_{517}] \text{ simple}$$

Bien entendu, l'activité antioxydante a été calculée en se basant sur la courbe d'étalonnage obtenue et en utilisant l'acide ascorbique (voir annexe B) comme standard (Brand-Williams et al, 1995).

***Par détermination du pouvoir réducteur de la phycocyanine (méthode (FRAP) (Bujard, E et all., 1970) :**

Nous avons suivi le protocole suivant :

Un volume 1 ml de phycocyanine (algérienne ou tunisienne) est mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium $K_3[Fe(CN)_6]$ à 1 %.

Après 30 mn d'incubation à 50 °C, un volume de 2,5 ml de la solution d'acide trichloracétique à 10 % est ajouté et le mélange est centrifugé pendant dix mn.

Une aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de solution aqueuse de FeCh à 0,1 %.

Expression des résultats :

L'activité antioxydante de phycocyanine est exprimée en absorbance à 700 nm. (Prior et al ,2005)

3.2 Poly phénols totaux :

Deux méthodes ont été testées :

3.2.1 Par colorimétrie :

Principe :

Les poly phénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaires. Ces composés sont les produits des métabolismes secondaires des plantes.

Mode opératoire :

Nous diluons l'extrait de la phycocyanine des deux souches, puis nous mettons 0,5 ml de chaque dilution dans des tubes à essai pour chacune d'elles.

Nous ajoutons 5ml d'eau distillée et 0.5 de réactif de Folin à 10%. Après 3 mn nous ajoutons 0.5ml de carbonate de sodium 20%.

Expression des résultats :

La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure à l'obscurité. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage. **(Réberaud et Gaon. ,1968)**

3.2.2 Détermination des polyphénols par HPLC (chromatographie liquide à haute performance)(Brand,W et al., 1995) :

Principe :

La chromatographie liquide de haute performance est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange se trouvant en phase homogène liquide. Son principe repose sur l'équilibre des concentrations des composés à

séparer entre deux phases en contact : la phase stationnaire (colonne chromatographique) et la phase mobile qui se déplace.

La séparation est basée sur la rétention différente des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps variables et liés à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc.) et à leur affinité respective pour la phase stationnaire et pour la phase mobile. A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

Mode opératoire :

L'analyse HPLC a été réalisée à l'aide d'un système constitué de quatre modules principaux :

- un système de pompage ;
- un système d'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique
- une colonne chromatographique ; et un détecteur.

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe HPLC (HPLC Waters Alliance 2695) avec un détecteur UV 24889 et un logiciel empower V3.

La colonne est d'une longueur de 250 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm. Elle contient la phase stationnaire apolaire (phase inverse) qui est constituée de silice (C-18). Ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques.

Les conditions opératoires étaient les suivantes:

- Débit: 1 mL/min ;
- Pression de travail : 21,3 MPa
- Volume d'injection : 20 µL
- Longueur d'onde: 254 nm
- Concentration de l'échantillon: 1 mg/mL ;
- Temps d'analyse : 25 min ;

La phase mobile est de composition gradiente. Elle est composée de deux éluants A et B dont la composition est mentionné dans le tableau 2 et est filtrée avant l'utilisation par une pompe à filtre

Tableau 3 : Composition de la phase mobile pour l'étude des poly phénols par HPLC en fonction du temps.

Time (min)	Composition (%)	
	Solvant A (Acétonitril)	Solvant B (H ₂ O, pH 2,5)
Initial	2	98
5.00	2	98
15.00	5	95
17.00	100	0
25.00	100	0
Débit	1mL/min	
Temps	24min	

3.3 Flavonoïde :

Principe :

Les **flavonoïdes** (ou **bioflavonoïdes**) sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C₆-C₃-C₆, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal. Certains auteurs, préfèrent les séparer, pour tenir compte de leurs propriétés particulières, les dérivés flavaniques, les xanthocyanopsies et les iso flavonoïdes et conserver l'appellation de flavonoïdes *stricto sensu* pour les autres.

Mode opératoire

A 1 ml d'extrait de phycocyanine (algérienne ou tunisienne) nous ajoutons 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 %.

Expression des résultats :

La concentration des flavonoïdes contenus dans les extraits est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la Quercétine (voir annexe II) comme standard. (F,Kini.,2008) .

Après 10 mn, l'absorbance est lue à 430 nm.

4 .FORMULATION ET CONCEPTION D'UNE CREME ANTI RIDES à BASE DE PHYCOCYANINE:

Après extraction de la phycocyanine nous avons procédé à la formulation d'une crème anti rides à base de phycocyanine (algérienne et tunisienne) (crucho, H ., 2008) . Plusieurs essais à différentes concentrations (0 ,5% ,1% ,2% ,5% et 10%) pour les deux souches ont été réalisés et de nombreux contrôles ont été opérés tels que :

- Mesure de PH,
- Viscosité,
- Densité
- Recherche des germes (Coliformes totaux et fécaux, Entérocoques, Streptocoques du groupe D, Pseudomonas, Clostridium sulfitoréducteur et les mésophiles).

Par la suite, nous avons réalisé un test rhéologique pour nous permettre de sélectionner la ou les crèmes conformes.

L'évaluation sensorielle de nos crèmes antirides élaborées à base de phycocyanine a été proposée à un jury naïf.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie d'une usine de fabrication de produits cosmétiques anonyme à Tunis et dans le laboratoire de chimie industrielle du centre de recherche des Oasis Degheche en Tunisie.

4.1 Formulation :

Les principes actifs, ainsi que les excipients utilisés dans la formule de nos crèmes anti rides, catégories et fonctions sont regroupés dans le tableau 4 suivant :

Tableau 4: Caractéristiques des matières premières (principes actifs et excipients)

Phases	Composés	Quantités (%)	Catégorie
(A) Grasse	Poly-glycérol stéarate	5	Emulsifiant
	Hydroxy stéarate	4	Emulsifiant
	Cétionl CC	4	Epaississant, hydratant
	Diméthicone (excipient)	8	Epaississant
	Conservateur (1)	0,5	Inhibiteur des levures et moisissures
	Cire d'abeille		Gélifiant
(B)	Silica	2	Gélifiant (viscosité)
(C) Aqueuse	Eauosmosée	66,45	
	Pigment	1	Fixateur
	Glycérine	3	Hydratant
	Conservateur (1)	1	Inhibiteur des levures et moisissures
	EDTA	0,05	Agent complexant dont le rôle est de préserver la fonction du principe actif
(D)	Conservateur (2)	0,2	Inhibiteur des germes totaux
	Collagène (principe actif)	0,8	Agent hydratant dont le rôle est la production de la gélatine, augmente l'élasticité de la peau
(E)	Parfum	1,5	Agent supplémentaire de vente et d'offre de plaisir pour les clients
	Oxynex 2004	0,006	Antioxydant
(F)	Phycocyanine algérienne et phycocyanine tunisienne (principe actif)	0,5/1/2/5/10	
	Gomme arabique (excipient)		Transdermite dont le rôle est de véhiculer la phycocyanine vers le derme
	Acide acétique		

4.1.1 Echantillonnage des matières premières :

L'échantillonnage est une suite d'opérations destinées à sélectionner une fraction représentative d'une substance dans un but précis d'analyse.

Le prélèvement des principes actifs ainsi que des excipients utilisés dans la formulation de la crème anti ride à base de phycocyanine algérienne et tunisienne, a été effectué d'une manière aléatoire au sein du magasin de stockage de l'entreprise.

Concernant l'eau, le laboratoire de chimie de l'usine est équipé d'une station de traitement d'eau : c'est un enchainement de phases par lesquelles l'eau doit passer afin d'obtenir une eau osmosée, prête à être utilisée dans la production.

L'eau subit différents types d'analyses, au début de chaque semaine, des échantillons sont prélevés aseptiquement.

4.1.2 Echantillonnage du produit semi fini et fini :

Le produit semi fini est prélevé directement dans des béciers à partir du turbo émulseur. L'échantillonnage du produit fini s'effectue à partir des pots de conditionnement dans des conditions aseptiques.

4.1.3 Evaluation organoleptique des matières premières :

Tout contrôle des matières premières débute par une reconnaissance du produit, c'est-à-dire par l'observation de ses caractères organoleptiques, il s'agit d'une approche qui peut être très pertinente en cas d'erreur de produit ou d'anomalie grossière (Pradeau, 1992). Pour cela, nous avons procédé à une évaluation sensorielle des matières premières par :

- ✓ Etude de l'aspect : c'est un examen visuel de la limpidité et la fluidité des liquides, l'homogénéité des poudres et les dimensions des cristaux pour les solides,
- ✓ Etude de la couleur : la couleur des produits est examinée, s'il y a une altération de ce dernier, le constat est immédiat
- ✓ Etude de l'odeur : chaque produit a une odeur propre caractéristique devant être préservée.

4.2 Analyses physico-chimiques (matières premières, produit semi fini et fini) :

Les caractéristiques physico-chimiques d'un produit cosmétique sont très importantes, car elles assurent la stabilité du produit.

Le contrôle des paramètres physico-chimiques suivants a été réalisé :

4.2.1 Extrait sec total de la phycocyanine algérienne et tunisienne :

C'est la perte de masse de ce produit lorsqu'il est soumis à la dessiccation suivant le mode opératoire décrit.

Mode opératoire

- Peser 2g de phycocyanine algérienne dans une coupelle en aluminium séchée et tarée.
- Etaler bien sur toute la surface la prise d'essai sans toucher les bords.
- Mettre le tout dans une thermo-balance afin d'évaporer l'humidité sous l'effet d'une source de chaleur (infrarouge) et attendre le bip sonore (Ministère du commerce 2000).
- Refaire le même Protocole pour la phycocyanine tunisienne.

Lecture :

Après le bip sonore, le résultat s'affiche sur l'écran de l'appareil en pourcentage massique de matière sèche par rapport au total.

Taux d'humidité :

C'est la différence entre le poids du produit (avant dessiccation) et l'extrait sec total, elle est calculée par cette formule :

$$\mathbf{H\% = 100\% - EST}$$

H% : teneur en eau en %

EST% : extrait sec total en %

4.2.2 Détermination de taux de cendres totales (NA732 /1991) tiré des méthodes normalisées AFNOR NFV 03-720 décembre 1981) :

Principe :

Le taux de cendres a été déterminé après incinération d'une prise d'essai dans un four à moufle réglé à 560°C.

Mode opératoire :

Peser deux gramme d'échantillon dans une capsule.

Verser 2 ml d'éthanol sur la prise d'essai et enflammer durant 2heures.

Refroidir et humidifier les cendres avec quelques gouttes d'eau et chauffer à nouveau dans le four à moufle pendant 1heure.

Transférer la capsule dans un dessiccateur et laisser refroidir à la température ambiante et peser.

Expression des résultats

Les résultats, exprimés en pourcentages de poids initial, ont été obtenus à partir de l'expression suivante :

$$C = \frac{m3 - m0}{m1 - m0} \times 100$$

C : taux de cendre, exprimé en pourcentage

M0 : masse en g de creuset vide

M1 : masse en G de creuset et de la prise d'essai

M3 : masse en G de creuset et son continue (cendre après incinération).

4.2.3 Indice d'acide :

Principe :

Selon la norme **ISO660**, l'indice d'acide et le nombre de milligrammes des hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de corps gras, déterminé conformément à la méthode prescrite dans la norme internationale.

Mode opératoire :

Méthode a l'éthanol chaud utilisant un indicateur :

Peser une prise d'essai qui convient au tableau 5 ci-dessus :

Tableau 5 : Masse de la prise d'essai pour la mesure de l'indice d'acide (Anonyme, 1996)

L'indice acide présumé	Masse de la prise d'essai (g)	La précision de la pesée de la prise d'essai (g)
<1	20	0 ,05
1à4	10	0 ,02
4 à 15	2,5	0,01
15 à 75	0,5	0,001
75	0,1	0,0002

Dans une deuxième fiole, porter à l'ébullition, 50 ml d'éthanol.

Dissoudre la prise d'essai (g) dans C 500 ml d'éthanol chaud, avec ajout de quelques gouttes de phénolphtaléine.

Après dissolution, tirer par KOH 0,1 M.

Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes en moins.

Expression des résultats :

$$I_a = (56,1 \times VXC)/M$$

V= le volume en ml de al solution titrée du KOH utilisé.

C= la concentration exacte, en mole par litre de la solution titré de KOH.

M=masse en gramme de al prise d'essai

56,1= coefficient de la correspondance.

4.2.4 Mesure de pH :

Principe :

Selon Degremont (1978), le pH correspond au logarithme décimal négatif de la concentration en ions $[H^+]$, son principe est basé sur la détermination, en unité de la

différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans le produit à analyser à l'aide d'un pH-mètre

Mode opératoire :

Selon la NA 367/1990, la mesure se fait de la manière suivante :

Étalonner le pH-mètre avec deux solutions tampon, la première à pH =4, et la deuxième à pH= 7.

Une fois l'appareil étalonné, en rince les électrodes par l'eau distillée ou par la solution d'essai.

Verser une quantité suffisante de la solution de d'essai dans le récipient de mesure.

Introduire l'électrode dans la solution à examiner,

Lire la valeur de pH sur l'écran de l'appareil.

Remarque :

Pour la phycocyanine algérienne et même la souche tunisienne, l'échantillon est préparé en pesant 2g de poudre de phycocyanine pour chaque souche dans 18 ml d'eau distillée, laissé reposer pendant 15mn pour l'homogénéisation.

4.2.5 Indice de réfraction :

Principe :

Selon la norme NA.367-1990, l'indice de réfraction d'une substance est le rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans la substance. Il varie avec la longueur d'onde de la lumière incidente et avec la température .

Mode opératoire :

L'indice de réfraction à la température de référence (20°C), est mesuré à l'aide d'un réfractomètre de la manière suivante :

Nettoyer soigneusement le prisme du réfractomètre,

Verser quelques gouttes de substance à analyser sur prisme,

Tourner la vis de réglage en regardant dans la lunette jusqu'à l'obtention de deux plages égales : l'une étant sombre et l'autre claire,
Finalement, le résultat est lu dans l'échelle qui se trouve au-dessous des deux plages,
Immédiatement après le mesurage, essuyer la surface du prisme avec un chiffon doux, puis un tampon d'éthanol,

4.2.6 Indice de saponification :

Principe :

Selon la pharmacopée Européenne 2009, l'indice de saponification est le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance. En présence de KOH et à haute température, les glycérides sont dégradés et les acides gras obtenus réagissent avec le KOH pour former des savons. On utilise la prise d'essai correspondante indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6 : masse de la prise d'essai pour la mesure de l'indice de saponification (Anonyme 2001)

Indice présumé	Prise d'essai
3 à 10	12 à 15
10 à 40	8 à 12
40 à 60	5 à 8
60 à 100	3 à 5
100 à 200	2,5 à 3
200 à 300	1 à 2
300 à 400	0,5 à 1

Mode opératoire :

Mettre la prise d'essai (g) du produit à analyser dans une fiole de 250ml de verre borosilicaté et munie d'un réfrigérant à reflux,
Ajouter 25ml de KOH alcoolique 05 ml et quelques billes de verre,
Adapter le réfrigérant et chauffer à reflux pendant 30 minutes,

Ajouter 1ml de solution de phénolphtaléine et on titre (alors que la solution est encore chaude) avec du HCL05 M,
Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Expression des résultats :

L'indice de saponification est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$I_s = 28,05x (n_2 - n_1)/m$$

n_1 = volume de HCL versé pour titrer l'essai (ml)

n_2 = volume du HCL versé pour titrer le témoin (ml)

M = masse de la prise d'essai du produit à analyser (g)

28,05= le coefficient de la correspondance

4.2.7 Détermination de la densité à 20°C :

Principe :

Selon la norme NF T 20-053, la masse spécifique d'un corps est la masse d'unité du volume de ce corps.

Par définition, celle de l'eau pure à 4°C est de 1 g/ml.

La densité d'un corps est égale au rapport de sa masse spécifique à celle de l'eau pure mesurée dans les mêmes conditions (Rodier, 2005).

La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre en verre.

Mode opératoire :

Laver et sécher le pycnomètre, puis le poser avec son bouchon à l'aide d'une balance de précision à 00001 g près, et déterminer son poids vide,

Remplir le pycnomètre avec l'eau distillée, et déterminer la masse apparente de son contenu en eau,

Vider, laver et sécher le pycnomètre, le remplir de nouveau avec le produit à examiner, et de la même manière, on détermine la masse de son contenu en produit.

Expression des résultats :

La densité est déterminée en suivant la formule :

$$D = (p_3 - P_1) / (P_2 - P_1)$$

D : densité

P1 : poids du pycnomètre (g)

P2 : poids du pycnomètre avec de l'eau distillée

P3 : poids du pycnomètre avec la solution à examiner (g)

4.2.8 Détermination de la viscosité :

Principe :

Selon la norme NA 376/1990, la viscosité peut être mesurée à l'aide d'un viscosimètre ROTATIF BROOKEIL. Un mobile de forme cylindrique ou apparenté (disque) entraîné par un moteur synchrone, tourne à la vitesse constante autour de son axe dans le produit en examen.

La viscosité est mesurée en multipliant la valeur de ce déplacement par un coefficient dépendant de la vitesse de rotation et des caractéristiques du mobile.

Expression des résultats :

Calculer la viscosité en m Pas, au moyen de la formule :

$$V = K. I$$

V : la viscosité.

K : coefficient qui dépend du couple mobile/vitesse, utilisé et qui est indiqué dans le tableau IV (voir annexe c).

I : la valeur lue sur le cardan du viscosimètre après cinq tours.

4.2.9 Détermination de la conductivité :

Principe :

La conductivité électrique traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant électrique. Elle est directement proportionnelle à la quantité de solide (sel minéraux) dissous dans l'eau (Rodier, 2005).

Elle est mesurée à l'aide d'un conductimètre.

Mode opératoire :

Remplir un bécher avec de l'eau à analyser,

Rincer l'électrode du conductimètre avant de l'introduire à l'intérieur du bécher,

Lire la valeur de la conductivité qui s'affiche sur l'écran de l'appareil.

4.2.10 Dosage des chlorures :

Principe:

Les chlorures sont dosés par chlorométrie directement en utilisant le nitrate d'argent comme réactif titrant (Pradeau, 1992).

Mode opératoire :

Dans un tube à essai, et à l'aide d'une seringue, prélever 6ml d'eau,

Ajouter 2 ml (20 gouttes) d'acide nitrique dilué 2N, plus 02 ml (4gouttes) de nitrate d'argent, bien agiter.

Expression des résultats :

La solution ne doit présenter aucun changement pendant au moins 15secondes.

4.2.11 Dosage de calcium et magnésium :

Principe :

La dureté totale ou titre hydrométrique d'eau correspond à la somme des concentrations en cations métalliques. Dans la plupart des cas, elle est surtout due aux ions Ca^{++} et Mg^{++}

Mode opératoire :

Méthode par compléxométrie :

Mettre 100ml d'eau un Erlen Meyer de 250 ml.

Ajouter quelques gouttes du chrome noir (15 gouttes)

Ajouter 2 ml de la solution tampon pH= 10 (ammoniacal : chlorure d'ammonium).

Expression des résultats :

Si la solution obtenue est de couleur bleu, ceci nous indique l'absence des ions Ca^{++} et Mg^{++} dans l'eau.

4.2.12. Détermination de la teneur en éléments minéraux par Spectroscopie d'absorption atomique (NF V05-113, 1972) :

Principe :

La spectrométrie d'absorption atomique est une méthode d'analyse élémentaire qui utilise la possibilité des atomes à être excités par l'apport d'une énergie extérieure sous forme d'un rayonnement électromagnétique (photon) à une fréquence bien définie t (Lynch, 2001).

Mode opératoire :

Les éléments minéraux (Fe, Zn, Ca, K, Na) sont déterminés par spectrométrie d'absorption atomique de type (VARIAN AA 240) lié à l'atomiseur de flamme (GTA 120).

Expression des résultats :

En effet, la concentration en ppm des éléments minéraux a été déterminée à l'aide de courbes étalons préparées au préalable.

4.3 Analyses microbiologiques :

L'analyse microbiologique des principes actifs, des excipients et du produit fini est un moyen permettant de rechercher l'éventuelle présence des micro-organismes pouvant compromettre la sécurité sanitaire du produit. Ces analyses consistent en la recherche des :

- Germes aérobies mésophiles
- Levures et moisissures
- Coliformes fécaux et totaux
- Streptocoques ou entérocoques du groupe D
- Pseudomonas
- Clostridium

4.3.1 Préparation des éléments à analyser :

La préparation a été réalisée dans des conditions d'asepsie sous hotte laminaire (PSM de type II)

Transférer 1à g du produit à analyser dans 90ml du diluant D/E.

Servant à la neutralisation des désinfectants (ceci représente la dilution 1/10).

Bien agiter la suspension dans le but d'homogénéiser le mélange.

Laisser agir pendant 30 minutes pour la réaction entre diluant et conservateur.

4.3.2 Recherche des germes aérobies mésophiles totaux :

Selon la NA 82-87, il s'agit de l'ensemble des micro-organismes capable de se multiplier en aérobiose à des températures de croissance compris entre 20°C et 45°C.

Ce dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du produit. La gélose PCA est un milieu, permettant le développement de la plus part des micro-organismes susceptibles d'être rencontrés dans un produit.

Mode opératoire :

Selon la norme NA 82-87, la recherche se fait comme suit :

A partir des cinq échantillons prélevés (crème a 0,5, 1, 2, 5 et 10% de phycocyanine algérienne), transférer 2g de chaque prélèvement dans 80ml de diluant D/E et 10 ml de tween (ceci représente la dilution 1/10).

Bien agiter le mélange, pour une bonne homogénéisation.

Laisser agir 30 minutes pour la réaction entre diluant et conservateur.

Prélever 1ml de la dilution 1/10 à l'aide d'une seringue, et la déposer dans une boîte de pétri vide et stérile.

Couvrir avec 15ml du milieu PCA en surfusion à 45°C.

Incuber à 32°C pendant 48 à 72 heures, dans l'étuve thermo statée.

Un témoin ne contenant pas le produit est préparé dans les mêmes conditions.

Le même Protocole est respecté pour la phycocyanine tunisienne.

Lecture :

Les colonies sont énumérées à l'aide d'un compteur.

Le nombre de colonies/ml est égale au nombre de colonies comptées, multiplié par l'inverse de la dilution (X10)

Norme : ≤ 100 UFC/ml

Pour la recherche de ces mêmes germes dans l'eau et selon les exigences de la norme NF T90-416, nous avons suivi une technique simple et rapide qui nécessite la disposition d'une rampe de filtration.

Expression des résultats :

Dénombrer les colonies à l'aide d'un compteur, et exprimer les résultats en UFC/ml les germes aérobies mésophiles apparaissent sous forme de petites colonies arrondies beiges avec un aspect lisse.

Norme : $\leq 10^2$ UFC/ml

4.3.3 Recherche des levures et moisissures :

Selon la norme NA 82-85, la flore fongique représente un indice de la qualité marchande des matières premières.

Mode opératoire :

A partir de la dilution 1/10 préparé précédemment :

Ensemencer une boîte de pétri stérile avec 1ml de la dilution 1/10.

Ajouter à la boîte de pétri 10 à 15 ml du milieu Sabouraud, porté à une température de 45°C.

Faire un mouvement circulaire pour une bonne dispersion.

Laisser solidifier, puis incubé à 22°C pendant 5 jours dans une étuve thermostatée. Un témoin ne contenant pas le produit à analyser.

Lecture :

Les résultats sont exprimés en UFC/ml, qui est égale au nombre de colonies comptés, multiplié par l'inverse de la dilution (X 10).

Norme : ≤ 10 UFC/ml.

4.3.4 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans l'eau :

Les coliformes se présentent sous forme de bacilles Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production de gaz, en 24 à 48 heures à 37°C.

Ils constituent des indicateurs fécaux de la première importance mais également des indicateurs d'efficacité de traitement désinfectant.

Mode opératoire :

- **Recherche des coliformes totaux :**

Remplir l'entonnoir de façon aseptique avec 100 ml d'eau à analyser,
Actionner la pompe à vide, permettant le passage de l'eau à travers la membrane,
Retirer ensuite la membrane de 0,45 µm de diamètre, et la placer dans une boîte de pétri de 55 mm de diamètre contenant la gélose lactose au TTC,
Incuber à 37°C pendant 48 heures.

- **Recherche des coliformes fécaux :**

Refaire les mêmes étapes que celles de la recherche des coliformes totaux, mais la boîte sera incubée à 44°C pendant 48h.

Lecture :

Après 48 heures d'incubation, les coliformes totaux et fécaux apparaissent sous forme de petites colonies jaunes ou orangées lisses, légèrement bombées,
Étant donné le caractère sélectif de la gélose au TTC, ne pousseront que les coliformes sur ce milieu,

Le nombre de colonies trouvées sera exprimé dans 100ml d'eau analysée.

Norme : exige l'absence totale des coliformes

4.3.5 Dénombrement des streptocoques ou entérocoques du groupe D dans l'eau :

Les streptocoques ou entérocoque du groupe D (de la classification de Lancefield), se présentent sous forme de Cocci à Gram positif, sphériques à ovoïdes formant des chainettes, possédant l'antigène du groupe D.

Ces entérocoques ou streptocoques du groupe D, sont généralement pris globalement en compte comme des témoins de pollution fécale.

Mode opératoire :

Remplir l'entonnoir aseptiquement par 100 ml d'eau à analyser.

Mettre en marche la pompe à vide de façon à permettre le passage de l'eau à travers la membrane.

Retirer ensuite la membrane de 0,45µm de diamètre à l'aide d'une pince stérile, et la déposer dans une boîte de pétri, contenant la gélose Slanetz et Bartley,

Incuber à 37°C pendant 48 heures.

Lecture :

Après 48 heures d'incubation, les entérocoques et streptocoques du groupe D apparaissent sous forme de colonies rouges, marron ou roses, lisses, légèrement bombées.

Le nombre de colonies trouvées sera exprimé dans 100 ml d'eau analysée.

Norme : absence totale des streptocoques et entérocoques du groupe D

4.3.6 Dénombrement des Pseudomonas dans l'eau :

Les bactéries du genre Pseudomonas, peuvent être définies par : des bacilles à Gram négatif, oxydase positif, aérobies strictes, peu exigeantes, cultivées à 30°C et sporulés. Elles sont présentes dans l'eau et le sol.

Mode opératoire :

- Filtrer 100ml d'eau à analyser
- Mettre en marche la pompe à vide de façon à permettre le passage de l'eau à travers la membrane
- Prélever la membrane à l'aide d'une pince stérile, et la déposer dans une boîte de pétri, contenant le milieu Pseudo Agar,
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.

Lecture :

Après incubation, les Pseudomonas apparaissent sous forme de colonies verte ou beige en lumière ultraviolette. Le nombre de colonies sera exprimé dans 100ml d'eau à étudier.

Norme : absence des Pseudomonas dans l'eau analysée

4.3.7 Dénombrement des Clostridiums sulfito réducteurs (Spores Anaérobies Sulfito-réducteurs) dans l'eau :

Les clostridiums sulfito-réducteurs, se présentent sous forme de bactéries Gram positif, de bout carré capsulés, immobiles, anaérobies strictes. Ils permettent de déceler une pollution fécale ancienne ou intermittente.

Mode opératoire :

Prélever environ 25ml de l'eau à analyser dans un tube stérile,

Chauffer les 25ml prélevés à 55°C puis refroidir brutalement provoquant un choc thermique afin de détruire toutes les formes végétatives éventuellement présentes, Répartir ensuite le contenu de ce tube, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5ml par tube,

Ajouter environ 18 à 20 ml de gélose viande foie, fondue puis refroidie à 45°C± 1°C additionné d'une ampoule d'Alum de fer et d'une ampoule de Sulfite de sodium, Mélanger doucement le milieu et l'inoculum, en évitant les bulles d'air et l'introduction de l'oxygène,

Laisser solidifier sur une paillasse pendant 30 mn environ, puis incuber à 37°C pendant 24 à 48h

Lecture :

La première lecture doit absolument être faite au bout de 16heures car très souvent les colonies des spores sulfito-réducteurs sont envahissantes.

La deuxième lecture après 24 heures et la dernière après 48 heures.

Les colonies entourées d'un halo noir (due à la réduction du Sulfite de sodium Na_2SO_3 qui se trouve dans le milieu en sulfite qui en présence de Fe^{++} donne le sulfure de fer (FeS de couleur noir), sont considérées comme des bactéries sulfito-réductrices. Les résultats sont exprimés en nombre de spores/ml d'eau analysée.

Norme : exige l'absence totale des Clostridium-réducteurs.

5. ELABORATION ET SUIVI DES CREMES ANTIRIDES TRANSDERMMIQUES:

La crème antiride est une émulsion inversé (E/H), sa caractéristique principale repose sur sa viscosité. Elle contient plusieurs phases dont les principales sont la phase aqueuse et la phase grasse.

Nous avons réalisé la préparation de nos crèmes selon le protocole suivant :

L'excipient principal de nos crèmes est la transdermite qui a été prescrite par un homéopathe qui préconise la composition suivante :

- Gomme arabique
- Acide acétique
- L'eau osmosée

Il est à noter que la gomme arabique prend environ 4 heures pour être totalement dissoute dans l'eau. Entre temps, nous procédons à un broyage manuel du principe actif principal (phycocyanine) pour obtenir une poudre fine.

Nous ajoutons à phycocyanine, le transdermique jusqu'à l'obtention d'un aspect crémeux (phrase F).

Une fois toutes les analyses de contrôle réalisées, nous avons procédé à la préparation suivante :

Nous avons pesé puis incorporé les matières de la phase A dans un fondoir et nous l'avons laissé chauffer jusqu'à 75°C.

En parallèle, les mêmes procédés (pesée et incorporation) sont effectués dans un turbo émulseur et chauffé également jusqu'à 75°C.

A 75°C et sous turbine, nous avons saupoudré la phase B dans la phase A et nous l'avons laissé turbiner pendant 5 minutes sous vide.

Dès que les 5 minutes se sont écoulées, nous avons incorporé la phase C dans la phase A+B puis laissé turbiner pendant 1 à 2 minutes tout en maintenant le vide dans le turbo.

Après les 10 minutes, nous avons lancé le refroidissement à 30°C.

Nous l'avons laissé refroidir puis nous avons incorporé la phase D+E dans la préparation et nous l'avons laissé turbiner pendant 10 minutes sous vide.

Le mélange a été laissé au repos sous vide dans le mélangeur pendant 30 minutes afin de laisser la cire rendre son plein effet puis nous avons contrôlé le produit semi fini.

A température ambiante, nous avons introduit la phase F à différentes concentrations (0,5 ,1 ,2,5 et 10% de phycocyanine) dans la crème préparée et nous avons bien mélangé afin d'obtenir une texture homogène sans bulles d'air ni grumeaux

5.1 Suivi de la stabilité de la crème élaborée :

Les produits d'entretien, y compris les crèmes sont destinées à être utiliser dans différentes conditions, le froid, la chaleur ou même humidité, pour prouver que notre crème est stable au cours du temps, cette dernière a été soumise à des conditions extrêmes.

Quinze flacons de 60ml sont remplis de la crème, trois pour chaque formulation (pourcentage) :

Un flacon de chaque pourcentage dans un réfrigérateur à 0°C.

Un flacon de chaque pourcentage dans une étuve thermo statée à 45°C.

Un flacon de chaque pourcentage dans une étuve thermo statée à 25°C.

Des observations ont été notées après 15 jours, 30 jours et 2 mois.

5.2 Test rhéologique :

5.2.1 Analyse rhéologique

La caractérisation rhéologique est d'une importance considérable, car elle exprime le comportement du produit en termes de stabilité, d'adhérence, de consistance ou de fluidité.

Le test rhéologique choisi pour les crèmes est le test d'écoulement:

5.2.2 Test d'écoulement à l'équilibre :

L'objectif de ce test est de caractériser le comportement rhéologique des phases, lorsque celles-ci sont en écoulement variable.

Tout fluide a sa propre courbe d'écoulement qui donne la variation de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement et le modèle rhéologique auquel il obéit.

A cet effet, les étapes préliminaires ont été réalisées :

Variation de la vitesse de cisaillement de 1 à $1000s^{-1}$ en rampe logarithmique,

Fixation du nombre de points de mesure à 15, avec un temps de mesure fixé à 150 secondes.

Remarque :

Avant toute opération, nous devons mettre notre crème en conditions à la rhéologie en lui appliquant un pré cisaillement.

Variation de la vitesse de cisaillement de 1 à $1000 s^{-1}$ en rampe logarithmique, Le nombre de points fixés est de 2,

Le temps de mesure entre les deux points est de 10 s,

L'analyse rhéologique est réalisée à l'aide d'un appareil qui est le rhéomètre.

5.2.3 Le rhéomètre :

C'est un viscosimètre de type couette (physica Mc Lab) relié à un thermostat fixé à une température de 20°C , dans lequel le système de mesure utilisé est le Z3 Din (25mm) système mobile et un système fixe constitué de deux unités.

Le dispositif est piloté par un micro-ordinateur utilisant le logiciel US 200 dans ce dernier existant un panneau qui nous permet d'atteindre :

Mesuring : table pour choisir les variables d'entrées concernant l'intervalle 1 et l'intervalle 2 :

Le choix du système de mesure, le nombre de points et le temps de mesure entre les points.

Table : c'est l'affichage de tous les résultats obtenus il affiche aussi : date, heure, type de tests et la température.

Diagram : il permet l'obtention des graphes en 2 ou 3 dimension avec 3 axes, ainsi on a le choix des : couleurs, tailles et valeurs de sorties.

Analysis : il est lancé pour assurer une tâche bien définie : calcul de la contrainte seuil, de la surface sous les graphes, comparaison des rhéogrammes avec des modèles proposées par le logiciel (Casson, Bingham, Casson, Harchel-Bullkley....).

Le logiciel US 200 assure le traitement mathématique des ajustements.

5.3 Etude microscopique des crèmes antiride à bas de phycocyanine (algérienne et tunisienne) à 1% :

L'aspect macroscopique d'une émulsion ne renseigne pas sur son véritable état de stabilité, alors que l'étude microscopique peut donner des renseignements plus détaillés sur cette stabilité dont on peut évaluer la dispersion des gouttelettes dans la phase continue ainsi que l'appréciation de leurs tailles, sachant que la stabilité de ce type d'émulsion dépend de la préparation et essentiellement de l'état de dispersion et l'aspect des gouttelettes dans la phase continue (grasse)

L'étude microscopique est effectuée avec une microscopie optique. L'examen a été réalisé directement, en plaçant une goutte de crème et une goutte d'huile

d'immersion entre la lame et la lamelle, sans oublier d'exercer une légère pression sur la lamelle pour expulser les bulles d'air et avoir suffisamment de transparence, ensuite, on observe à l'aide des objectifs.

5.4 Evaluation sensorielle :

L'analyse ou l'évaluation sensorielle est une technique scientifique normalisée qui permet d'identifier les préférences des consommateurs ou de mesurer la satisfaction à l'utilisation, son objectif est la détermination et l'évaluation des propriétés sensorielles des produits par une description des mesures des perceptions sensorielles grâce aux 5 sens, le corps humain est le seul « instrument » capable d'intégrer plusieurs stimuli simultanément la vision, l'odorat et le touché ces derniers se traduisent par la couleur, l'odeur et la texture (Anonyme, 2000).

Nos crèmes antirides à base de phycocyanine (algérienne et tunisienne) ont été soumises à une évaluation sensorielle le Septembre 2017, en suivant toutes les instructions du test hédonique mené par un jury naïf représentatif de la population concernée, composé de 20 personnes (10 femmes et 10 hommes) choisies au hasard dont la tranche d'âge varie de 30 à 70 ans.

Remarque : L'attribution des mots s'effectue en respectant la notation présente dans les deux tableaux suivants :

Attribution (phycocyanine algérienne)	1	2	3	4	5
Couleur	Horrible	Repoussante	Acceptable	Agréable	Excellente
Odeur	Inodore	Désagréable	Acceptable	Agréable	Très agréable
Texture	Ferme	Gélatineuse	Crémeuse	Visqueuse	Liquide
Pouvoir d'application	Nul	Lent	Moyen	Rapide	Très rapide
Appréciation globale	Acceptable	Médiocre	moyen	bon	excellent

Attribution (phycocyanine tunisienne)	1	2	3	4	5
Couleur	Repoussante	Repoussante	Acceptable	Agréable	Excellente
Odeur	Inodore	Désagréable	Acceptable	Agréable	Très agréable
Texture	Ferme	Gélatineuse	Crémeuse	Visqueuse	Liquide
Pouvoir d'application	Lent	Lent	Moyen	Rapide	Très rapide
Appréciation globale	Acceptable	Médiocre	moyen	bon	excellent

L'analyse des données a été faite en calculant la fréquence relative de chaque descripteur, en divisant le nombre de fois ou le mot a été cité par le nombre total de citation, soit : n/N , exprimé en %. Ici le nombre total cumulé des descripteurs est de 20.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. REACTIVTION DES SOUCHES DE SPIRULINE:

Lors de la réactivation des deux souches dans l'eau bicarbonatée, les filaments de *Spirulina* se détachent les uns des autres. Le milieu se colore en vert-bleu. Cette couleur est due aux pigments extracellulaires de la spiruline en particulier : la phycocyanine et la chlorophylle. Les filtrats obtenus sont utilisés comme inoculum pour ensemercer les milieux après deux à trois filtrations.

2. PURIFICATION DE LA SPIRULINE :

Lorsque les cultures uni-algales sont développées, nous visons l'élimination des bactéries.

Ainsi pour avoir une culture axénique, nous avons eu recours à une purification par filtration qui nous a permis d'éliminer la totalité des bactéries photosynthétiques.

A la fin de cette étape ; nous avons obtenu une culture de *Spirulina platensis* presque totalement pure.

3. OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA SPIRULINE :

L'observation microscopique de la spiruline a montré que les deux souches présentent la forme spirale.

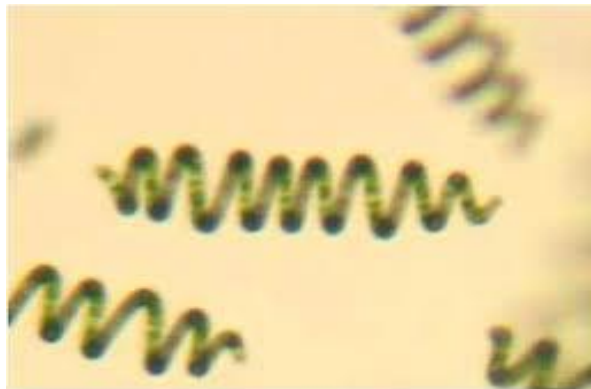


Figure 9: Aspect microscopique de *Spirulina platensis* (Gr:100. 25.10 .0.25)

4. RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO CHIMIQUES DES SOUCHES DE SPIRULINE :

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la poudre de spiruline des deux souches figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats des analyses physico-chimiques des deux souches de spiruline.

Paramètres	spiruline algérienne (%)	spiruline tunisienne(%)
Potentiel d'hydrogène	7,81±0,05	8,81±0,07
Taux d'humidité	5,42±0,031	4,4±0,061
Teneur en protéines	60,32±0,15	80,92±0,30
Teneur en matière grasse	7,28±0,021	9,28±0,076
Taux des sucres totaux	17,63±0,133	21,63±0,422
Taux des cendres	6,88±0,05	8,88±0,09
Apport calorique	369.28 kcal	410.98 kcal

La composition de la spiruline étant sujette à des variations en fonction des conditions de culture et des techniques de production. Certains écarts ont pu être observés pour chaque souche tel que constaté par Doumendji et al ,2012.

4.1. Le pH

Nous avons remarqué que le pH de la poudre de spiruline *Spirulina platensis* des deux souches est de 7,81 ±0,05 pour la souche Algérienne et 8,81±0,07 pour la souche Tunisienne. Le pH est légèrement basique, étant donné que la spiruline a été réalisée dans un milieu alcalin, nos résultats sont conformes à ceux obtenus par Doumandji et al ,2012

4.2. Le taux d'humidité

Le taux d'humidité qui représente la teneur en eau contenue dans la poudre de spiruline de chacune des souches est mesurée en pourcentage d'eau par rapport à son poids sec.

Nous avons observé un taux d'humidité de $5,42 \pm 0,031\%$ pour la souche algérienne et $4,4 \pm 0,061$ pour la souche tunisienne. Ces valeurs sont très proches de celles présentées dans des travaux précédents : Espiard (2002) de 4-6% ; Pierlovisi (2008) 4-7%.

IL est connu que lorsqu'une spiruline a été séchée à température assez haute (60 à 65°C) et qu'elle est réhydratée, ses cellules éclatent et le pH baisse, jusqu'à 5 parfois. Le pH obtenu est d'autant plus bas que la spiruline est bien essorée. Ce bas pH serait dû à l'acidité interne des cellules et/ou à la fermentation commençante (Jourdan, 2012).

4.3 Les protéines :

Il ressort des résultats trouvés que la spiruline est bien l'aliment riche en protéine avec une moyenne de $60,32 \pm 0,15\%$ pour la souche Algérienne, $80,92 \pm 0,30$ pour la souche Tunisienne .

Les valeurs trouvées ($60,32\%$ et $80,92\%$) représentent une grande teneur si nous les comparons avec teneurs moyennes en protéines de certaines graines de légumineuses: haricot (22%), pois (22%) et même le soja (38%) pourtant réputé pour sa richesse en protéines.

Spirulina platensis apparaît donc comme une des espèces végétales les plus riches en protéines (Leonard et Compere, 1967).

La littérature fait ressortir que la spiruline est particulièrement riche en protéines puisqu'elles représentent 50 à 70 % de sa matière sèche (Clément, 1975a ; Fox,

1999). A noter que les teneurs les plus élevées sont obtenues lorsque la récolte a lieu au début de la période lumineuse.

D'autre part, par comparaison avec les autres sources de protéines végétales qui sont toutes moins riches. La spiruline est consommable dans sa totalité.

4.4 Les glucides

D'après le tableau 07, la teneur en glucides représente $17,63 \pm 0,133$ % pour la souche algérienne, $21,63 \pm 0,422$ % pour la souche tunisienne. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues par d'autres auteurs (Quillet, 1975, Shekharam et al., 1987 ; Falquet et Hurni, 2006) .

Les glucides représentent 13,6 à 25% de la matière sèche des Spirulines. La paroi des Spirulines comme pour les bactéries Gram-négatives, est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides.

Les sucres simples comme le glucose, le fructose et le saccharose existent à l'état de traces. Le glycogène représente 0,5%, le glycérol et des polyalcools comme le mannitol et le sorbitol sont présents en petite quantité.

L'essentiel des glucides assimilables est constitué par ces polymères. Ils constituent l'ensemble des mucilages extractibles par l'eau, soit 11 à 12% du poids sec. Le glucosane et le rhamnosane constituent respectivement 1,9% et 9,7% du poids sec de la Spiruline (Quillet, 1975). La glucosamine représente une part non négligeable des polysaccharides. Par contre, le galactose et ses dérivés sont absents de cet équipement glucidique.

La paroi de la spiruline présente une teneur en glycogène estimée à environ 0,5% de son poids sec (Quillet, 1975 ; Fox, 1999) et une teneur en cellulose très faible, soit 0,5% de son poids frais (Jacquet, 1974). Elle serait donc facilement assimilable même par les personnes ayant une absorption intestinale faible.

La spiruline est constituée aussi de polysaccharides sulfatés spécifiques comme le spirulane-calcique (Ca-Sp) ou le spiruline-sodique (Na-Sp) (Lee et al., 1998).

Ces polysaccharides sont porteurs de nombreux résidus sulfatés et se composent de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, d'acide glucuronique et galacturonique, ainsi que d'ions calcium et sodium. Ils auraient d'après des études *in vitro* des propriétés anticoagulantes², immunostimulantes et antivirales (Lee et *al.*, 2001).

4.5 Les cendres

Nous avons observé que les taux de cendres de la poudre de spiruline spirulina platensis des deux souches sont de $6,88 \pm 0,05$ % pour la souche algérienne et $8,88 \pm 0,09$ % pour la souche tunisienne.

D'après Pierlovisi (2008) la spiruline est très riche en fer. Aussi, la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande ce qui serait très intéressant pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques.

Le calcium et le phosphore sont présents à des taux comparables à ceux retrouvés dans le lait et dans des proportions qui excluent tout risque de décalcification par apport excessif de phosphore.

La spiruline est aussi une bonne source de magnésium bio disponible chez l'Homme. Le potassium est richement représenté dans la spiruline, est intéressant dans les pays industrialisés où le rapport sodium/potassium est souvent trop élevé. Enfin, Il est possible d'enrichir des souches de spiruline en certains oligoéléments (Zinc, Sélénium...) en modifiant leur milieu de culture.

4.6 Matière grasse :

Avec un taux de matières grasses de $7,28 \pm 0,021$ % pour la souche Algérienne, $8,88 \pm 0,09$ de poids sec pour la souche Tunisienne, la spiruline peut se vanter de faire partie des sources de protéines les moins grasses. Cette caractéristique lui donne l'avantage de se conserver assez aisément en étant à l'abri des phénomènes d'oxydation des lipides et de rancissement.

D'après Hudson et Karis (1974), les lipides représentent généralement 6 à 8% du poids sec de la Spiruline mais ce pourcentage peut atteindre 11%. La composition en

lipides totaux se subdivise en deux fractions : une fraction saponifiable « ou acides gras » (83%) et une fraction insaponifiable (17%) (Clément, 1975 ; Dillon et *al.*, 1995). Pierlovisi (2008) considère que la spiruline est un aliment à faible apport calorique.

4.7 Détermination des acides gras

Il est maintenant bien établi que l'apport de lipides essentiels influe sur le système immunitaire tant humoral que cellulaire (Hwang, 1989). On range les acides gras essentiels en deux groupes (oméga-3 et oméga-6) caractérisés par la position de l'insaturation la plus proche du groupe méthyl terminal. Comme les acides oméga-3 et oméga-6 sont convertis chez l'homme en dérivés biochimiques distincts qui semblent avoir des effets antagonistes. On recommande un rapport oméga-6/oméga-3 situé entre 4 et 5 (Pascaud et *al.*, 1993).

Pour une analyse détaillée des acides gras de la spiruline, nous nous rapportons à Hudson et Karis (1974); les glycolipides de la spiruline ont aussi été étudiés (Xue et *al.*, 2002). Le profil et les pourcentages des acides gras des souches de spiruline par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont récapitulés dans la figure 10 et 11 et le tableau 08.

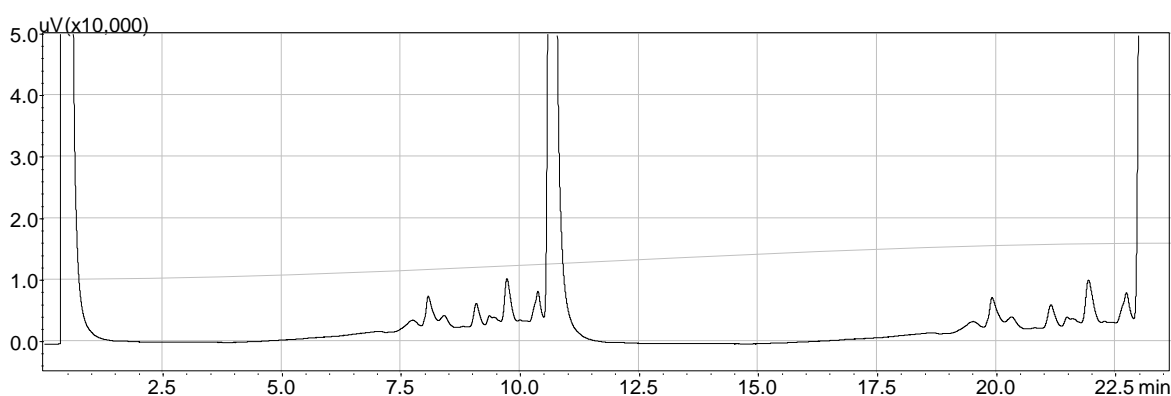


Figure 10: Profil des acides gras de *Spirulina platensis* algérienne

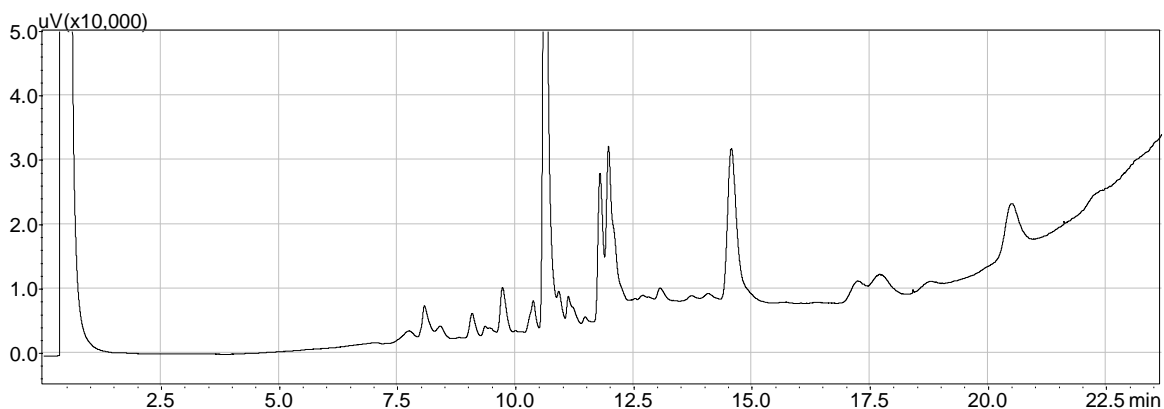


Figure 11: Profil des acides gras de *Spirulina platensis* tunisienne

Neuf (09) acides gras sont identifiés dans notre algue *Spirulina platensis* : acide Laurique (3,1%), acide Myristique (3,6%), acide Palmitique (42,79%), acide Palmitoléique (0,52%), acide Stéarique (1,81%), acide oléique (0,33%), acide linoléique (9,43%), acide Gamma linoléique (18,41%) et acide Béhénique (20,01%).

Tableau 08 : Composition en acides gras de *Spirulina platensis*

Acides Gras	Nomenclature physiologique	Temps de rétention (mn)	Teneur %	Teneur (%) Falquet et Hurni (2006)	Teneur (%) Benahmed-Djilali (2013)
Laurique	C 12 :0	8,066	3,10	-	-
Myristique	C 14 :0	9,718	3,60	0,2-0,5	3,67
Palmitique	C 16:0	10,615	42,79	25-60	46,02
Palmitoléique (Oméga 6)	C 16:1	10,909	0,52	0,5-10	3,07
Stéarique	C 18:0	11,111	1,81	0,5-2	0,26
Oléique (Oméga 9)	C 18:1	11,473	0,33	0,4-16,6	4,89
Linoléique (Oméga 6)	C 18:2	11,781	9,43	10-30	13,11
Gamma linoléique (Oméga 3)	C 18:3	11,961	8,22	8-40	9,53
Béhénique	C 22 :0	14,567		-	-

D'après Pierlovisi, (2008) le profil d'acides gras de la spiruline algérienne et tunisienne varie en fonction de la souche étudiée mais dans notre cas nous avons obtenu pour les deux souches un même profil. En règle générale, après hydrolyse, la spiruline renferme principalement :

Des acides gras poly insaturés essentiels à 18 atomes de carbones, notamment de la série oméga-6 (ω 6).

Dans notre cas, nous avons pu obtenir pour les deux souches algérienne et tunisienne 3,10% d'acide Laurique, 3,60%, 3,60% d'acide Myristique, 42,79% d'acide palmitique, 0,52% d'acide palmitoléique (oméga 6), 1,81% d'acide Stéarique, 0,33% d'acide Oléique, 9,43% d'acide linoléique, 18,41% d'acide gamma linoléique et 20,01% d'acide Béhénique

C'est une des meilleures sources d'acide gamma-linolénique (18:3 ω 6) après le lait humain et certaines huiles végétales onéreuses.

Aussi, la présence d'acide gamma-linolénique, 18:3oméga-6 est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants et de sa haute valeur alimentaire présumée (Ottles, 2001). Normalement synthétisé chez l'homme (à partir de l'acide linoléique, 18:2oméga-6, d'origine végétale) l'acide gamma linoléique présent dans un ordre de 18,41% peut être directement assimilé avec profit en cas de trouble ou d'insuffisance de sa synthèse endogène (Merck, 1994).

L'importance de ces acides gras tient à leurs devenir biochimiques: ce sont les précurseurs des prostaglandines, des leukotriènes et des tromboxanes qui sont autant de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires.

Cette richesse lui donne un intérêt biologique particulier puisque que cet acide gras est un précurseur des prostaglandines, molécules ayant une activité anti-inflammatoire et immunostimulante au sein de l'organisme.

D'autres acides gras essentiels comme l'acide linoléique (18:2 ω 6) sont retrouvés dans la spiruline des deux souches ainsi qu'un fort pourcentage d'acide palmitique (acide gras saturé) permettant de préférer certaines souches à d'autres.

La fraction insaponifiable de la spiruline pour les deux souches (17%) renferme des stérols en faible quantité (cholestérol en majeure partie, clionastérol, stigmastérol,

campestérol), des terpènes (α et β -amyrine pour l'essentiel) et des hydrocarbures saturés à longue chaîne ou paraffines (principalement du ndécaheptane, composant potentiellement toxique et devant faire l'objet d'essais toxicologiques).

La fraction saponifiable, représentant 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la Spiruline (Fox 1999), est essentiellement composée de monogalactosyl diglycérade et de digalactosyl diglycérade (23%), de sulfoquinovosyl diglycérade (5%) et de phosphatidyl glycérol (25,9%) (Xue et *al.*, 2002). Les triglycérades ne sont présents qu'à de très faibles taux (0,3%).

La phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine et le phosphatidyl inositol ne sont pas présents en quantité appréciable. Il est à noter que 4,6% de phospholipides sont encore indéfinis.

La composition des principaux acides gras de l'espèce *Spirulina platensis* des deux souches (Tableau 08) révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels (acides gras insaturés C18). Ces acides gras incluent les oméga-3 et des oméga-6 qui sont qualifiés d'essentiels car l'organisme humain en a absolument besoin et ne peut les produire.

Les acides gras oméga-3 et oméga-6 de la Spiruline pour les deux souches préviendraient l'accumulation de cholestérol dans l'organisme. Ceci pourrait expliquer en partie la diminution des taux en cholestérol et triglycérades observés lors des expériences de Ramamoorthy et Premakumari (1996) et Samuels et *al.* (2002). Ces expériences sur l'homme sont cependant réalisées avec de faibles effectifs et sur des sujets souffrant d'hyper cholestérolémie ou hyperlipidémie.

L'acide gamma-linolénique (non-essentiel car il peut être synthétisé à partir de l'acide gras linoléique) constitue 10 à 20% des acides gras (soit 1-2% du poids sec) chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *S. platensis*, (soit 4% du poids sec).

Les deux souches de spiruline Algérienne et Tunisienne figureraient d'après nos résultats, parmi les meilleures sources connues d'acide gamma linoléique, avec le lait humain, et quelques huiles végétales peu connues (huile d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre) (Ciferri 1983 ; Cohen et *al.*, 1993). La présence

d'acide gamma-linolénique est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants et que c'est un précurseur de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (Falquet et Hurni, 2006).

Les sulfolipides tels les sulfoquinovosyl diglycérides qui représentent 5% de la fraction saponifiable, intéressent les chercheurs pour leur activité protectrice contre des infections virales. Le composant lipide sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) de *Spirulina platensis* riche en sulfolipides a démontré par expérience *in vitro* sa capacité à inhiber la transcriptase inverse¹ du hiv-1 et du hiv-2 alors que ce dernier est naturellement résistant à cette classe de molécules (Kiet et Durand-Chastel, 2006). Des études *in vitro* ont indiqué que l'acide linoléique et le gamma-linolénique pourraient affecter la croissance et l'adhérence des probiotiques (Laparra et Sanz, 2010).

4.8 Le pouvoir calorique

Le pouvoir calorifique de la spiruline a été calculé à l'aide d'un calorimètre. Les valeurs obtenues indiquent que ce paramètre n'est pas très élevé (369,28 kcal/g) pour la souche Algérienne par contre pour la souche Tunisienne nous notons une valeur supérieure soit (500 ,23 Kcal /g).

La spiruline se rattrape aisément par sa valeur protéique et vitaminique, en comparant par d'autres aliments énergétiques tels les céréales.

4.9 Détermination de la teneur en éléments minéraux par spectroscopie d'absorption atomique

Les résultats d'analyses de la composition minérale de la poudre de spiruline sont présentés dans le tableau 09 en comparaison avec les données de Johnson and Shubert,(1986).

Tableau 9 : Composition minérale de la poudre de la spiruline (mg/g).

	Fe	Zn	Ca	Na	K
spiruline algérienne	2,5	0,009	17	6	16
spiruline Tunisienne	4	0,01	21	7	18
Données de Johnson and Shubert, (1986)	0,58-1,8	0,021- 0,040*	1.3 - 14	4,5	6,4 – 15,4

* : Valeur obtenus par enrichissement spécifique

D'après le tableau 9 nous remarquons que la spiruline de Tamanrasset et la spiruline Tunisienne présentent des valeurs relativement élevées en éléments essentiels pour l'organisme tels que le fer le sodium le potassium qui sont respectivement, de (2,5 ; 4), (6,7) (16 ,18) mg/g de matière sèche, cependant, les teneur en calcium et en Zinc sont plus faibles que celle rencontrés par d'autres auteurs (Flaquet et Hunri, 2006).

Il est aussi rapporté que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande (Puyfoulhou et *al.*, 2001). Plusieurs études ont été effectuées, montrant l'utilisation de la spiruline comme agent bio-adsorbant des métaux (Rangsayatorn et *al.*, 2004 ; Solisio et *al.*, 2006).

Toutefois, les micro-algues photosynthétiques comprennent des fonctions carboxyles sulfates et d'autres fonctions ionisables qui permettent la fixation ionique ou chimique de molécules (cas de la plupart des oligo-éléments et des métaux essentiels). Mais les métaux toxiques comme le plomb et le mercure sont aussi concernés par ce phénomène de Séquestration.

Et c'est la raison pour laquelle il est important de réaliser un contrôle sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à l'alimentation humaine. (Benahmed Djilali, 2013).

La richesse de la spiruline algérienne et tunisienne en fer, dont la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande, se révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques. Enfin, Il est possible d'enrichir des souches de spiruline en certains oligoéléments (Zinc, Sélénium et Calcium...) en modifiant leur milieu de culture (Pierlovisi, 2008).

4.10 Détermination des pigments

Tableau 10: Teneur en phytonutriments de *Spirulina platensis*

Composé	Chlorophylle totale (mg/g)	Carotenoides (mg/g)
<i>Spirulina platensis</i> Algérienne	3,67 ± 0,05	3,505 ± 0,001
<i>Spirulina platensis</i> Tunisienne	4,23 ± 1,15	4,205 ± 0,02

La spiruline pour les deux souches renferme de la chlorophylle, typique chez les végétaux, des caroténoïdes et des phycobiliprotéines. Ces pigments présentent un intérêt dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

5. EXTRACTION DE PHYCOCYANINE

Les concentrations de phycocyanine obtenues pour les deux souches (algérienne et tunisienne) selon les différentes méthodes d'extractions sont représentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline algérienne et tunisienne en fonction du mode d'extraction.

Méthodes d'extraction	Concentration (mg/ml)		Degré de pureté	
	Sp Alg (*)	SpTun (**)	Sp Alg (*)	SpTun (**)
Eau	0,19	0,20	0,20	0,25
Congélation	0,06	0,10	0,80	0,90
Sonification	0,25	0,25	0,60	0,80
Solvant	0,30	0,35	0,55	1,00
Séparation aqueuse à double phase	0,39	0,41	0,30	0,4

(*) Spiruline algérienne (**) spiruline tunisienne

Nous remarquons que la concentration en phycocyanine de la spiruline sèche pour les deux souches (algérienne et tunisienne) varie entre 0.06-0.39 mg/ml pour la souche algérienne et 0,20-0,41 mg/ml pour la souche tunisienne. Un effet significatif du pays de production sur la concentration d'extraction est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée. En effet, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des concentrations de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne.

Nous avons regroupé les différentes concentrations et les rapports de pureté selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 12 :

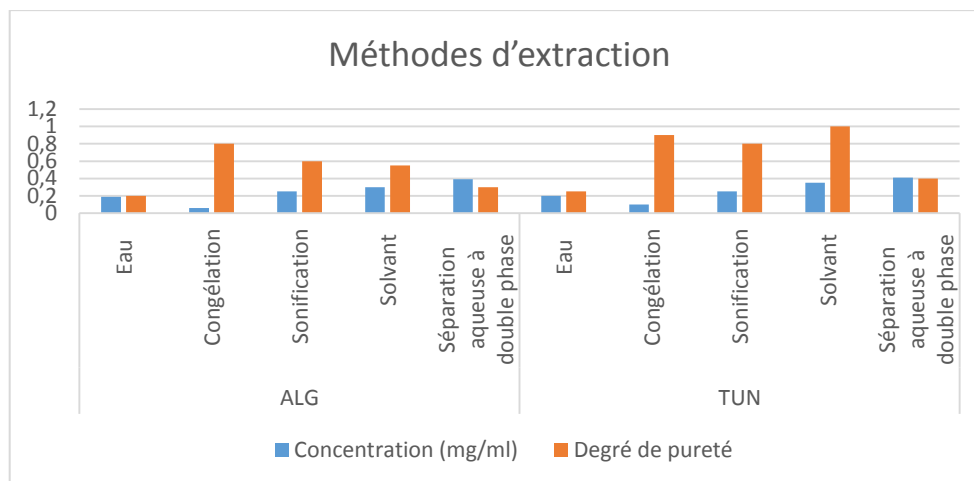


Figure 12. Concentrations et pourcentages de pureté de la phycocyanine des souches (algérienne et tunisienne) de la spiruline, (N = 3) ± SD. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p \leq 0,05$) selon le test LSD.

Nous remarquons également que l'extraction aqueuse à deux phases a donné des concentrations supérieures en C-phycocyanine comparativement aux autres méthodes (eau) pour les deux souches (algérienne et tunisienne) (0,39 vs 0,19 mg/ml).

Concernant la pureté, l'extraction par congélation a donné des valeurs de pureté supérieures aux autres méthodes (par sonification, par solvant) (0,80 vs 0,60) et 0,80 vs 0,55).

Une pureté de C-phycocyanine de 0.7 est considérée comme grade alimentaire, 3.5 comme grade réactive, par contre si elle est supérieure 4, elle est considérée comme grade analytique. Ces valeurs indicatives permettent d'affirmer que cette extraction est de l'ordre alimentaire. Un effet significatif du pays de production sur le degré de pureté est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée.

Que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des degrés de pureté de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne. La pureté d'extraction est de l'ordre de 0.40 avec une extraction de phycocyanine de l'ordre de 3.73 mg/ml avec l'eau et 4.20 mg/ml avec le tampon phosphate. Benedetti *et al.* ont obtenu une pureté de 2,74 avec une extraction avec sulfate d'ammonium à 50%.

Toutefois nous avons trouvé une pureté de 0.79 et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 2.67 mg/ml par une extraction aqueuse à double phase alors que

(Henrikson,R,2009) ont obtenu par la même méthode une pureté de 5.1 et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 1.11 mg/ml.



Figure 13: Extraction De Phycocyanine (source : laboratoire de chimie industriel CRROT)

Extraction par macération avec le glycérol :

A la fin de la filtration, nous avons obtenu avec la spiruline Algérienne environ 2,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 0,625 mg/ml avec une pureté de l'ordre de 1,37.

Par contre avec la spiruline Tunisienne nous avons obtenu un taux de rendement plus élevé de 50% avec une concentration de 1 ,90mg/ml. Ces différences de valeurs pourraient être liées aux conditions de culture, au climat, à la souche mère, ou encore aux moyens de séchage.



Figure 14: Extraction par macération avec le glycérol (source : laboratoire de Biotechnologie Végétale USDB)

6. CARACTERISATION DE LA PHYCOCYANINE

6.1 Poly phénols totaux

Nous avons regroupé les différentes concentrations selon les méthodes d'extraction au niveau des figures 13 et 14 suivantes :

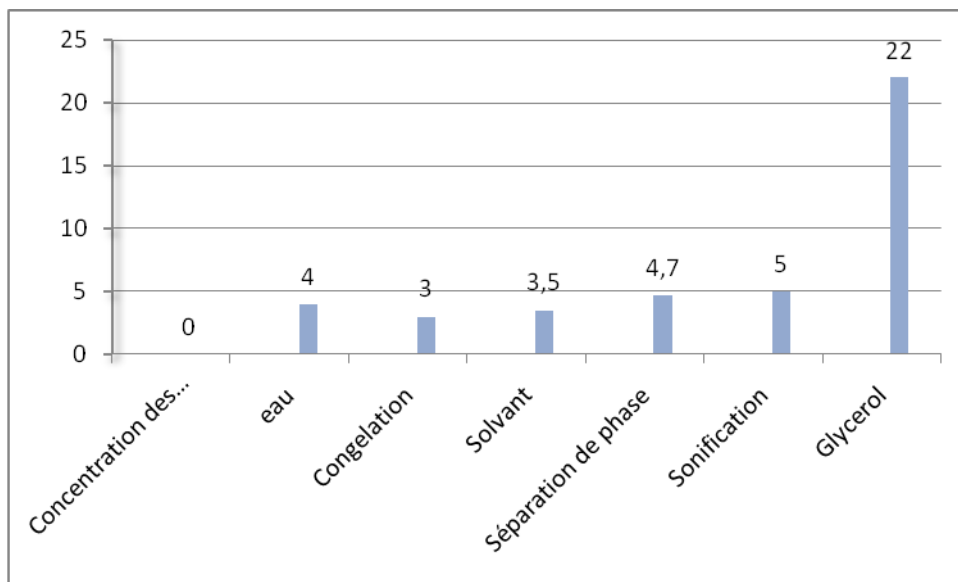


Figure 13: Concentration des polyphénols totaux issus de la phycocyanine Algérienne.

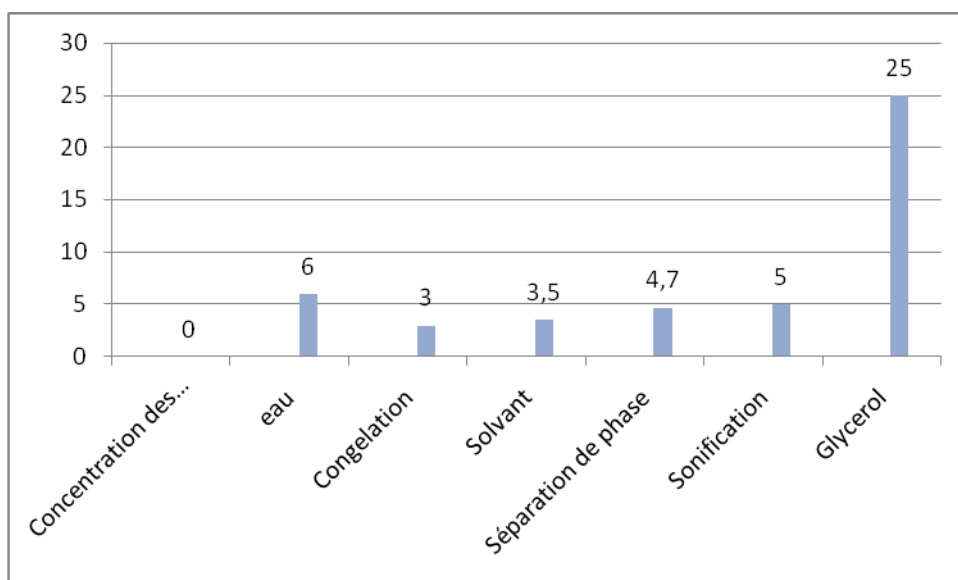


Figure 14: Concentration de polyphénols totaux issus de la phycocyanine Tunisienne.

Nous remarquons que la concentration des polyphénols totaux à partir des différentes méthodes d'extractions de C-phycoyanine est comprise entre 4 et 22 mg/g de matière sèche pour la souche algérienne et 6 et 25 mg/g de matières sèches pour la souche tunisienne. Les phycocyanines sont riches en polyphénols. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par (Danesi, E. D. G, 2011) à 4,9 µg/g). Toutefois nous avons noté que la concentration des polyphénols totaux la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol (25 et 22 g/gms).

Cependant la souche tunisienne a donné des valeurs supérieures en polyphénols par rapport à la souche algérienne (25 vs 22 g/gms).

6.2 Les Flavonoïdes

Les concentrations des flavonoïdes obtenues par différentes méthodes d'extraction sont représentées dans le tableau 12 :

Tableau 12 : Concentration en flavonoïdes pour la spiruline (algérienne et tunisienne)

		Méthode d'extraction					
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase	Glycérol
Flavonoïde (mg/g)	Spiruline algérienne	0,33	0,27	1,878	2,12	0,25	3,4
	Spiruline tunisienne	0,45	0,32	2,1	2,9	0,75	4,5

La concentration la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol pour les deux souches (algérienne et tunisienne) avec des valeurs respectives de 3,4 mg/g et 4,5 mg/g.

Par contre, les concentrations les plus faibles sont obtenues par les méthodes d'extraction par sonification et par l'eau (0,33mg/g , 0,45 mg/g) respectivement. La phycocyanine tunisienne montre des valeurs plus élevées par rapport à la phycocyanine algérienne en flavonoïde quelque soit la méthode d'extraction utilisée.

6.3 L'activité anti oxydante

Les résultats de l'activité anti oxydante sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 13: Valeurs (en %) d'activité anti oxydante pour la spiruline (algérienne et tunisienne)

		Méthode d'extraction					
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase	Glycérol
Activité anti oxydante (%)	Souche algérienne	0,2	0,16	0,01	0,23	0,06	0,6
	Souche tunisienne	0,4	0,13	0,015	0,33	0,09	1,4

Nous avons obtenu une activité qui varie de 0,2 à 0,6% pour la souche Algérienne et une activité qui varie de 0,4 à 1,4% pour la souche tunisienne. D'après le tableau 13, nous remarquons que les méthodes d'extraction par le glycérol montrent une activité antioxydante la plus élevée avec toutefois, une activité antioxydante supérieure pour la souche tunisienne. Nous avons obtenu une activité antioxydante variant de 0,17 à 51,94% selon que la concentration de spiruline varie de 0,3 à 15 mg/ml.

6.4 Le Pouvoir réducteur

La quantification de l'activité antioxydante d'un extrait par le biais du pouvoir réducteur (PR) implique la capacité des antioxydants analysés à transformer le fer (III) en fer (II), grâce à leur faculté donatrice d'électrons.

Tableau 14 : Pouvoir réducteur des deux souches de phycocyanine (algérienne et tunisienne) .

Pouvoir réducteur (en absorbance)	
Extraction par macération avec le glycerol	
Phycocyanine Algérienne	1.749 ±0.052
Phycocyanine Tunisienne	1.788 ±0.0026

D'après le tableau ci-dessus, la phycocyanine tunisienne extraite par macération avec le glycérol possède le meilleur pouvoir réducteur. Cependant, la différence est non significatives ($p > 0.05$), sachant que la phycocyanine présente une meilleure activité antioxydante révélée par le test de DPPH.

Conclusion :

La spiruline est devenue populaire dans les pays industrialisés comme aliment santé ou supplément alimentaire. Elle est le nutriment le plus complet que l'on puisse trouver dans la nature, que ce soit dans les produits végétaux ou les sources animales. Elle est un complément alimentaire naturel d'exception, champion des aliments de santé et de vitalité.

D'après les analyses que nous avons effectués il ressort que :

- ✓ La spiruline est riche en éléments minéraux, protéines, sucres et poly phénols totaux avec une activité antioxydante élevée.
- ✓ Du point de vue microbiologiques les deux souches de spiruline présentent des résultats inférieurs à ceux obtenues au niveau des fermes au japon, France et suisse. D'où, il est nécessaire d'améliorer la qualité microbiologique des spirulines produites en Tunisie et en Algérie pour qu'elle soit compétente aux celles produites par les pays industrialisés.
- ✓ La méthode d'extraction de phycocyanine a un effet sur sa concentration et sa pureté d'où il est indispensable de bien choisir la méthode pour augmenter le rendement.

Formulation de la crème transdermique à base de la phycocyanine extraite des deux souches algérienne et tunisienne :

Evaluation organoleptique des matières premières :

Nous avons regroupé les résultats organoleptiques des matières premières. dans le tableau N° 15 en annexe .

Les résultats des tests ont montrés une conformité avec les exigences internes de l'usine de cosmétique basées sur les normes de la pharmacopée Européenne 2009

basée sur les normes ISO 22000 et du HACCP, cela indique que les conditions de conservation, de transport et de stockage des matières premières ont été bien respectées.

Nous pouvons conclure que l'évaluation organoleptique effectuée sur les matières premières présente des propriétés sensorielles satisfaisantes (aspect, Couleur et odeur).

7. RESULTATS ET DISCUSSION DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES CONSTITUANTS DE LA CREME:

7.1 Analyses physico-chimiques des matières premières :

7.1.1 Extrait sec total et taux d'humidité :

Le tableau 16 regroupe les résultats de l'extrait sec total et du taux d'humidité effectué sur la phycocyanine algérienne et tunisienne :

Tableau 16 : Résultats de l'EST % et H%

Résultats (souche algérienne)	Résultat	Norme : Selon Jourdan 2006	Interprétation
EST%	97	>90	Conforme
H%	6	<10	Conforme

Résultats (souche tunisienne)	Résultat	Norme : Selon Jourdan 2006	Interprétation
EST%	127	>90	Conforme
H%	7,09	<10	Conforme

Les résultats des analyses de l'extrait sec total et du taux d'humidité sont conformes aux normes indiquées par Jourdan 2006.

7.1.2 Taux de cendres :

Le tableau 17 regroupe les résultats de la teneur en cendres de la phycocyanine algérienne et tunisienne.

Tableau 17 : Teneur en cendre de la phycocyanine séchée en (MS%)

	Phycocyanine algérienne
Taux de cendre	7.35
Normes	6-8
Référence	ISO 2251
	Phycocyanine Tunisienne
Taux de cendre	6.85
Normes	6-8
Référence	ISO 2251

Les résultats des analyses du taux de cendre de la phycocyanine pour les deux souches séchées sont conformes aux normes indiquées (ISO 2251) et la valeur est proche de celle mentionnée par Vidal, 2008.

7.1.3 Indice d'acide :

Les résultats de la mesure de l'indice d'acide de certaines matières premières sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 18: Indice d'acide des matières premières

Substance	Résultat	Exigences internes	Interprétation
Polyglycerolstéarate	0.25	0.00- 3.00	Conforme
Hydroxy stéarate	0.1	<1	Conforme
Cetiol CC	0.1	0.00- 0.2	Conforme
Tocopheril acétate	0.3	Maximum 0.5	Conforme
Cire d'abeille	18.30	17-24	Conforme

Le contrôle de l'indice d'acide des matières premières montre une parfaite conformité aux exigences internes (exigences de l'entreprise), cela signifie que les matières premières n'ont subies aucune altération au cours du stockage.

7.1.4 Indice de réfraction à 20°C :

Les résultats de l'indice de réfraction sont regroupés dans le tableau 19 :

Tableau 19 : Indice de réfraction des matières premières à 20°C

Substance	Résultat	Exigences de l'entreprise	Interprétation
Cetiol CC	1.4365	1.435-1.437	Conforme
Glycérine	1.475	1.47-1.475	Conforme
Conservateur (2)	1.373	1.373-1.379	Conforme
Collagène	1.34	1.34-1.342	Conforme
Tocophérol acétate	1.49515	1.492-0.499	Conforme
Oxynex 2004	1.465	1.4566-1.4666	Conforme
Parfum crème	1.0021	1.0021	Conforme

Les résultats de l'indice de réfraction s'accordent avec la norme Algérienne NA.278, ce qui nous permet d'attester la pureté de toutes les matières analysées.

7.1.5 Mesure de PH :

Les résultats du pH sont mentionnés dans le tableau 20

Tableau 20 : valeur du pH des matières premières

Substance	Résultat	Exigences de l'entreprise	Interprétation
Poly-glycérol stéarate	7,83	7-8	Conforme
Silica	6,55	5,5-7,5	Conforme
Pigment	7,05	5,00-8,2	Conforme
EDTA	4,49	4-5	Conforme
Conservateur (2)	2,72	1,5-2	Conforme
Collagène	3,6	3,00- 4,00	Conforme
Phycocyanine tunisienne	7,37	6-9 (J.P.Jourdan, 2006)	Conforme
Phycocyanine algérienne	6,91	6-9 (J.P.Jourdan, 2006)	Conforme
Eau	6,21	6,20-7	Conforme

Nous constatons que les résultats du pH sont conformes aux exigences internes de même pour la Phycocyanine selon Jourdan 2006.

7.1.6 Indice de saponification :

Les résultats de l'indice de saponification sont réunis dans le tableau suivant :

Tableau 21 : indice de saponification des matières premières

Substance	Résultat	Exigences de l'entreprise	Interprétation
Poly-glycérol stéarate	150	140-160	Conforme
Hydroxy stéarate	183	170-190	Conforme
Cire d'abeille	88	87-104	Conforme

D'après ce tableau, nous pouvons conclure que les résultats de l'indice de saponification sont conformes aux normes de la pharmacopée Européenne 2009.

7.1.7 Densité 20°C :

Les résultats de la densité des matières premières sont regroupés dans le tableau 20 :

Tableau 22 : Densité des matières premières

Substance	Résultats	Exigences de l'entreprise	Interprétation
Cetiol CC	0,8928	0,89- 0,93	Conforme
Conservateur (1)	1,13	1,10-1,14	Conforme
Conservateur (2)	1,19	1,17-1,23	Conforme
Collagène	1,025	1,021- 1,025	Conforme
Parfum crème	1,496	1,496	Conforme

Il est à signaler que la mesure de ce paramètre est étroitement liée à la température. En pratique, les mesures de la densité s'effectuent à température ambiante (20°C) et c'est ce que nous avons fait. Quant aux résultats obtenus, ils s'avèrent conformes aux exigences de la norme établie par NF T20-053.

7.1.8 Analyses physico chimiques de l'eau

L'eau étant considérée comme matière première de grande importance, nous avons procédé à son contrôle physico-chimique d'une manière spécifique.

Le tableau 23 regroupe tous les résultats des analyses physico-chimiques de l'eau.

Tableau 23 : Analyses physico-chimique de l'eau :

Substance	Résultat	Exigence de l'entreprise	Interprétation
Conductivité	4,3 μ s	0-4,3 μ s	Conforme
Chlorure	0 ppm	0 ppm	Conforme
Calcium et Magnésium	0 ppm	0 ppm	Conforme

La conductivité qui traduit la minéralisation totale de l'eau est conforme aux exigences des normes de la pharmacopée Européenne 2009. Le calcium et le magnésium sont deux éléments responsables de la dureté de l'eau, et dans le cas de notre eau de process, nous avons absence de ces deux éléments.

7.2. Analyses physico-chimiques du produit semi fini et du produit fini :

Les résultats du contrôle physico-chimique du produit semi fini sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau 24 : Viscosité et densité des produits semi fini et fini (dans l'ordre)

Essai	Résultat	spécification	Interprétation	Norme
Viscosité à 23 ±02°C (mobil 7, vitesse 20)	120.000	80.000± 10.000	Conforme	Pharmacopée Européenne 2009
	120.000	90.000-120.000	Conforme	NA 376
Densité à 20 ±02°C	0,97	0,930- 0,970	Conforme	NF T020-053

La valeur de la viscosité cinématique est de 120000 mPa.s, cette valeur se situe dans la spécification retenue par les normes NA 376 (produit fini), pharmacopée Européenne 2009 (produit semi fini). De même pour la densité, étant de 097, se trouve également conforme à la norme NF T020-053.

Ces résultats conformes aux normes, renseignent sur le respect de l'application de la formule.

En conclusion :

Le contrôle physicochimique des matières premières (détermination du pH, indice d'acide et autres) a montré des résultats conformes aux normes internationales, confirmant l'efficacité du traitement concernant l'eau, le respect des conditions de stockage et la bonne pratique de fabrication des autres matières premières.

De même pour le produit semi fini et fini ce qui montre une application rigoureuse du protocole de fabrication, et l'utilisation de matières premières de bonne qualité.

7.3 Analyses microbiologiques des matières premières :

Les résultats des analyses microbiologiques sur les matières premières sont regroupés dans le tableau 25. Voir annexe

Les résultats du contrôle microbiologique des matières premières sont conformes aux normes, ainsi l'absence de la flore aérobie mésophile totale nous indique que les matières premières sont de bonne qualité hygiénique. Aussi l'absence des levures et moisissures révèle leur bonne qualité marchande et peut être expliqué par :

- L'origine synthétique des matières premières qui est défavorable au développement microbien.
- La faible activité de l'eau (W) de la matière première solide.
- L'emballage étanche au développement des micro-organismes.
- Le prélèvement et l'analyse ont été faits dans conditions d'asepsie strictes.

Les étapes de fabrication et de conditionnement ont été faites dans des conditions aseptiques. De même que toutes les matières premières, nous avons procédé au contrôle microbiologique de l'eau et dont les résultats regroupés dans le tableau ci-dessus :

Tableau 26 : Microbiologie de l'eau

Essais	Résultats	Norme NF T90416	Interprétation
Flore aérobie mésophile totale	1UFC/100ml	$\leq 10^2$ UFC/ml	Conforme
Coliforme totaux et Fécaux	Absence/100ml	0UFC/ml	Conforme
Entérocoques ou Streptocoques	Absence/100ml	0UFC/ml	Conforme
Pseudomonas	Absence/100ml	0UFC/ml	Conforme
Clostridium sulfitoréducteur	Absence de spores/20ml	0spore/ml	Conforme

Les résultats du contrôle microbiologique de l'eau répondent aux normes, l'absence des germes pathogène nous renseigne sur l'efficacité des procédés de traitement physico-chimique et chimique (sédimentation, filtration) opérés au niveau de l'unité.

7.4 Analyses microbiologiques du produit semi fini et produit fini :

Les résultats du produit semi fini et du produit fini sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 27 : Microbiologie des produits semi fini et fini

Essai	Résultat				
	ECH (1)	ECH (2)	ECH (3)	ECH (5)	ECH (6)
Flore aérobie Mésophile Totale	absence	absence	absence	absence	Absence
Spécification Norme NA 82 87	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml
Interprétation	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Levures et moisissures	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Spécification de la norme NA 8285	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml
Interprétation	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

ECH : échantillon Abs : absence

L'absence des germes aérobies mésophiles totaux, des levures et moisissures nous renseigne sur la qualité hygiénique du produit semi fini et fini qui répond bien aux exigences des normes NA 82-87 et 82-85.

Le contrôle microbiologique effectué depuis la matière première jusqu'au produit fini, il a révélé une bonne qualité hygiénique de ce dernier, ce qui est conforme aux normes.

Ce résultat est le fruit du respect des conditions de fabrication, des plans de nettoyage et de désinfection du matériel d'équipement des chaînes de fabrication.

Mis à part les analyses de routine (analyses organoleptiques, physico-chimiques et microbiologique) des matières premières, produit semi fini et produit fini, nous avons également procédé à d'autres analyses complémentaires liés à la sécurité du consommateur.

Elles ont porté sur les bonnes pratiques d'hygiène et ont visé :

*Le personnel (de fabrication, de conditionnement et d'entretien) :

Le personnel représente une source non négligeable de contamination par les germes dont il est porteur même en l'absence de pathologies infectieuses (peux, cheveux,

salive, vêtements, chaussures et autres) (Martini et Seiller 2006). Pour cela des règles sont à suivre rigoureusement :

- Port de blouses ou de combinaison, selon le lieu de travail (laboratoire ou atelier).
- Port de gants, de charlottes, des masques et des lunettes.
- Lavage et désinfection de mains.

*Les Locaux et équipements :

La contamination des produits peut être due à la réalisation de certaines opérations dans des locaux ou du matériel inadaptés ou insuffisamment protégés de la pollution, pour éviter ce type de contamination :

- les turbos, les fondoirs et les cuves de stockage sont lavés avec précision au niveau des tuyaux, des coins, des trous et tout endroit susceptible de retenir des contaminants.
- avant utilisation et après chaque lavage des cuves, un écouvillonnage est appliqué pour confirmer l'absence des micro-organismes par ATP-mètre.

Ces aspects se réfèrent à l'application du système HACCP qui se base sur la maîtrise des 5 M à savoir :

- Matières premières
- Matériel
- Méthode
- Mains d'œuvre
- Milieu

En conclusion :

Nous pouvons dire que nous avons soigneusement veillé à respecter toutes les bonnes pratiques d'hygiène et la maîtrise des 5M.

8. SUIVI DE LA STABILITE DU PRODUIT FINI :

Le suivi de la stabilité du produit élaboré a été réalisé après 15, 30 et 60 jours et cela à différentes températures de conservation 0,25 et 45°C.

Après 15 jours :

*A 0°C :

Les crèmes déposées dans le réfrigérateur à 0°C n'ont pas montrées un changement de couleur et d'odeur sauf une légère augmentation de la viscosité

*A25°C :

25° C est la température ambiante, les crèmes n'ont pas changées, elles sont restés stables du point de vue couleur, odeur et consistance (viscosité).

*A45°C :

Les crèmes sont apparues stables, pas de changement de couleur ni d'odeur avec une légère diminution de viscosité.

Après 30jours :

*A0°C :

Emulsion stable pas de changement de couleur ou d'odeur excepté une légère augmentation de viscosité.

*A25°C :

Stabilité de l'émulsion, pas de changement remarqué (ni couleur, ni odeur, ni viscosité).

*A45°C :

Nous avons noté un changement d'odeur. Ainsi la couleur, virage du vert au jeune moutarde avec une intensité d'autant plus accentuée que le pourcentage de la spiruline augmente est fonction de du pourcentage de la spiruline, et changement est probablement le résultat de la dégradation des composées de spiruline, principalement les protéines. Il est à noter aussi, une diminution de la viscosité.

Après 60jours :

*A0°C comme à 25°C et 45°C :

Les changements que nous a pu remarquer après 30 jours sont les mêmes qu'après 45 jours. Les résultats observés après 60 jours sont les mêmes observés après 30 jours, cela s'explique par l'absence de changement donc la stabilité de l'émulsion.

En conclusion :

Les crèmes élaborées se conservent bien à 0 et 25°C et donc sont stables dans le temps. Nous avons observé à 45°C un changement d'odeur et de couleur qui est probablement dû à la dégradation des composants de la phycocyanine.

9. RESULTATS ET DISCUSSION DES TEST REHOLOGIQUES :

Nous avons procédé à un test rhéologique pour confirmer la stabilité des crèmes et de designer la crème ou les crèmes semblables à la référence et conformes à l'utilisation. Les résultats de ce test sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 28 : Modélisation

Référence \ Modèle	Référence (1)	Référence (2)	Référence (3)
Ostwald $\pi = K \cdot Y$	Y=203.56 K=0.26083 R=0.99542	Y=190.34 K=0.26849 R=0.99535	Y=59.018 K=0.3277 R=0.99503
Hershel-Bulkley $\pi = \pi_0 + K \cdot Y$	Y=120.99 K=100.42 R=0.99542 $\eta = 0.36221$	Y=116.37 K=92.553 R=0.98973 $\eta = 0.3719$	Y=177.48 K=104.31 R=0.99687 $\eta = 0.34893$
Casson $\pi^{1/2} = \pi^{1/2} + (\eta^\circ \cdot y)^{1/2}$	Y= 15.579 K=0.80534 R=0.93219 $\eta = 2$	Y=15.144 K=0.8026 R=0.91499 $\eta = 2$	Y=7.3261 K=0.92048 R=0.95504 $\eta = 2$
Bingham $\pi = \pi_0 + \eta p \cdot Y$	Y=293.49 K=1.4945 R=0.84673	Y=279.43 K=1.4154 R=0.8245	Y=72.419 K=1.8021 R=0.89232
Tscheushner $\pi = Y \cdot K \cdot \pi_0 + \eta \cdot \pi_0$	Y=174.03 K=0.91323 R=0.99958 $\eta = 0.52247$	Y=180.32 K=1.5904 R=0.99916 $\eta = 38.313$	Y=56.631 K=123.22 R=0.99847 $\eta = 0.99$

Avec les paramètres rhéologiques :

π : Contrainte

π_0 : Contrainte seuil

K : Indice de consistance
 Y : Vitesse de cisaillement (déformation)
 η : Viscosité

Choix du modèle rhéologique :

Le modèle rhéologique choisi est celui de Harschel-Bulkley dont le coefficient de corrélation tend vers 1, les autres modèles sont rejetés du fait que :

Tscheuschner : donne des résultats négatifs bien que son R soit le plus proche de 1

Bingham : à un R faible

Casson : à un n élevé

Ostwald : à une vitesse de cisaillement variable

Pour la crème de référence :

Tableau 29 : résultats pour la crème de référence choisie :

Harschel-Bulkley	Crème antiride de référence 1	Crème de référence 2	Crème de référence 3
Paramètres			
Y	120.99	116.37	177.48
K	100.42	92.553	104.31
η	0.36221	0.3719	0.34893
R	0.99687	0.98973	0.9961

Harschel-Bulkley	Crème antiride de référence 4	Crème de référence 5	Crème de référence 6
paramètres			
Y'	1 30.2	216.57	187.48
K'	120.42	102.653	124.31
H'	0.46255	0.5723	0.54967
R'	1.99777	1.97995	1.9971

Le modèle de référence pour les crèmes élaborées est la référence 1 car son coefficient de corrélation est plus proche de 1.

Pour les crèmes antirides à base de phycocyanine :

Tableau 30 : Résultats pour les crèmes antirides à base de phycocyanine algérienne et tunisienne

Paramètres	Y	K	n	R
Crème anti rides				
Référence 1	120,99	100,42	0,3622	0,9961
A 10%	10,65	2,3176	0,58295	0,93455
A 5 %	42,408	6,8962	0,63908	0,93167
A 2%	68,631	1,5323	0,94818	0,93437
A 1 %	128,97	39,251	0,47793	0,99886
A 0,5 %	139,21	47,963	0,4734	0,99894

Nous avons constaté que notre courbe est non linéaire et donc on peut déduire que le Comportement est non newtonien. Ceci étant prévisible car il s'agit d'un système dispersé constitué de deux phases, aqueuse (phase contenue) et huileuse (phase dispersée).

De la courbe donnant la variation de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de déformation, nous avons remarqué que la viscosité au faible cisaillement est très élevée, ce qui laisse supposer un comportement éventuel plastique, se caractérisant par la présence d'une contrainte seuil, caractéristique du début de l'écoulement.

Avec l'accroissement de cisaillement, la viscosité initialement diminue ce qui correspond au comportement d'un fluide rhéo-fluidifiant. Dans ce domaine, la structure de la crème subit une déstructuration qui est responsable de la faiblesse de la résistance à l'écoulement des éléments dispersées. Aux forts cisaillements, la déstructuration se stabilise et la viscosité apparente de la crème tend vers une valeur constante.

D'après notre analyse, nous avons conclu que les résultats des tests rhéologiques montrent que les crèmes a 1 et 0,5% ont le même comportement rhéo-fluidifiant que la crème de référence 1 pour la souche algérienne et la crème de référence 4 pour la souche tunisienne ; donc elles sont plus favorables à l'utilisation dermique et à la commercialisation cosmétique mais à nos yeux, la meilleur est celle de 1 % car elle est plus concentrée en phycocyanine, alors plus riche en ses composés visés (antioxydant).

10. ETUDE MICROSCOPIQUE DE LA CREME ANTIRIDE à 1% DE PHYCOCYANINE :

La rhéologie a démontré que la crème antiride à 1% de phycocyanine pour les deux souches est plus stable et sans déphasage mais cela peut être confirmé que par une étude microscopique.

A cet effet, nous avons procédé à l'étude microscopique de notre crème qui est une émulsion inverse. Cette dernière nous montre que les colloïdes lipophobes (phase aqueuse et phycocyanine) sont stable, et ce per l'introduction d'agents émulsifiants dans la phase grasse. Ainsi nous avons observé les molécules de la phase discontinue piégée dans la phase continue ou la phycocyanine est dispersée.

11. RESULTATS ET DISCUSSION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

Après élaboration et choix de la crème antiride à base de phycocyanine, nous avons voulu prouver le véritable pouvoir antioxydant des composants de la phycocyanine.

La phycocyanine (pour les deux souches) semble avoir une activité antioxydante. En effet, la courbe de cette activité biologique augmente graduellement, partant de la concentration de 0,1 mg/ml à la concentration 0,4 mg /ml. Cette phase exponentielle se termine en se stabilisant à cette concentration. il s'agit de l'apogée de l'activité antioxydante.

En se référant aux courbes des BHT et VIT C, il en ressort une très forte activité antioxydante de 10 fois plus supérieur.

Cette activité n'est pas liée seulement aux polyphénols mais plutôt à la présence dans la phycocyanine d'une multitude variée d'antioxydants avec de la vitamine E.

12. EVALUATION SENSORIELLE :

Nous avons évalué la qualité de notre crème anti rides à différents pourcentages (10, 5, 2, 1 et 0,5 %) . Les résultats sont représentés dans le tableau 31

Tableau 31 : Evaluation sensorielle.

		Crème antiride 10% de phycocyanine					Crème antiride 5% e					Crème antiride 2%					Crème antiride 1%					Crème antiride 0,5%						
%Et	Sexe	âge	C	O	T	P	A	C	O	T	P	A	C	O	T	P	A	C	O	T	P	A	C	O	T	P	A	
F	E	1	59	3	4	3	2	1	2	3	3	3	2	4	3	3	4	3	4	4	3	4	4	5	5	3	5	5
		2	53	3	3	4	2	1	3	3	3	3	1	4	4	3	4	3	4	4	3	4	4	4	4	5	3	5
M	M	3	33	4	4	3	2	3	1	4	3	4	2	2	4	3	5	4	4	5	3	5	5	3	4	3	4	5
		4	70	3	3	3	2	4	5	5	3	2	4	4	5	3	5	4	4	4	3	5	4	5	4	3	4	4
M	E	5	56	3	3	1	3	2	4	2	4	2	3	3	3	3	4	4	4	4	3	4	4	5	3	3	4	4
		6	63	3	4	3	2	3	3	2	3	4	2	5	4	3	4	4	4	4	3	4	5	4	4	3	4	5
S	S	7	30	4	3	3	1	3	3	3	3	2	3	4	3	3	4	3	4	5	3	4	4	4	4	3	4	4
		8	48	3	3	4	2	3	2	4	3	3	4	3	3	4	3	4	3	4	3	5	4	4	4	3	5	4
H	O	9	37	3	3	3	2	4	4	3	3	3	3	2	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4
		10	42	4	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3	4	3	4	3	4	4	3	4	4	4	4	5	3	5
M	E	11	65	2	4	2	3	2	3	2	3	2	1	3	2	3	2	2	4	4	3	4	3	4	2	3	2	3
		12	66	3	4	4	2	4	3	4	3	2	4	3	3	3	4	4	5	4	3	4	4	5	4	3	3	4
M	S	13	56	2	3	3	2	4	3	4	4	2	2	3	3	3	4	4	4	3	3	5	4	4	3	3	4	4
		14	68	4	3	3	2	3	2	4	3	3	3	3	3	3	4	2	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4
M	S	15	34	3	3	3	2	3	3	4	3	3	3	4	4	3	4	3	5	4	3	5	5	4	4	3	4	4
		16	38	3	3	3	2	3	4	3	3	3	2	4	3	3	4	3	4	4	3	5	4	4	4	3	4	4
S	S	17	49	4	3	4	2	3	4	3	3	3	2	5	3	3	4	4	4	4	3	5	4	4	4	3	4	4
		18	50	3	3	3	2	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4
S	S	19	31	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	4	4	3	4	4	5	4	3	4	4	4	4	3	4	4
		20	44	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	3	4	4	4	4	3	5	4	4	4	3	4	4

O : odeur C : couleur T : texture P : pouvoir d'application

Appréciation globale :

Après avoir bien expliqué à notre jury l'objectif de notre travail, nous leurs avons posé plein de questions et nous avons eu droit à plusieurs réponses différentes en fonction des goûts et des préférences de la personne elle-même. Le sexe, l'âge ; l'état actuel de la personne (heureuse, énervée, stressée...) et bien d'autres facteurs ont joué sur leurs ressenties par rapport à notre produit.

La couleur :

La couleur est le premier paramètre observé par le jury, il lui accorde une grande importance et ceci pour apprécier la qualité du produit.

Les crèmes anti rides de 5 et 2% de phycocyanine pour les deux souches (algérienne et tunisienne) ont une couleur verte très prononcée, n'attirant par le jury et leur attribuer

une connotation d'horrible ou de repoussante. la crème anti ride de 10% étant très verte, étonnamment elle a été plus agréable et plus acceptée par les jury car ce dernier avait une impression de déjà vu en la ressemblant à un autre produit de même couleur que notre crème à 10% qui est l'argile, par contre 75 à 80% des volontaires ont jugé que les crèmes de 1 et 0,5% sont agréables et 15 à 20% qu'elles sont excellentes.

L'odeur :

L'odeur est le deuxième paramètre exploité par le jury qui a été un immense champ de différence olfactive et d'appréciation des différentes crèmes proposées. Les crèmes de 1 et 0,5% ont été jugées comme agréables pour 85% et 70% jusqu'à très agréable à pour 10% à 15% des volontaires. Malgré le pourcentage minime de 5% des volontaires ayant jugé que la crème à 0,5% comme étant désagréable, cette valeur a influencé négativement les résultats de l'évaluation olfactive de cette crème.

La texture :

La majorité des volontaires ont jugé que les crèmes auraient une texture crémeuse à l'exception de 10 à 20% de la population qui ont jugé que les crèmes de 10 et 5% ont une texture plutôt visqueuse et non crémeuse.

Le pouvoir d'application :

85% des volontaires (femmes et hommes) ont pu déduire que la crème à 10% à un pouvoir d'application lent. C'est-à-dire que lors d'une application unique sur une zone de peau sèche, il faut beaucoup d'effort et de persistance pour faire pénétrer la crème dans le derme. En plus de cet inconvénient, la peau reste bleu verte ce qui a conduit une dépréciation par le jury.

La crème antiride à 5% de phycocyanine à un pouvoir d'application jugé lent ou moyen par contre les crèmes de 2,1 et 0,5% sont jugées par 60 à 85% des volontaires rapides à l'application sans obtention de couleur.

Pour plus de précision la crème de 1% est notée comme la crème la plus rapide à l'application par rapport aux quatre autres crèmes par une moyenne de 40% des volontaires.

L'appréciation globale des produits

Elle s'est faite en demandant à notre jury de répondre à la question suivante :

Si vous trouvez cette crème dans un supermarché ou dans une boutique de cosmétique est-ce que vous l'achèteriez ?

Puis avons expliqué que c'est l'impression donnée qui englobera tous les paramètres proposés réunis.

Notre jury a été très directe pour les crèmes de 1 et 0,5% qui ont été jugées comme bonnes et même jusqu'à excellentes et les membres ont répondu : oui nous achèterons votre produit, par contre pour les autres crèmes de 10,5 et 2%, le jury a déclaré non, nous n'achèterons pas votre produit car ces crèmes ont une appréciation moyenne ou acceptable.

Ces résultats sont dus à plusieurs paramètres :

Le pouvoir d'application qui est jugé lent, la couleur verdâtre sur la peau laissée par la crème et l'odeur désagréable.

En conclusion :

L'évaluation sensorielle a permis de distinguer deux crèmes pour chaque souche: la crème antiride à 1% de phycocyanine pour les deux souches algérienne et tunisienne et la crème antiride à 0,5% de phycocyanine pour les deux souches aussi. Elles sont jugées comme bonnes à excellentes répondant à tous les paramètres proposés. Parmi ces deux produits sélectionnés, la crème antiride à 1% est due comme étant la crème aux paramètres optimisés car elle est plus riche en phycocyanine donc elle aurait deux fois plus d'action contre les rides que celle à 0,5%. Ce résultat de l'évaluation sensorielle confirme l'étude rhéologique réalisée.

Conclusion générale

Notre étude avait pour objectif d'une part, l'obtention de phycocyanine extraite à partir de la spiruline provenant de deux régions géographiquement différentes, l'une algérienne (région de Tamanrasset) et l'autre tunisienne (région de Djerba).

Nous avons après caractérisation des deux souches de spiruline, procédé à l'extraction de leurs phycocyanine par plusieurs méthodes tout en préservant leurs qualités intrinsèques. Nous avons procédé à une comparaison des résultats obtenus pour arriver à désigner la méthode optimale d'extraction en termes de rendement.

Puis, nous nous sommes fixés comme objectif de formuler une crème anti rides à base de phycocyanine qui pourrait estamper les rides apparentes chez l'homme.

L'évaluation de la valeur alimentaire de *Spirulina platensis* que ce soit pour la souche algérienne ou tunisienne a permis d'identifier les différents constituants microbiologiques et physico- chimiques présents ainsi que sa composition .

En effet, les poudres de spiruline des deux souches algérienne et tunisienne considérées présentent une teneur initiale en eau de 9% en moyenne qui leur confèrent une certaine stabilité microbiologique. D'autres constituants ont été mis en évidence tel que les glucides en moyenne de 18,5%, les lipides 8,78%, les minéraux 8,18 % et les protéines 70,66 % qui en font des aliments fonctionnels intéressants.

Des analyses chimiques supplémentaires ont été réalisées sur les souches *S. platensis* où nous avons identifié le profil des acides gras dans sa fraction lipidique par la chromatographie en phase gazeuse. Nous avons également identifié les éléments minéraux (Fe, Zn, Ca, K, Na) par spectrométrie d'absorption atomique.

Les résultats obtenus par CPG ont montré que nos souches renferment une forte concentration en acides gras essentiels qui inclue des oméga-3 et des oméga-6 qualifiés d'essentiels pour l'organisme humain.

La micro algue *Spirulina platensis* étudiées présentent des valeurs relativement élevées en éléments essentiels pour l'organisme : une moyenne de 29 mg/g pour le sodium et 23 mg/g de matière sèche pour le potassium.

Après la phase de caractérisation des souches de spiruline, nos travaux nous ont parlé sur l'extraction de la phycocyanine et nous ont amené à conclure que l'extraction aqueuse à double phase a donné des valeurs supérieures comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant).

En effet, La spiruline algérienne a donné 2,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de 0,62 mg/ml et une pureté de 1,37. La caractérisation de la phycocyanine de souche algérienne a permis de déterminer en termes de rendement sa valeur nutritionnelle en éléments minéraux, en protéines, en flavonoïdes et surtout son activité antioxydante tant recherchée dans le domaine médical.

Il est à noter que la souche algérienne est en pleine culture et production au Sahara, espace de soleil et d'eau de la chaleur et des sels minéraux. Sa production est simple à mettre en œuvre .

Du fait des diverses vertus antioxydantes que possède la phycocyanine, la formulation d'une crème antiride a été réalisé pour évaluer l'efficacité de cette dernière et son effet correcteur sur la peau.

Au terme de notre étude et après une série de tests de stabilité et autres, nous avons conclu que la crème antiride enrichie à 1% de phycocyanine est le produit fini pouvant être commercialisé car renfermant les caractéristiques recherchées. Cette conclusion est arrivée après une série de résultats partiels.

En effet, dans une première étape, il a été indispensable de contrôler la phycocyanine et les autres matières entrant dans la formulation de notre produit sur le plan organoleptique, physico-chimique et microbiologique et de d'assurer du respect des bonnes pratiques de fabrication au niveau du process.

Nous avons également confirmé la stabilité et la bonne structure de notre crème élaborée en procédant à un test de stabilité à différentes températures. Ce dernier a révélé que notre crème peut se conserver à des températures basses et ambiantes, par contre ces caractéristiques se modifient à des températures élevées.

La réalisation d'un test rhéologique nous a permis de mieux connaître le comportement de la crème du point de vu temps de régénération, étalement et viscosité.

Aussi, nous avons pu confirmer l'action anti oxydante de la phycocyanine par le test du DPPH qui a donné d'excellents résultats par rapport aux antioxydants de référence.

Enfin, sur le plan sensoriel la crème a 1% de phycocyanine algérienne et même tunisienne est jugée come bonne à excellentes répondant à tous les paramètres proposées.

PERSPECTIVES

Depuis quelques années, les études cliniques réalisées sur les animaux ou l'Homme se sont multipliées. Dirigées par des chercheurs de différents pays, elles suggèrent que la spiruline ou ses extraits exerceraient diverses actions thérapeutiques préventives voire curatives.

Dans le but d'explorer à fond tous les trésors qu'elle recèle et de lui attribuer enfin des bénéfices réels, il nous paraît indispensable d'envisager les perspectives suivantes à court et à long terme :

- ✓ Etude de l'effet hypocholestérolémiant de *S. platensis* en association avec d'autres espèces .
- ✓ Caractérisation génétique de la souche algale autochtone .
- ✓ Caractérisation de la fraction protéique par une électrophorèse en SDS-PAGE.
- ✓ Identification génétique des souches étudiées de phycocyanine.
- ✓ Investir dans la recherche sur les techniques de culture, de façon à trouver des solutions optimales à moindre coût pour chaque étape de la production (et jusqu'à la distribution), toujours dans un souci du respect de l'environnement .
- ✓ Vulgariser sa production artisanale .
- ✓ Produire à plus grande échelle afin de réduire les coûts de production .
- ✓ Poursuivre les recherches cliniques avec la rigueur exigée par la communauté scientifique et médicale, afin de préciser et valider l'existence de propriétés thérapeutiques exploitables en médecine et en diététique.

Des fonds seront nécessaires si l'on veut établir avec certitude les différentes indications et préciser les modalités concernant l'emploi de la spiruline ou de ses extraits chez l'Homme, en fonction de son âge et de son état physiopathologique .

- Promouvoir ensuite son utilisation dans les programmes nationaux de lutte contre la malnutrition
- Développer des techniques moins coûteuses d'extraction de ses composés actifs spécifiques (phycocyanine, calcium-spirulane) .
- Poursuivre les recherches concernant son utilité dans la réduction des gaz à effet de serre.

APPENDICE A

Composition du milieu solide pour isoler la spiruline

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

Le pH est ajusté à 10.

Composition du milieu de Hiri (pour 1 L d'eau distillée)

Bicarbonate de soude (NaHCO_3)	16
Chlorure de sodium (NaCl)	1
Phosphate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	0,1
Sulfate de fer (FeSO_4)	0,01
Sulfate de magnésium (MgSO_4)	0,1
Sulfate de potassium (K_2SO_4)	0,5
Chlorure de calcium (CaCl_2)	0,1
Urée azotée $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	0,1

Composition du milieu N1

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	2 g pH ajusté à 10

Composition du milieu N2

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	8 g pH ajusté à 10

Composition du milieu N3

Eau distillée 100 mL ;

Bicarbonate de sodium : 15 g

pH ajusté à 10

Les tests d'identification

Etude macroscopique

Ce test consiste à une observation directe à l'œil nu des colonies obtenues sur milieux MRSc. Il permet de renseigner sur la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'opacité, le contour et la couleur des colonies étudiées.

Les colonies blanchâtres, rondes ou lenticulaires à contour régulier sont retenues.

Etude microscopique

L'examen microscopique apparait comme la première étape de l'étude d'une bactérie. (Guiraud, 1998), il comprend :

Etat frais

Cet examen permet d'apprécier la forme et la mobilité des germes étudiés. Il faut éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec les mouvements de convection susceptibles de l'entraîner.

Il consiste à examiner les microorganismes vivants entre lame et lamelle. Une goutte de suspension bactérienne est déposée au centre de la lame, puis une lamelle déposée au-dessus en évitant la création des bulles d'air.

L'observation se fait par microscope optique aux grossissements (Gr : 100 .1, 25 . 10 . 0,25)

Les analyses microbiologiques sur la spiruline

La préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique (N° 01.98.51)

Préparation de la suspension-mère de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.

Préparation, si nécessaire de dilutions décimales qui permettent, après ensemencement et incubation des milieux de culture :

Dans le cas des boîtes, il faut effectuer un dénombrement valable des colonies (existence de boîtes comportant entre 30 et 300 colonies et pour certains groupes, tels les coliformes, entre 15 et 150 colonies).

Dans le cas des tubes, il faut disposer d'un nombre suffisant de tubes montrant un développement bactérien et des tubes sans culture, de manière à ce que le calcul du nombre le plus probable à l'aide des tables, puisse être réalisé.

Les prises d'essai sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de deux facteurs essentiels à savoir :

- Le nombre de pièces soumises à l'analyse
- Les opérations analytiques à conduire

Suspension mère et dilutions décimales

Introduire aseptiquement 10 grammes de produit à analyser dans un sachet stérile de type « Stomacher » contenant au préalable 90 mL de diluant soit le TSE (tryptone sel eau), Homogénéiser. Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/10 ou 10^{-1} .

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1mL de la DM dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant. Cette dilution est alors au 1/100 ou 10^{-2} .

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la dilution 10^{-2} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant ; cette dilution est alors au 1/1000 ou 10^{-3} .

Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (NF V 08-051, 2003)

La Flore Mésophile Aérobie Totale est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit. Ce dénombrement se fait en milieu solide (PCA) après incubation en aérobiose à 30 °C.

Principe

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture (PCA), coulé dans une boîte de pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres boîtes avec des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère. Incubation des boîtes s'effectue à 30°C, en aérobiose pendant 72h.

A partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de pétri retenues, nous calculons le nombre de microorganismes par mL ou par gramme de l'échantillon analysé.

Lecture et dénombrement

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse. Il s'agit de compter les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution

- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux- méthode par comptage des colonies (ISO 4832, 2006)

Principe

Préparation de trois boîtes de Pétri, en utilisant un milieu VRBL et une quantité spécifiée de suspension mère.

Incubation des boîtes à 30 °C ou 37 °C pendant 24 h et Comptage des colonies caractéristiques.

Le calcul du nombre de coliformes par millilitre est réalisé à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boîte de Pétri.

Dénombrement

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes de Pétri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies.

Procéder au comptage des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0,5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

Le dénombrement des bactéries sulfite-réductrices (XPV 08-601, 2005)

Principe

Ensemencement en profondeur du milieu gélosé tryptose sulfite à la cyclosérine exempt de jaune d'œuf, coulé dans une boîte de Pétri ou dans un tube, avec une quantité déterminée de la suspension-mère.

Recouvrement avec une couche du même milieu lorsque l'essai est effectué en boîte de Pétri.

L'incubation des boîtes se fait à 46 °C en anaérobiose pendant 20 h ± 2 h suivie à dénombrement des colonies caractéristiques (entourées d'un halo noir).

Comptage des colonies

Choisir la ou les tubes contenant moins de 30 colonies caractéristiques et moins de 100 colonies au total et compter les colonies caractéristiques.

Recherche des *Staphylococcus aureus* (NF V 08-052)

Ensemencement en surface d'un milieu de culture gélose sélectif Chapman, coulé dans une boîte de Pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

L'incubation des boîtes est à 37 °C, en aérobiose pendant 24h à 48h.

Le calcul du nombre de staphylocoques par mL ou par gramme d'échantillon se fait à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilutions donnant un résultat significatif.

Lecture

Seront considérés comme positives, les boîtes contenant des colonies caractéristiques à savoir

des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide.

Dénombrement des levures et moisissures ; technique par comptage des colonies à 25°C (C.A.C.Q.E. N° 01-97-61)

Principe

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif déterminé sabouraud, coulé dans trois boîtes de Pétri, avec une quantité définie de l'échantillon pour essai, si le produit est liquide, ou de la suspension mère pour les autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales des autres boîtes, obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation de ces boîtes en aérobiose à 25° C pendant 3, 4 ou 5 jours.

Calcul du nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif.

Lecture

Compter les colonies sur chaque boîte après 3,4 et 5 jours d'incubation. Après 5 jours, retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, retenir les comptages obtenus après 4, ou même 3 jours d'incubation.

Expression des résultats

Le nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre est égal à :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

C : est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées; **n₁** : est le nombre de boîtes comptées à la première dilution; **n₂** : est le nombre de boîtes comptées à la seconde dilution; **d** : est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus.

Le résultat doit être exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x, x étant la puissance appropriée de 10.

Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (ISO 6579, 2002)

Principe

La recherche de *Salmonella* nécessite trois phases successives.

Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée à température ambiante, puis incubation à 37°C ± 1°C pendant 18 h ± 2 h.

Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) et d'un bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture obtenue ci-dessus.

Incubation du bouillon RVS à $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ et du bouillon MKTTn à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Isolement et identification

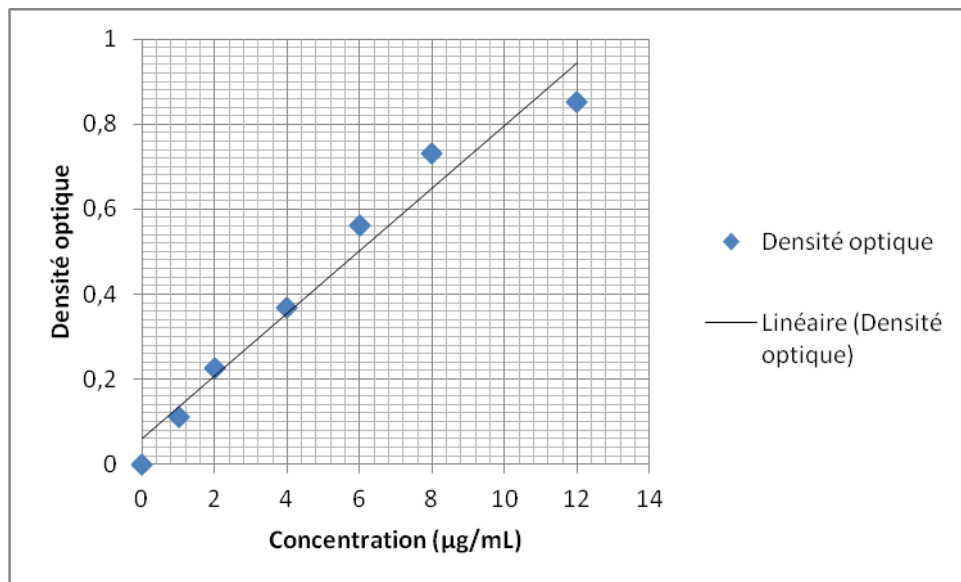
A partir des cultures obtenues, ensemencement de deux milieux sélectifs solides :

- Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD).
- Un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélose XLD permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

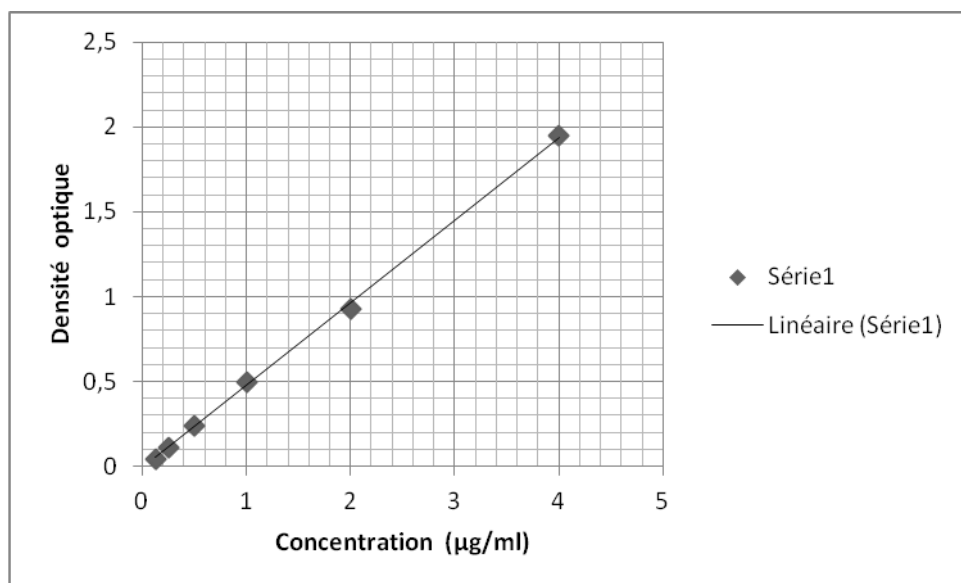
Incubation du milieu gélose XLD à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ puis examen après $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

APPENDICE B : Courbe d'étalonnage des sucres pour dosage de glucose (anthron)



Courbe d'étalonnage acide gallique



APPENDICE C : Titrage (acidité Dornic)

Le matériel nécessaire est le suivant : un statif avec noix et pince, une fiole conique de 100 mL, une solution de NaOH N/9, une burette de 25 mL, une solution de phénolphtaléine à 1% dans éthanol. Remplir la burette de la solution de NaOH N/9. Régler le niveau au du liquide à zéro. Prélever 1 mL de la culture testé et transférer dans un bécher. Ajoute quelque goutte de phénolphtaléine et titrer jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante. Noter le volume de solution titrant utilisé en dixièmes de millilitres. Nombre de dixièmes de millilitre de NaOH=1°D.

Les résultats sont exprimés selon la relation : Acidité= $V_{\text{NaOH}} \times 10$

V_{NaOH} : Volume de la souche coulé pour neutraliser l'acidité (Bourgeois et al ., 1996).

Tableau IX : coefficient K, de chaque couple vitesse/mobile (calcule de la viscosité BROOKFEILD)

Vitesse tour/minute	Coefficient K de mobile n°						
	1	2	3	4	5	6	7
100	1	4	10	20	40	100	400
50	2	8	20	40	80	200	800
20	5	20	50	100	200	500	2000
10	10	40	100	200	400	1000	4000
5	20	80	200	400	800	2000	8000
4	25	100	250	500	1000	2500	10000
2,5	40	160	400	800	1600	4000	16000
2	50	200	500	1000	2000	5000	20000
1	100	400	1000	2000	4000	10000	40000
0,5	200	800	2000	4000	8000	20000	80000

Tableau des analyses rhéologiques : crème antiride de référence 1 :

Nombre de points	Contrainte de cisaillement	Viscosité apparente	Vitesse de déformation
	[Pa]	[Pa .s]	[1/s]
1	208	306	0,682
2	240	151	1,59
3	265	98	2,7
4	293	66,1	4,43
5	327	45,1	7,24
6	367	31	11,8
7	415	21,4	19,4
8	472	14,9	31,7
9	541	10,4	51,9
10	623	7,32	85,2
11	721	5,18	139
12	839	3,68	228
13	979	2,62	373
14	1150	1,88	611
15	1310	1,43	914

Tableau de : crème antiride de référence 2

Nombre de points	Contrainte de cisaillement	Viscosité apparente	Vitesse de déformation
	[Pa]	[Pa .s]	[1/s]
1	198	279	0,709
2	227	140	1,63
3	250	92,5	2,71
4	277	62,7	4,42
5	309	42,9	7,21
6	348	29,4	11,8
7	395	20,4	19,4
8	451	14,2	31,7
9	518	9,99	51,9
10	600	7,04	85,2
11	697	5	139
12	813	3,57	228
13	954	2,55	373
14	1120	1,84	611
15	1310	1,35	971

Tableau de : crème antiride de référence 3

Nombre de points	Contrainte de cisaillement	Viscosité apparente	Vitesse de déformation
	[Pa]		[Pa .s]
1	287	249	1,15
2	281	285	0,986
3	282	278	1,01
4	302	182	1,66
5	325	120	2,71
6	353	79,6	4,43
7	385	53,3	7,23
8	425	35,8	11,9
9	471	24,3	19,4
10	526	16,6	31,7
11	592	11,4	52
12	669	7,87	85,1
13	762	5,46	139
14	871	3,82	228
15	1 E+3	2,68	374

Tableau: crème antiride (Phycocyanine à10%)

Nombre de points	Contrainte de cisaillement	Viscosité apparente	Vitesse de déformation
	[Pa]		[Pa .s]
1	12,9	13,4	0,967
2	13,8	8,36	1,64
3	14,8	5,5	2,69
4	16,1	3,67	4,4
5	18	2,49	7,21
6	20,4	1,73	11,8
7	23,7	1,23	19,3
8	28	0,884	31,7
9	33,8	0,652	51,9
10	41,5	0,489	84,9
11	51,8	0,372	139
12	65,5	0,288	228
13	83,8	0,225	373
14	108	0,177	611
15	141	0,141	1 E+ 3

Tableau de : crème antiride à base de phycocyanine 5% :

Nombre de points	Contrainte de cisaillement	Viscosité apparente	Vitesse de déformation
	[Pa]		[1/s]
1	47,3	82,1	0,575
2	50	43,4	1,15
3	52,7	28,1	1,88
4	61,7	12,3	5
5	62,7	11,6	5,42
6	80,2	5,61	14,3
7	85,3	4,89	17,5
8	78,8	5,84	13,5
9	82,3	5,29	15,6
10	89,8	4,4	20,4

Tableau de : crème antiride à bas de phycocyanine à 2%

Nombre de points	Contrainte de cisaillement	Shear Stress	Viscosité apparente	Vitesse de déformation
	[Pa]	[Pa .s]	[1/s]	[1/s]
1	68	77,9	0,873	0,5
2	69,1	42,4	1,63	2,15
3	70,5	26,2	2,69	3,2
4	72,9	16,5	4,41	3,2
5	82,6	10,6	7,21	3,42
6	92	6,99	11,8	14,3
7	107	4,76	19,3	15,5
8	131	3,39	31,6	14,5
9	131	2,53	51,8	14,6
10	170	2	84,9	18,4
11	232	1,67	139	22,1

Tableau 16 : évaluation organoleptique des matières premières

Matière première	Test	résultat	Exigences internes	Interprétation
Polyglycérol stéarate	Aspect	Pâteux	Pâteux	Conforme
	Couleur	Incolore à jaune pale	Incolore à jaune pale	
Hydroxy Stéarate	Aspect	Pâteux	Pâteux	Conforme
	Couleur	Incolore à jaune pale	Incolore à jaune pale	
Cétiol CC	Aspect	Liquide, fluide	Liquide, fluide	Conforme
	Couleur	incolore	Incolore	
Dimethicone	Aspect	Liquide limpide	Liquide limpide	Conforme
	Couleur	Incolore	Incolore	
	Couleur	Clair légèrement jaune	Clair légèrement jaune	
Silica	Aspect	Poudre très fine	Poudre très fine	Conforme
	Couleur	blanche	Blanche	
Cire d'abeille	Aspect	Cirre	Cirre	Conforme
	Couleur	Blanche	Blanche	
	Odeur	Parfum caramel	Parfum caramel	
Pigment	Aspect	Cristaux	Cristaux	Conforme
	Couleur	Blancs brillants	Blancs brillants	
	Odeur	inodore	Inodore	
Glycérine	Aspect	Fluide	Fluide	Conforme
	Couleur	Incolore	Incolore	
EDTA	Aspect	Poudre fine	Poudre fine	Conforme
	Couleur	blanche	Blanche	
Conservateur (2)	Aspect	Liquide limpide	Liquide limpide	Conforme
	Couleur	Incolore à légèrement jaune	Incolore à légèrement jaune	Conforme
Collagène	Aspect	Liquide Légèrement visqueux	Liquide Légèrement visqueux	Conforme

Tableau 25 : microbiologie des matières premières

Matière	Flore aérobie mésophile totale		Levures et moisissures	
	Résultat	Norme UFC/ml	Résultat	Norme UFC/ml
Poly-glycérol stéarate	Abs	<100		
Hydroxy stéarate	Abs	<100	Abs	<10
Cétéol CC	Abs	<100	Abs	<10
Diméthicone	Abs	<100	Abs	<10
Conservateur (1)	Abs	<100	Abs	<10
Silica	Abs	<100	Abs	<10
Pigment	Abs	<100	Abs	<10
Glycérine	Abs	<100	Abs	<10
EDTA	Abs	<100	Abs	<10
Conservateur (2)	Abs	<100	Abs	<10
Collagène	Abs	<100	Abs	<10
Parfum	Abs	<100	Abs	<10
Oxynex 2004	Abs	<100	Abs	<10
Phycocyanine algérienne	Abs	<100	1	<10
Phycocyanine tunisienne	Abs	<100	1	<10
Transdermite (gomme arabique +acide acétique)	Abs	<100	Abs	<10
Phycocyanine + transdermite algérienne	Abs	<100	1	<10
Phycocyanine + transdermite tunisienne	Abs	<100	1	<10

Abs : Absence

LISTE DES ABREVIATIONS

- **AAF** : aérobies anaérobies facultatives
- **ADH** : Arginine dihydrolase
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **AGE**: advanced glycation end-products
- **AGE-RAGE** : le récepteur de l'AGE.
- **AGPI** : acides gras polyinsaturés
- **AOCS**: American Oil Chemist's Society
- **ARN** : acide ribonucléique
- **ATP** : adénosine-5'-triphosphate
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **Bf.** : Bifidobacterium
- **BF3** : boron trifluoride
- **BHT** : butyle hydroxytoluène
- **Ca** : calcium
- **CaCO₃** : carbonate de calcium
- **Ca-Sp** : spirulane-calcique
- **CAT** : la catalase
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CO** : oxyde de carbone
- **CO₂** : Dioxyde de carbone
- **COX-2** : cyclooxygénase-2

- **CPG** : chromatographie en phase gazeuse
- **DID** : diabète insulino-dépendant
- **DMSO** : dimethylsulfoxyde
- **DNID** : Diabète non insulino-dépendant
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **GAMT** : germes aérobies mésophiles totaux
- **Gélose XLD**: Gélose xylose lysine désoxycholate
- **GLA** : acide gammalinoléique
- **GPX** : la glutathion
- **H₂O** : eau
- **H₂O₂** : le peroxyde d'hydrogène
- **H₂S** : sulfure d'hydrogène
- **HCl** : chlorure d'hydrogène
- **HDL** : lipoprotéines de haute densité
- **HNE** : 4-Hydroxynonanal
- **HOCl** : acide hypochloreux
- **HPLC** : chromatographie en phase liquide à haute performance
- **Kcal** : kilocalories
- **KOH** : Hydroxyde de potassium
- **LDL** : lipoprotéines de petite densité
- **Milieu VRBL** : Milieu lactosé biliée au cristal violet et au rouge neutre

- **MKTTn** : Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine
- **MRSc**: man rogosa, sharpe cystéiné
- **Na** : sodium
- **Na₂SO₄** : sulfate de sodium
- **NaCl** : Le chlorure de sodium
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **OH*** : le radical hydroxyle
- **OMS** : Organisation Mondiale de santé
- **ONOO⁻** : peroxydinitrite
- **ONPG** : ortho-nitro-phényl-galacto-pyranosie
- **P. aeruginosa** : Pseudomonas aeruginosa ATCC27853
- **PCA** : Plate Count Agar
- **pH** : potentiel hydrogène
- **R** : radical
- **RM** : Rouge de méthyle
- **ROOH** :hydroperoxydes organiques
- **RVS** : Rappaport-Vassiliadis avec soja
- **S. aureus**: Staphylococcus aureus ATCC25923
- **S. platensis** : Spirulina platensis

- **SOD** : la superoxyde dismutase
- **SQDG** : sulfoquinovosyldiacylglycerol
- **TC** : cholestérol total
- **TDA** : Urée-tryptophane
- **TG** : triglycérides
- **TSE** : tryptone sel eau
- **UFC** : unité formant colonie
- **VCAM-1** : vascular cell adhesion molecule-1
- **VIH** : virus de l'immunodéficience humaine
- **VP** : Voges-Proskauer
- **VPI** : l' α -naphtol

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Albertson P.A., Tjerneld, F., 1994. Methods in enzymology. Volume 228. Aqueous two phase systems. Edited by: Harry Walter, Gote Johansson. Academic Press, INC. London.
2. Anusuya D.M. et Venkataraman L.V. *Supplementary value of the proteins of the bluegreen algae Spirulina platensis to rice and wheat proteins*. 1983; 28: p. 1029-1035.
3. Avino P., Carconi P.L., Lepore L., Moauro A. *Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2000; 244 (1): p. 247-252.
4. Al-Homaidan A.A. *Heavy metal levels in Saudi Arabian Spirulina*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2006; 9 (14): p. 2693-2695.
5. Antelo, F.S., Anschau, A., Costa, J.A.V., Kalil, S.J., 2010. Extraction and Purification of C-phyco cyanin from Spirulina platensis in Conventional and Integrated Aqueous Two-Phase Systems. Journal of the Brazilian Chemical Society, 21(5). 921-926.
6. AFAA, Association française pour l'algologie appliquée. *Actes du premier symposium sur la spiruline Spirulina Platensis (Gom)*. Geitler de l'AFAA. 1982.
7. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. *Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau*. www.afsset.fr/upload/bibliotheque/085391856141331010617707867709/cyanobacteries.pdf,
8. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. *The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. In: Boone D.R. & Castenholz R.W. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer-Verlag; 2001. 1.
9. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL *GenBank*. janvier 2000; 28 (1): p. 15-18. Australian government, Department of Health and Ageing Therapeutic. *Compositional guideline, Arthrospiraplatensis*.
10. Babadzhyanov A.S., Abdusamatova N., Yusupova F.M., Faizullaeva N., Mezhlumyan L.G. and Malikova M.Kh. *Chemical composition of Spirulina platensis cultivated in Uzbekistan*. Chemistry of Natural Compounds. 2004; 40 (3): p. 276-279.
11. Benahmed-Djilali, A., 2012. Analyse des aptitudes technologiques de poudre de dattes (Phoenix-dactylifera. L) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes. Thèse de doctorat. Université Bougara-Boumerdes, Algérie.

12. Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F., 2004. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences* 75. 2353 – 2362.
13. Bennett, A., Bogorad, L., 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58, 419 – 435.
14. Bermejo-bescos P. et al., 2008. Neuroprotection by spirulina platensis protean extract and phycocyanin against iron- induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in vitro*, 22, 1496 - 1502.
15. Bergendi L., Benes L., Durackova Z., and Ferencik M.(1999). "Chemistry Physiology and Pathology of free Radicals". *Life Sci*, 65:1865-1874.
16. Boldyrev A.A. (2005). "Protection of proteins from oxidative stress: a new illusion or a novel strategy?". *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1057: 193-205.
17. Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248– 254.
18. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie /Food Science and Technology*, 28, 25-30.
19. Bujard, E., Baco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., Wuhrmann, J.J., Clément, G., 1970. Composition and nutritive value of blue green algae (*Spirulina*) and their possible use in food formulations. 3rd International Congress of Food Science and Technology.
20. Bulgariu, L., Bulgariu, D., 2008. Cd (II) extraction in PEG (1550)–(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase systems using halide extractants. *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (3) 341–350.
21. Bujard E., Braco U., Mauron J., Mottu F., Nabholz A., Wuhrmann J.J. et Clément G. *Composition and nutritive value of blue-green algae (spirulina) and their possible use in food formulations*. 3rd International Congress of Food Science & Technology. Washington, 1970.
22. Bhat V.B., Madyastha K.M. *C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2000; 275: p. 20-25.
23. Chen, T., Wong, Y.S., Zheng, W., 2006. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry* 67, 22. 2424-2430.

24. Clement, G., Rebeller, M., 1974. Etude de la culture des algues Spirulines dans l'eau de mer. Institut Français du Pétrole. Compte rendu de fin de contrat d'une recherche financée par la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (. Contrat n° 73.7.1096, p 8.
25. Chopra K., Bishnoi M. (2007). "Antioxydant Profile of Spirulina" : A Blue-Green Microalga in *Spirulina* Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina. Human Nutrition and Health*. 101-118.
26. Ciferri O. (1983). "Spirulina, the edible microorganism". *Microbiological Reviews*, 47:551-578.
27. Colla, L.M., Furlong, E.B., Costa, J.A.V., 2007. Antioxidant Properties of Spirulina (Arthrospira) platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.50, n. 1: pp.161-167.
28. Cruchot, H., 2008. La spiruline bilan et perspectives ; Thèse de doctorat en pharmacie N° 25.08.15. Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon. Université de Franche-Compte.
29. Campanella L., Crescentini G. and Avino P. *Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on Spirulina*. *Analisis*. 1999; 27:p. 533-540. Biorigin. *Documentation Biorigin pour "Azina" et "Ferrina", spiruline enrichie en zinc ou en fer*. <http://www.biospirulina.ch/>, .
30. Colla L.M., Bertolin T.E., Costa J.A. *Fatty acids profile of Spirulina platensis grown under different temperatures and nitrogen concentrations*. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 2004;59c (1-2): p. 55-59.
31. Castenholz R.W., Rippka R., Herdman M. and Wilmotte A. *Form-genus I. Arthrospira Stizenberger 1852*.
32. Charpy L., Langlade M.J. et Vicente N. *CSSD : " Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement"*. Colloque international. 3-6 mai 2004. p. 1-6.
33. Chorus I. and Bartram J. *Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/quality/toxycyanobacteria.pdf,
34. Cnerna-Afssa, coordinateur Martin A. *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Paris: Lavoisier; 2001.
35. Cuny A. *La fonctionnalité d'un aliment est-elle la somme des fonctionnalités des nutriments ingrédients qui le composent ?*. These Docteur en Pharmacie. Nancy: Faculte de Pharmacie; 2005.

36. Chemgapedia.
Phycobiline <http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/p/ph/phycobiline.glos.html>,
37. Conseil économique et social des Nations Unies. Demande d'octroi à une organisation intergouvernementale du statut consultatif auprès du Conseil économique et social. Lettre du 10 janvier 2002.
38. Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Sato, S., João Monteiro de Carvalho, J.C., 2011. Growth and content of spirulina platensis biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 362-373.
39. Dardoize V. (2010). "Le Petit Fute Pyrenees Orientales". 7eme Edition. Paris. P 217.
40. Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). "Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques". *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales*. 405p. Paris.
41. Desjardins M.L., Roy D., Goulet J. (1990). "Growth of *bifidobacteria* and their enzyme profile". *J. Dairy Sci.*; 73 : 299-307.
42. Doumandji, A., Boutekrabet, L., Saidi N.A., Doumandji, S., Hamerouch D., Haouari, S., 2012. Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal. *Nature & Technologie*, 06. 40-50.
43. Degbey H., Hamadou B., Oumarou H. *Evaluation de l'efficacité de la supplémentation en Spiruline du régime habituel des enfants atteints de la malnutrition sévère*. International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development. 2006. p. 104-108.
44. D. R. Boone & R.W. Castenholz, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, USA: Springer; 2001. 1. p. 542-543.
45. Delpeuch F., Joseph A. et Cavelier C. *Consommation alimentaire et apport nutritionnel des algues bleues (Oscillatoria platensis) chez quelques populations du Kanem (Tchad)*. *Annales de la nutrition et de l'Alimentation*. 1975; 29: p. 497-515.
46. Fox R.D. *Spiruline, Technique pratique et promesse*. Aix en provence: Edisud; 1999.
47. Falquet J. et Hurni J-P. *Spiruline : aspects nutritionnels*. www.antenna.ch/documents/AspNutr2006.pdf, page consultée le 20 janvier 2008.

48. Farrar W.V. *Techuitlatl, A Glimpse of Aztec Food Technology*. Nature. 23 juillet 1966; 211: p. 341-342.
49. FAO/WHO/UNU. *Protein Quality Evaluation. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation: 1985 FAO/WHO/UNU 2- to 5-yearold requirement pattern*. FAO; 1991. 51.
50. Flaquet, J., hurni, J.P., 2006. Spiruline aspects nutritionnels. Antenna technologies. <http://www.antenna.ch/documents/AspNutr2006.pdf>
51. GanapathiPatil, K.S. Raghavarao M.S. 2007. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34. 156–164.
52. Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000). "Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future". *Ann N Y Acad Sci.*, 899: 136-147.
53. Girardin-Andreani C. *Spiruline : système sanguin, système immunitaire et cancer*. *Phytotherapie*. 2005; 4: p. 158-161.
54. Geitler L. *Cyanophyceae*. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz Leipzig, Akademie-Verlagsges. New York: Johnson; 1932. Reprinted 1971. p.1-1196.
55. Gireesh T., Jayadeep A., Rajasekharan K.N., Menon V.P., Vairamany M., Tang G., Nair P.P., Sudhakaran P.R. *Production of deuterated beta-carotene by metabolic labelling of Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters*. 2001; 23 (6): p. 447-449.
56. Gupta, M., Dwivedi, U. N., Khandelwal, S., 2011. C-phycocyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin; *toxicology letters*, 204. 2-11.
57. Halliwell B., Gutteridge J. M. (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems". *Free Radic Biol Med.*, 18: 125-126.
58. Handelman G.J., van Kuijk F.J., Chatterjee A., Krinsky N.I. (1991). "Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene". *Free Radic Biol Med.*, 10: 427-437.
59. Hassan A., Deschamps N., Richard J. (1989). "Precision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Etude de référence avec *Lactococcus lactis*". *Lait*, 69 : 433-447.

60. Henrikson, R., 2009. Earth Food Spirulina. How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet. Ronore Enterprises, Inc., Hana, Maui, Hawaii. www.spirulina.com
61. Harriman G.R., Smith P.D., Horne M.K., Fox C.H., Koenig S., Lack E.E., Lane H.C. Bibliographie *Vitamin B12 malabsorption in patients with acquired immunodeficiency syndrome*. Archives of Internal Medicine. 1989; 149 (9): p. 2039-2041.
62. Hayashi T. and Hayashi K. *Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga Spirulina platensis*. Journal of Natural Products. 1996; 59:p. 83-87.
63. Huang, Z., Guo, B.J., Wong, R.N.S, Jiang, Y, 2007. Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. Food Chemistry, 100. 1137–1143.
64. Hudson B.J.F. et Karis I.G. *The Lipids of the Alga Spirulina*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1974; 25: p. 759-763.
65. Jacquet J. (1974). "Utilisations biologiques des Spirulines" .*Bull. Acad. Vét.* XLVII
66. Jourdan J. P. (2012). "Cultivez votre spiruline >>, manuel de culture artisanale". http://www.antenna.ch/medias/Manuel_Cultivez_votre_spiruline_REVISION_2013.pdf. Consulte le 20/10/2012.
67. Jarisoa, T., 2005. Adaptation de la spiruline de sud de Madagascar à la culture en eau de mer. Mise au point des structures de production à l'échelle villageoise. These de Doctorat En Sciences en Océanologie Appliquée. Institut Halieutique et des Sciences Marines. Université de Toliara.
68. Jourdan, J. P., 1999. Cultivez votre Spiruline. Manuel de Culture Artisanale de la Spiruline. Antenna Technology, Genève. P 126.
69. Jacotot B., Campillo B. *Nutrition humaine, Abrégés, Connaissances et pratiques*. Paris: Masson; 2003.
70. Kaneko T., Saito K., Kawamura Y., Takahashi S. (2001). "Molecular cloning of acid stable glucose isomerase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a simple two step PCR method, and its expression in *Escherichia coli*". *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 5: 1054-62.
71. König C. (2007). "Les algues : première ligne végétale". <http://www.futurasciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/lesalgues-premiere-ligee-vegetale> 523/c3/221/p2/. Consulte le 30/12/2012

72. Kapoor R., Mehta U. *Iron bioavailability from Spirulina platensis, whole egg and whole wheat*. Indian journal of experimental biology. 1992; 30 (19): p. 904-907.
73. Kitagawa S., Sakamoto H., Tano H. (2004). "Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin". *Chem.Pharm.Bull.*, 52: 999-1001.
74. Le Borgne Y. (1986). "La culture des micro- algues". In: *Aquaculture I Technique et Documentation* , 192p. Paris.
75. Leclerc V., Floc'h J-Y. (2010). "Les secrets des algues". *Ed. Quae*, 19p. Paris.
76. Lee JB., Srisomporn P., Hayashi K., Tanaka T., Sankawa U., Hayashi T. (2001). "Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity". *Chemical And Pharmaceutical Bulletin*, 1, 49: 108-110
77. Leonard J., Compere P. (1967). "Spirulina platensis (Gom.) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en proteines". *Bull. Nat. PlatentuinBelg*, 37, 1 : 23p
78. Leonard J. et Compere P. *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en proteines. 1967; 37 (1): p. Suppl. 23 p.
79. Li, L., Zhang, J., Jiang, T., Guo, B., Chang, W. Liang, D. 2001. Purification, crystallization and preliminary crystallographic investigations of selenium-containing phycocyanin from selenium-rich algae (*Spirulina platensis*). *Science in China*, 44, (4), 337-344.
80. Li Z-Y., Guo S-Y., Li L., Cai M-Y. *Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of Spirulina platensis in an air-lift photobioreactor*. *Bioresource Technology*. 2007; 98: p. 700-705.
81. M'Baye, B.K., Lô, B.B., Bassene, E., 2011. Etude des carotenoides, des phycocyanines et des protéines de la spiruline en Mauritanie. ScienceLib Editions Mersenne, 3, (110906). ISSN 2111.4706pp.
82. Mata, T., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14,1, 217-232
83. Mathiu, D. 2008, 2009 ; Dimensionnement d'une raffinerie de biodiesel. Production à partir de Dunaliella Salina de Giraud. Projet d'élève ingénieur. Spécialisation Chimie Verte et Bioprocédés. Montpellier SupAgro & Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier. Septembre 2008 à Mars 2009.

84. Mishima T., Murata J., Toyoshima M., Fujii H., Nakajima M., Hayashi T., Kato T. and Saiki I. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical and experimental Metastasis*. 1998; 16: p. 541-550.
85. Manoj G, Venkataraman LV, Srinivas L. (1992). "Antioxidant properties of *Spirulina (Spirulina platensis)*". *Seshadri and Bai. Spirulina. MCRC*. 48-154.
86. Molyneux P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26: 211–219.
87. Nelissen B., Wilmotte A., Neefs J.M. and De Wachter R. *Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis*. *Systematic and Applied Microbiology*. 1994; 17: p. 206-210.
88. Nutrition Rehabilitation of HIV-Infected and HIV-Negative Undernourished Children Utilizing *Spirulina*. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2005; 49: p.373-380.
89. NFV 05- 113, 1972. Minéralisation des matières organiques par incinération. Produits dérivés des fruits et légumes. 2ième éd. Lavoisier Tec et Doc. Paris. 97 – 100.
90. Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., Pinto, L.A.A., 2009. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. *Bioresource Technology*, 100. 1297–1303.
91. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., Raghavarao, K.S.M.S. 2006. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127. 76–81.
92. Prat R. et Vonarx V. *La structure de chloroplaste : La théorie endosymbiotique*. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/endosymbiose.htm>, page consultee le 23 octobre 2008.
93. Paniagua-michel J., Dujardin E. et Sironval C. *Le Tecuitlal, concentré de spirulines source de protéines comestibles chez les Aztèques*. *Cahiers de l'Agriculture*. 1993; 2: p. 283-287.
94. Puyfoulhoux G., Rouanet JM., Besancon P., Baroux B., Baccou J.C., Caporiccio B. *Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/ Caco-2 cell culture model*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: p. 1625-1629. Unicef.
95. Pastre J., (2007). "Interet de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques". *Revue Méd. Vét.*, 158, 4: 180-189.

96. Pierlovisi C. (2008). "Composition chimique de la spiruline. colloque international sur la spiruline- Toliara Sud – Ouest de Madagascar.
97. Quillet, M. 1975. Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les Spirulines. Ann. Nutr. Alim. 29. 553-561.
98. Ross E., Dominy W. *The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (Spirulina platensis) for poultry* . Poultry Science. May 1990; 69 (5): p. 794-800.
99. Romay C., Armesto J., Ramirez D., Gonzalez R., Ledon N. and Garcia I. *Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae*. Inflammation Research. Janvier 1998; 47(1): p. 36-41.
100. Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., and Rimbau V. *C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects* . Current Protein and Peptide Science. 2003; 4: p. 207-216.
101. Rito-Palomares, M., Nunez L., Amador D., 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from Spirulina maxima, J. Chem. Tech. Biotech., 76. 1273–128.
102. Sanchez Miron, A., Ceron Garcia, M.C., Contreras Gomez A. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of Phaeodactylum tricornerutum in quasi-steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochem. Eng, 16. 287 – 297.
103. Santillan, C. 1974. Cultivation of the Spirulina for Human Consumption and for Animal Feed. International Congress of Food Science and Technology.
104. Sall M.G, Dankoko B., Badiane M., Ehua E. et Kuakuwin N. *Résultats d'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline à Dakar (à propos de 59 cas)*. 1999; 46 (3): p.143-146.
105. Shekharam, K.M., Venkataraman, L.V., Salimath, P.V. 1987. Carbohydrate Composition and Characterization of Two Unusual Sugars from the Blue Green Alga Spirulina-Platensis. Phytochemistry, 26. 2267-2270.
106. Silveira, S.T., Burkert , J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert C.A.V., Kalil, S.J., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using factorial design. Bioresource Technology, 98. 1629–1634.
107. Sudha, S.S., Karthic, R., Rengaramanujam, J., Athulya 2011. Antimicrobial activity of Spirulina platensis and Aphanotoece sp. on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. South As. J. Biol. Sci. 1, (2).87 – 98.

108. Svcerk C., Smith D.W. *Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment option: a review*. Journal of Environmental Engineering and Science. 2004; 3: p.155-184.
109. Sautier C. and Tremolieres J. *Food value of spirulina in humans*. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation. 1976; 30: p. 517-534.
110. Seshadri C.V. *Large scale nutritional supplementation with spirulina alga. All India Coordinated Project on Spirulina*. Madras, India: ShriAmmMurugappaChettiar ResearchCenter (MCRC); 1993.
111. Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance". *Science*, 235: 1043- 1046.
112. Simpore J., Kabore F., Zongo F., Dansou D., Bere A., Pignatelli S., M Bondi D., Ruberto G. and Musumeci S. *Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spirulina and Misola*. Nutrition Journal. 2006 January; 5 (3): p. 1-7. ISP.
113. Simpore J., Zongo F., Kabore F., Dansou D., Bere A., Nikiema J-B., Pignatelli S., MBiondi D., Ruberto G., Musumeci S.
114. Tang GW., Yin SA. (2008). "Vitamin A equivalence of *Spirulina* betacarotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method". *American Journal of Clinical Nutrition*, 87:1730-1737.
115. US Food and Drug Administration. *Agency Response Letter GRAS Notice N° GRN000127*. <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g127.html>,
116. Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs A. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*. 2002; 77: p. 9-13.
117. Wang X-Q., Li L-N., Chang W-R. Zhang J-P., Gui L-L., Gua B-J., Liang D-C. *Structure of C-phycoyanin from Spirulina platensis at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes*. *Acta Crystallographica*. 2001; D57: p. 784-792.
118. Wheeler D.L., Chappay C., Lash A.E., Leipe D.D., Madden T.L. and Schuler G.D. *Database resources of the National Center for Biotechnology Information*. 2000; 28 (1): p. 10-14.
119. Watanabe Y., de la Noue J., Hall D.O. (1995). "Photosynthetic performance of anhelical tubular photobioreactor incorporating the Cyanobacterium *Spirulina platensis*". *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 2: 261-269.

120. Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A., Jenkins D.J. (2006). "Colonic health :fermentation and short chain fatty acids". *J ClinGastroenterol.*, 40: 235-243.
121. Youdim K.A., Shukitt-Hale B., MacKinnon S., Kalt W., Joseph. J.A. 2000. "Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in vivo". *Biochimica et BiophysicaActa.*, 1523 :117-122.
122. Zhang C-W (1994). "Effect of polysaccharide and phycocyanin from *Spirulina* on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice". Proceeding of 2nd Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, China: 58.
123. Zhi-gang Z, Zhi-li L, Xue-xian L. (1997). "Study on the isolation, purification and antioxidation properties of polysaccharides from *Spirulina maxima*". *ActaBotanicaSinica.*, 39: 77-81.

PUBLICATION



REVUE SCIENTIFIQUE ÉDITÉE PAR
LE LABORATOIRE DE RECHERCHE EN
BIOTECHNOLOGIE DES PRODUCTIONS VÉGÉTALES
UNIVERSITE BLIDA 1



AGROBIOLOGIA

Revue Agrobiologia, (2017), volume 7(2)
ISSN (P): 2170-1652 - Dépôt légal: 5895-2011
e-ISSN: 2507-7627 - www.agrobiologia.net

La revue scientifique *AGROBIOLOGIA* est éditée par le Laboratoire de Recherche en Biotechnologie des Productions Végétales de l'Université Saad Dahlab (Blida 1), Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Biotechnologies. C'est une revue semestrielle où des travaux de recherche spécialisés en sciences agronomiques et biologiques peuvent être publiés.

- **Périodicité :** semestrielle (02 fois /an)
- **Rédacteur en chef :** Pr SNOUSSI SID-AHMED
- **Editeur :** MAISON ALYA PRESTIGE
- **Secrétariat :** Pr Djazouli Zahreddine
- **Contact :** contact@agrobiologia.net

Membres du comité de lecture :

- **Pr. Abdelly Chedly :** Centre de Biotechnologie de Sfax Tunisie
- **Dr. Abdulhussaine Maria Stella :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Pr. Arab Karim :** (Algérie : Université de Boumerdes)
- **Dr. Aroun Mohamed Elfodhil :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Dr. Ayadi Radia :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Pr. Benrebaha Fatima Zohra :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Pr. Bele constantin :** Université Chuj Napoka Faculté des Sciences agricoles et Médecine Vétérinaire. Roumanie
- **Pr Benlemlih Mohammed :** Faculté des sciences de Fès .Maroc
- **Pr. Benmoussa Mebrouk :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Dr. Bounaceur Farid :** (Algérie : Université de Tiaret)
- **Dr. Chaouia chérifa :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Dr. Cohen Nozha :** (Institut Pasteur , Casablanca - Maroc)
- **Pr. Couderchet Michel :** (Université du Reims Champagne - Ardenne - France)
- **Pr. Doumandji Salah Eddine :** Ecole Nationale Supérieure Agronomique Le Harrach
- **Dr. Djazouli Alim Fatma Zohra :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Pr. Guendouz –Benrima Atika :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Dr. Merah Othmane :** Université Paul Sabatier Toulouse France
- **Pr Merzouki .Mohamed :** Faculté des sciences de Fès .Maroc
- **Pr. Mesli Lotfi :** (Algérie : Université de Tlemcen)
- **Pr. Mitiche Bahia :** Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach
- **Pr. Petit Daniel :** Université de Limoges
- **Dr. Rouibi Abelhak :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Pr. Saidi Fairouz :** (Algérie : Université de Blida 1)
- **Dr. Saladin Gaelle :** Université de Limoges
- **Pr. Valles Vincent :** Université d'Avignon (France)
- **Dr. Zebib Bachar :** Université Paul Sabatier Toulouse France
- **Dr. Zouaoui Ahmed :** (Algérie : Université de Blida 1)

La revue *Agrobiologia* accepte tout article présentant de nouvelles études sur tout aspect de recherche fondamentale, appliquée et développement dans les domaines des sciences agronomiques et biologiques. L'article peut être de nature scientifique que technique.

Quant un auteur reprend une figure, une photographie ou un tableau provenant d'une autre source (autre publication), il doit indiquer l'origine du document après avoir obtenu au préalable le droit de reproduction.

- **Langue :** Les articles peuvent être rédigés en français ou en anglais
- **Présentation du manuscrit :** Il doit être saisi sur du papier standard (préférence A4 en interligne (1,50 cm) avec des marges de 2,50 cm de chaque côté en recto seulement

Le manuscrit doit en général comprendre dans l'ordre suivant :

1. Page du titre : Le titre contient

- Le titre de l'article qui doit être aussi explicite que concis
- Le nom des auteurs et leur affiliation
- L'adresse complète et l'email si possible

2. Page du résumé : la page du résumé comprend

- **Le titre de l'article :** le résumé en français et en anglais, chaque résumé ne doit pas dépasser 250 mots.
- **Les mots clés**

3. Nomenclature : tous les paramètres cités dans le texte doivent être définis et les unités utilisées reportées .Les symboles utilisés doivent être de type standard (ISO par exemple). Les unités doivent être conformes au système international.

4. Texte : le texte doit être divisé en chapitre ayant chacun un titre. Les chapitres et sous chapitres doivent être numérotés en chiffres arabes.

5. Remerciements : Ceux-ci devraient être retenus et groupés dans un paragraphe séparé à la fin du texte.

6. Référence : Les références doivent être identifiées dans le texte à l'aide de chiffres arabes entre crochets. La liste de référence des auteurs devrait être dans leur ordre d'apparition à la fin du manuscrit. Les noms des publications périodiques et des périodiques cités devraient être écrits entièrement

7. Figures : les illustrations doivent être numérotées dans le texte en chiffres arabes entre parenthèses, chaque figure doit être aussi explicite que possible .Les légendes sont regroupées sur des feuilles séparées.

8. Tableaux : ils doivent être inclus dans le manuscrit et numérotés en chiffres arabes dans l'ordre de leur apparition dans le texte.

- **Soumission du manuscrit :** le manuscrit doit être envoyé en quatre exemplaires à l'adresse du laboratoire de recherche (Université de Blida, Département d'agronomie) L'article ne doit ni avoir fait l'objet d'une publication antérieure ; ni simultanément soumis (ou publié) dans d'autres revues. Chaque article doit être complet dans sa forme finale.

- **Evaluation du manuscrit :** tout manuscrit est soumis à l'avis de trois experts qui jugent de l'intérêt de sa publication .Ces experts peuvent demander des modifications ou des compléments aux auteurs. Dans ce cas, les manuscrits doivent être corrigés et retournés Toutefois, aucune modification majeure ne sera acceptée à ce stade de la publication .Seuls les articles ayant reçu un avis favorable seront acceptés pour publication.

Pour tout article accepté pour publication, le manuscrit définitif doit être accompagné de l'adresse électronique et un CD.

EDITORIAL	P.390
INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND PATHOGEN MICROORGANISMS: FROM STRESS PERCEPTION TO DEFENSE RESPONSES SALADIN Gaëlle	P.395
PRINCIPALES LÉSIONS HÉMOLYMPHATIQUES OBSERVÉES CHEZ LES LARVES DE <i>DOCIOTAURUS MAROCCANUS</i> TRAITÉES SUR TERRAIN PAR LE GREEN MUSCLE® ARKAM Fatima, KARA-TOUMI Fatma Zohra, TAIL-HALIL Ghania, SAIDI Fairouz et AHMED SERIR Billel	P.401
STRATÉGIES DE CHOIX DE L'EMPLACEMENT DES NIDS D'HIVER DE <i>THAUMETOPOEA PITYOCAMPA</i> (DENIS & SCHIFFERMÜLLER, 775) AU NIVEAU DE TROIS PINÈDES DANS LA RÉGION DE BORDJ BOU ARRERIDJ (ALGÉRIE) ZIOUCHE Sihem, BAALI Faiza, MOUTASSEM Dahou et DJAZOULI Zahr-Eddine	P.412
INFESTATION PAR <i>THAUMETOPOEA PITYOCAMPA</i> DEN. AND SCHIFF. DANS DEUX PINERAIES DE LA REGION DE DJELFA (ALGERIE) ET IMPACT DE <i>JUNIPERUS OXYCEDRUS</i> ET <i>JUNIPERUS PHOENICEA</i> SUR LA MORTALITE ET LA CONSOMMATION DES LARVES <i>IN VITRO</i> BACHIR Kamilia, TAIL Ghania, ZAMOUM Mohamed, ACI Louiza, CHERIF H.Set SAIDI Fairouz	P.427
PLANT AND ENTOMOLOGICAL DIVERSITIES IN AN ANCIENT PIT MINE: EXAMPLE OF LEPIDOPTERA AND ORTHOPTERA VAN HEESCH Nieke and PETIT Daniel	P.440
APPROCHE FONCTIONNELLE DE LA DIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS D'INSECTES AUXILIAIRES DANS UN VERGER DE CLEMENTINIERÀ CHLEF. MAHMOUDI Abdelhaq, ALLAL BENFEKIH Leila, ROUABHI Abdeldjabar	P.445
VARIATIONS TEMPORELLES DES PRINCIPAUX INSECTES RAVAGEURS DES AGRUMES DANS UN VERGER D'ORANGER DANS LA RÉGION DE GUELMA KHALADI Omar, ARABA Oum Hani, BOUCHMEL Hanane et BENRIMA Atika	P.459
CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES COMMUNAUTÉS DES TRICHOPTÈRES DU BASSIN VERSANT DE LA TAFNA BEMMOUSSAT-DEKKAK Soumia et ABDELLAOUI-HASSAINE Karima	P.471
CARACTERISATION FLORISTIQUE DE LA STEPPE A <i>HAMMADA SCOPARIA</i> DANS L'ATLAS SAHARIEN ORANAIS (NAAMA- ALGERIE) BOUCHERIT Hafidha, BENABDELI Khéloufi, BENARADJ Abdelkrim	P.483
CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF <i>ARTEMISIA HERBA-ALBA</i> ASSO. FROM DJELFA LAKEHAL Samah, CHAOUIA Cherifa and BENREBIHA Fatma Zohra	P.491
INFLUENCE OF SEASONAL VARIATION ON CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF FIELD WORMWOOD <i>ARTEMISIA CAMPESTRIS</i> TOUIL Souhila, BENREBIHA Fatma Zohraand HADJ SADOK Tahar	P.502
EFFET BIOCIDÉ DE L'HUILE ESSENTIELLE FORMULÉE DU BIGARADIER <i>CITRUS AURANTIUM</i> L. (75) SUR LE PUCERON NOIR DE LA FÈVE <i>APHIS FABAE</i>. (SCOPOLI, 76). BABA-AISSA Karima, MOUSSAOUI Kamel, BERAHAL Sara, VERDEGUER SANCHO Mercedes et DJAZOULI Zahr-Eddine	P.512
COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>MELISSA OFFICINALIS</i> L. FEKNOUS Souad, HAIANI Cherifa, CHERIF Hamida et SAIDI Fairouz	P.523

- EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF *LAVANDULA STOECHAS* L. ESSENTIAL OIL** **P.531**
LOUKHAOUKHA Rahma et SAIDI Fairouz
- POTENTIEL ALLÉLOPATHIQUE DE BIOPRODUITS FORMULÉS À BASE D'HUILES ESSENTIELLES DE *PISTACIA LENTISCUS* (L., 75) ET DE *CUPRESSUS ARIZONICA* (GREENE, 88)** **P.539**
MOUSSAOUI Kamel, BOUCHERF Abdelhamid, ZEKKARI Islam, VERDEGUER SANCHO Mercedes et DJAZOULI Zahr-Eddine
- VARIATION PHÉNOLOGIQUE DU CONTENU PHYTOCHIMIQUE ET DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE *CYTISUS TRIFLORUS* L'HER** **P.548**
DAGHBOUCHE Selma, DAGHBOUCHE Abd El Salem, BOULESSNAM Abd El Malek, SNOUSSI Sid Ahmed et DJAZOULI Zahr-Eddine
- TOXICITÉ AIGUË ET SUBAIGUË DES EXTRAITS MÉTHANOLIQUES D'*INULA VISCOSA* L. (*DITTRICHIA VISCOSA* L.)** **P.562**
OUAHCHIA Célia, CHERIF Hamida-Saida, HAMAIDI-CHERGUI Fella, MARZEN Loubna, DERADJI Samira, HEMMA Rym, NOUAR Nouria et SAIDI Fairouz
- SCREENING PHYTOCHIMIQUE, ESSAIS *IN VITRO* DE CYTOTOXICITE, ET ANTILEISHMANIEN DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE FEUILLES 'EE-F' DE *CESTRUM PARQUI* L'HERIT.** **P.574**
NAKKAB Selma, TAIL Ghania, KARA Fatma .Zohra, MALLEM Hamida, CHADER Henni, EDDAIKRA Naouel et SAIDI Fairouz
- ÉVALUATION PHYTOCHIMIQUE, ET POTENTIEL ANTIOXYDANT, ANTIBACTÉRIEN DE TROIS CULTIVARS DE FRUIT DE GRENADIER "*PUNICA GRANATUM* L" DU NORD EST D'ALGÉRIE** **P.589**
KACI-MEZIANE Zoubida' BOUTEKRABT Linda, LAIDOUDI Djamilia, MOUSSAOUI Tarek MELAHI Nawel, AIT OUARAB Dahbia, DJEGHBOUB Meryam, MEGUETAOUI Asma
- PRÉDICTION DE LA VALEUR ALIMENTAIRE DU *Pistacia atlantica* DESF. ET DE L'*Acacia farnesiana* (L.) WILLD.** **P.603**
BOUBEKEUR Salima, MEFTI KORTEBY Hakima et HOUMANI Mohamed
- EFFET DES ULTRASONS SUR LES PROPRIÉTÉS ÉMULSIFIANTES DE PROTÉINES DES LACTOSÉRUMS BRUTS ET MODIFIÉS** **P.610**
ACEM Kamel, CHOUKRI Ali, BEJAR Samir, GARGOURI Youssef, HADJ-TAIB Noomen, BASSEM Jaouadi et MOULAI- MOSTEFA Nadji
- ÉVALUATION DES MÉTHODES D'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE ET SON RENDEMENT À PARTIR DE *SPIRULINA PLATENSIS*** **P.623**
LAFRI Imène, JEMNI Monia BENSEHAILA Sarra et BOUTEKRABT Lynda
- EFFET DE LA VARIATION CLIMATIQUE DES ZONES DE PRODUCTION SUR LE COMPORTEMENT ET LE RENDEMENT DE VARIÉTÉS INTRODUITES DE POMME DE TERRE EN ALGÉRIE** **P.635**
KHEDDAM Hocine', ALLAL-BENFEKIH Leila, BENDIFALLAH Leilaet MOUDOUD Razika
- ORIGINES ET MÉCANISMES D'ACQUISITION DE LA SALINITÉ DES EAUX DE LA NAPPE QUATÉNAIRE DE LA MITIDJA (NORD-ALGÉRIE)** **P.644**
ZAMICHE Samira, HAMAIDI-CHERGUI Fella, DEMIAI Afafe, BELAIDI Mouloud
- LES EXPLOITATIONS LAITIÈRES DU CHELIFF EN ALGÉRIE À L'ÈRE DE LA LIBÉRALISATION ÉCONOMIQUE** **P.658**
DJERMOUN Abdelkader, RAMDANE Sidali et BRAHIM Mahmoud

ÉVALUATION DES MÉTHODES D'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE ET SON RENDEMENT À PARTIR DE *SPIRULINA PLATENSIS*

LAFRI Imène^{1*}, JEMNI Monia² BENSEHAILA Sarra³ et BOUTEKRABT Lynda⁴

1. Université de Blida1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Département des Biotechnologies - Laboratoire de recherche en Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, route de Soumaâ, Blida- Algérie.

2. Centre de Recherche et d'Agriculture Oasienne, B.P. 62, km1 Route deTozeur, Tozeur Tunisie

3. Laboratoire des bioressources naturelles Université Hassiba Benbouali Chlef Algérie

4. Université de Blida1, Institut des Sciences et Techniques Appliquées, Blida, Algérie

Reçu le 01/12/2017, Révisé le 31/12/2017, Accepté le 31/12/2017

Résumé

Description du sujet : *Spirulina platensis* est une algue bleu-vert grâce à la chlorophylle (vert) et la phycocyanin (bleu) contenue dans les phycobilisomes. En raison de ces applications pharmaceutiques et alimentaires, le choix de la méthode d'extraction de la phycocyanine revêt une importance primordiale.

Objectifs : Les travaux ont porté sur l'évaluation de plusieurs méthodes d'extraction de la phycocyanin issue de deux types de spiruline provenant des régions de Tamanrasset (Algérie) et de Djerba (Tunisie) pour déduire la méthode optimale d'obtention d'une grande masse de phycocyanin.

Méthodes : Six méthodes d'extraction ont été évaluées (eau, congélation, sonication, solvant, séparation biphasée et macération par le glycérol) sur deux souches de spiruline provenant de la région de Tamanrasset (Guelta à 1824m d'altitude (23°N., 5°E) et la région de Milita Djerba, située (33° 48' N ; 10° 51' E).

Résultats : L'extraction biphasée a donné des rendements supérieurs comparativement aux autres méthodes (eau, solvant) (0,39 vs 0,19 mg/ml). Par macération avec le glycérol, la spiruline algérienne a donné une concentration de phycocyanin de 0,625 mg/ml et 1,37de pureté. La spiruline tunisienne a donné des rendements plus élevés. La concentration des polyphénols totaux varie entre 4 et 22 mg/g/ms pour la souche algérienne et 6 et 25 mg/g/ms pour la souche tunisienne.

Conclusion : La macération avec le glycérol est la méthode optimale d'extraction de la phycocyanin. Sa caractérisation a permis de déterminer en termes de rendement les composés phénoliques, les flavonoides et son activité antioxydante tant recherchée dans le domaine médical et cosmétique.

Mots clés: spiruline, phycocyanin, extraction, pureté, antioxydante.

EVALUATION OF METHODS OF EXTRACTING PHYCOCYANINE AND YIELD FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

Summary

Description: *Spirulina platensis* is a blue-green alga with chlorophyll (green) and phycocyanin (blue) contained in phycobilisoms. Due to pharmaceutical and food applications, the best of the method of extraction is the vital.

Objectives: Work focused on an evaluation of several phycocyanin extraction methods from two types of *Spirulina*, from two regions; Tamanrasset (Algeria) , Djerba (Tunisia) to deduce the optimal method.

Methods: Six extraction methods were evaluated (water, freezing, sonication, solvent, biphasic separation, maceration with glycerol) on two spirulina strains from the Tamanrasset (Guelta at 1824m, (23° N. ,5° E) and Milita Djerba (33° 48' N; 10° 51'E).

Results: Two phase extraction gave higher yields versus other methods (water, solvent) (0.39 vs 0.19 mg / ml). By maceration with glycerol, algerian *Spirulina* gave phycocyanin concentration of 0.625 mg/ml, purity of 1.37. Tunisian *Spirulina* yielded 50% higher yields. Concentration of total polyphenol is between 4-22 mg/g/dm for algerian strain and 6-25 mg/g/dm for the tunisian strain.

Conclusion: Maceration with glycerol is the optimal method of extracting. Characterization determine the yield of the phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the medical and cosmetic field.

Key words: spirulina, phycocyanin, extraction, purity, antioxidant

* Auteur correspondant: LAFRI Imène, E-mail : i.lafri1703@yahoo.fr

INTRODUCTION

Les phycobiliprotéines, regroupées généralement en phycocyanines, phycoérythrine, et allophycocyanines sont constituées de protéines pigmentaires photosynthétiques présentes chez certaines algues (algues rouges et cryptophycées) et chez toutes les cyanobactéries [1 ; 2]. La phycocyanine est généralement extraite à partir de la cyanobactérie spiruline (*Arthrospira platensis*). Actuellement, la demande du consommateur en produits naturels pour des impératifs écologiques est en constante progression confortée par une législation qui tend à substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Elle est déjà introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires [3].

L'extraction des phycobiliprotéines à partir d'une biomasse sèche ou fraîche entraîne une lyse cellulaire qui consiste en une rupture des membranes plasmiques de cellules ou de bactéries en utilisant notamment des moyens physiques/mécaniques (par sonication, cycles de congélation/décongélation) ou des moyens chimiques (solutions de CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ou encore des moyens biologiques (enzymes). L'extrapolation de tels procédés à une échelle industrielle génère des coûts d'investissement élevés [4]. D'autres procédés, plus simples, utilisent la précipitation par les sels et particulièrement le sulfate d'ammonium qui permet en plus de conserver les phycobiliprotéines contre les bactéries et les champignons [5].

La production de phycocyanine à un coût accessible, sans dégradation de ses propriétés constitue un défi pour la plupart des chercheurs [3 ; 6]. Ainsi beaucoup de travaux basés sur des méthodes efficaces de bio-séparation à grande échelle, qui permettraient d'atteindre de hautes valeurs de pureté ont été effectuées. Parmi les méthodes de purification qui pouvaient répondre à tous ces critères, figurait l'extraction aqueuse biphasée (ATPE) [7] ou encore le procédé d'extraction et de stabilisation de la phycocyanine qui consiste en l'étape de macération du ou des matériaux dans du glycérol ou un mélange eau/glycérol [8].

L'objet des travaux étant l'obtention d'une bonne masse de la phycocyanine extraite à partir de la spiruline provenant de deux régions géographiquement différentes, la région de Tamanrasset (sud Est du Sahara, Algérie) et la région de Djerba, Sud Ouest de Tunisie).

Les travaux portent ainsi sur une comparaison du rendement d'extraction pour les deux souches tout en préservant d'une part, ses qualités intrinsèques, et d'autre part, de pouvoir déduire après, la méthode optimale en termes de rendement pour une récupération maximale des phycobiliprotéines dans l'état naturel des algues.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

La spiruline algérienne est produite artisanalement dans des bassins où les conditions de culture et de production sont maîtrisées [9]. La souche algale utilisée est dénommée Behatam, elle est située à 1824 m d'altitude près de Tamanrasset dans le Sahara algérien, à la Guelta Taguemart (N 23°01.- E 5°25.473'). La récolte de nos échantillons a été faite durant le mois de juin 2014. Les feuilles de la plante sont ensuite séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité pour les besoins de l'étude.

La souche tunisienne dénommée « *Spirulina platensis* » provient de la région de Milita Djerba située 33°48' N 10°51'E. Elle est produite en paillettes au niveau de la station de Djerba, représentant un environnement le plus adapté à sa croissance.

2. Méthodes d'extraction

2.1. Extraction par l'eau

Une suspension de 4 % de spiruline dans l'eau a été préparée à l'obscurité. La solution obtenue, subit une décantation puis une centrifugation (9000 tours/15 mn) à 4°C. On prélève alors le surnageant lequel subit une dilution (facteur 100) avec de l'eau. On a mesuré ensuite la densité optique de la solution à 615 nm, 652 nm, 620 nm et 280 nm. Le calcul du taux (%) en phycocyanine est effectué selon la formule de M'Baye et al. [10].

$$\% \text{ en phycocyanine} : 1,873 \times (Abs_{620} - 0,474 \times Abs_{652}) = f/C$$

Avec :

C : % de la concentration de spiruline sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %
f : le facteur de dilution en volume

2.2. Extraction par sonification

On met 10 mg de spiruline en suspension dans 100 ml de tampon phosphaté, la solution est mise sous l'action de l'ultrason E 3010 NA pendant 5 min suivie d'une centrifugation (9000 tours/15min à 4°C). On prélève le surnageant et on ajoute de nouveau au culot 100 ml de tampon et on le remet à l'action de l'ultrason pendant 2 à 3 min, puis centrifugation afin de prélever de nouveau le surnageant et le mélanger avec le premier et mesurer les absorbances à 615, 652, 620 et 280 nm. Le taux (%) en phycocyanine est calculé selon la formule de Bennett & Bogorad [11].

$$PC = [Abs_{615} - 0,474 \times Abs_{652}] / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11].

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.3. Extraction par congélation

On met 100 mg d'algues secs dans 200 ml de tampon. La solution subit des cycles de congélation/décongélation (congélation à -20°C) jusqu'à l'éclatement des cellules. La solution obtenue subit une première centrifugation. Au surnageant, on ajoute 20% de sulfate d'ammonium saturé ((NH₄)₂SO₄), on le laisse reposer pendant 2 heures. Après une deuxième centrifugation, on ajoute au surnageant obtenu 45% de sulfate d'ammonium saturé. Enfin une troisième centrifugation est effectuée directement et le culot est récupéré. Des lectures de spectrophotométrie sont effectuées à des absorbances de 615nm, 620nm, 652nm et 280nm.

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

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11].

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.4. Extraction par solvant

On verse 4 g de spiruline dans 120 ml de tampon phosphate, au début on l'incube à l'obscurité à 4 °C pendant 12h (pour permettre la lyse des cellules à l'hypotonie de mise), puis centrifuger pour la première fois et récupérer le surnageant bleu. Ensuite, on ajoute 120 ml du tampon phosphate au précipité et incubé 12h à l'obscurité. Après la deuxième centrifugation, les deux surnageants sont mélangés afin de lire l'absorbance à 615, 652, 620 et 280 nm. Le calcul du % en phycocyanine est basé sur de l'équation de Chen et al. [12].

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

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11].

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.5. Extraction par séparation aqueuse à double phase

Une solution de spiruline de 90 % est préparée à l'obscurité. On lui rajoute une solution de 40% de polyéthylène glycol (PEG) : 40 g PEG dans 60 g d'eau, ensuite une solution de sels de phosphates à 20% : mélange de 10 g de K₂HPO₄ et 10 g de KH₂PO₄ dans 60 g d'eau (on a utilisé une solution glucosée à 20% et on a comparé le rendement d'extraction) [13].

En se référant à la méthode d'Albertson [4] on a prélevé 1g de 40 % (W/W) de PEG, 1,25 g de 20 % (W/W) de sels phosphates + 0.5 g de spiruline et 2.25 g d'eau. Après mélange, le composé mis à l'obscurité, subit une agitation pendant 20 min à l'aide d'un agitateur, puis une centrifugation, mesure de volumes de phases, de lecture de l'absorbance à 620, 652, 615 et 280 nm. Le calcul du pourcentage en phycocyanine et de sa pureté est basé sur les équations suivantes :

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

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11]

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.6. Extraction par macération dans le glycérol

En s'inspirant des travaux de Potcher [7], on a mélangé 800 g de poudre de spiruline algérienne dans un volume de 60/40 eau/glycérol. On laisse macérer pendant 15 j à température ambiante à l'obscurité. Une filtration frontale lente est ensuite effectuée, avec un filtre compatible alimentaire (filtre en nylon, finesse de 25 µm). Nous avons suivi le même protocole pour la spiruline tunisienne au sein du Laboratoire de l'Institut des Régions Arides (IRA) (Médenine, Tunisie). Le calcul de pourcentage de la phycocyanine est réalisé selon les formules suivantes :

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

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11]

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

3. Caractérisation des extraits de phycocyanine

3.1. Analyse des composés phénoliques

3.1.1. Polyphénols totaux

On fait diluer l'extrait de la phycocyanine algérienne ainsi que celui de la souche tunisienne, puis on met 0,5 ml de chaque dilution dans des tubes à essai pour chacune d'elles. On ajoute 5ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin à 10%. Après 3 mn on ajoute 0.5 ml de carbonate de sodium 20%. La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure à l'obscurité. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage [14] (Figure 1).

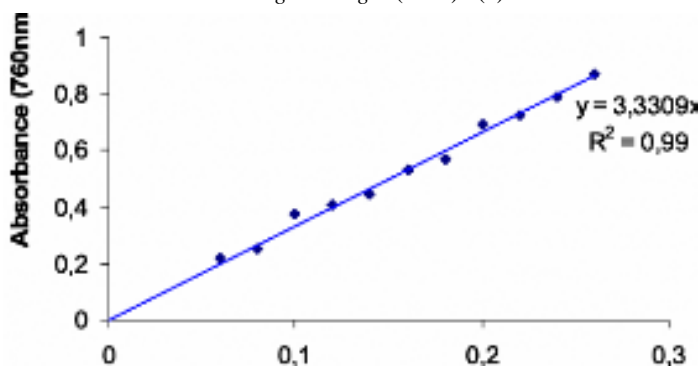


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique [15]

3.1.2. Quantification des composés phénoliques par chromatographie (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters Alliance 2695) avec détection UV (détecteur UV 24889 et un logiciel empower V3) a été utilisée pour l'identification et la détection du profil phénolique de l'extrait. La phase mobile est de composition gradiente. Elle est composée de deux solvants A et B dont la proportion est mentionnée dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : Composition des deux éluant en fonction du temps de l'opération [15]

Temps (mn)	Proportion (%)	
	Solvant A (Acétonitrile)	Solvant B (H ₂ O, pH 2,5)
Initial	2	98
5,00	2	98
15,00	5	95
17,00	100	0
25,00	100	0

3.2. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de la phycocyanine a été mesuré par deux méthodes :

3.2.1. Méthode au diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)

Une quantité de 12 mg de DPPH a été solubilisée dans 50 ml de méthanol. De la solution mère, on prélève 3 ml pour faire la dilution dans 7 ml de méthanol. Pour la spiruline algérienne : On prend 0,21 ml de l'extrait de phycocyanine dans 1,94 ml de la solution de DPPH et on fait une incubation à l'obscurité pendant 30 min à 20°C.

Le même protocole est utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante pour la spiruline tunisienne. La lecture de l'absorbance s'est effectuée à 517 nm. L'activité antioxydante pour chacune des solutions a été calculée selon la formule:

$$\text{Delta-DPPH} = \text{ADPPH} - [A_{517}] \text{ simple}$$

Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme standard [15]

3.2.2. Détermination du pouvoir réducteur par la méthode de FRAP [16]

Un volume de 1 ml de phycocyanine algérienne ou tunisienne a été mélangé à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium $K_3 [Fe (CN)_6]$ à 1 %. Après 30 mn d'incubation à 50 °C, nous avons ajouté 2,5 ml de la solution d'acide trichloracétique à 10 % au mélange, qui a ensuite subi une centrifugation pendant 10 mn. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combiné à 2,5 ml d'eau distillée et à 0,5 ml de solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1 % puis l'absorbance a été mesurée à 700 nm.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Extraction de phycocyanine

Les concentrations de phycocyanine obtenues pour les deux souches (algérienne et tunisienne) selon les différentes méthodes d'extractions sont représentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline algérienne et tunisienne en fonction du mode d'extraction.

Méthodes d'extraction	Concentration (mg/ml)		Degré de pureté	
	Sp Alg (*)	SpTun (**)	Sp Alg (*)	SpTun (**)
Eau	0,19	0,20	0,20	0,25
Congélation	0,06	0,10	0,80	0,90
Sonification	0,25	0,25	0,60	0,80
Solvant	0,30	0,35	0,55	1,00
Séparation aqueuse à double phase	0,39	0,41	0,30	0,4

(*) Spiruline algérienne, (**) spiruline tunisienne

La concentration en phycocyanine de la spiruline sèche varie entre 0,06-0,39 mg/ml pour la souche algérienne et 0,20-0,41 mg/ml pour la souche tunisienne. On remarque ainsi que l'extraction aqueuse à deux phases a donné des concentrations supérieures en C-phycocyanine comparativement aux autres méthodes (congélation et eau) pour les deux souches (algérienne et tunisienne) (0,39 vs 0,19 mg/ml) et (0,41 vs 0,20).

Un effet significatif du pays de production sur la concentration d'extraction est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée. En effet, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des concentrations de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne. Nous avons regroupé les différentes concentrations et les rapports de pureté selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 2.

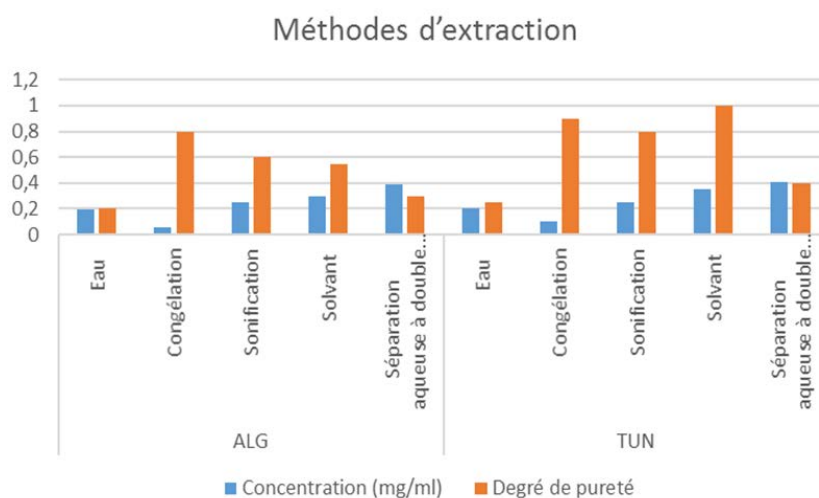


Figure 2. Concentrations et pourcentages de pureté de la phycocyanine des souches (algérienne et tunisienne) de la spiruline.

Concernant la pureté, l'extraction par la congélation a donné des valeurs de pureté supérieures aux autres méthodes (par sonification, par solvant) (0,80 vs 0,60) et (0,80 vs 0,55). Une pureté de C-phycocyanine de 0,7 est considérée comme grade alimentaire, 3,5 comme grade réactive, par contre si elle est supérieure 4, elle est considérée comme grade analytique [17]. Ces valeurs indicatives permettent d'affirmer que cette extraction est de l'ordre alimentaire. Un effet significatif du pays de production sur le degré de pureté est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée. Toutefois, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des degrés de pureté de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne.

D'après Silveira *et al.* [2], la pureté d'extraction est de l'ordre de 0,40 avec une extraction de phycocyanine de l'ordre de 3,73 mg/ml avec l'eau et 4,20 mg/ml avec le tampon phosphate. Benedetti *et al.* [18] ont obtenu une pureté de 2,74 avec une extraction avec sulfate d'ammonium à 50%.

Toutefois, une concentration de phycocyanine de l'ordre de 2,67 mg/ml et un rendement de 0,79 ont été obtenu en utilisant l'extraction aqueuse à double phase [19]. Alors qu'Antelo *et al.* [20] ont obtenu par la même méthode une pureté de 5,1 et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 1,11 mg/ml.

2. Extraction par macération avec le glycerol

A la fin de la filtration, nous avons obtenu avec la spiruline algérienne une concentration de phycocyanine de 0,625 mg/ml avec une pureté de l'ordre de 1,37 avec environ 2,5 l de filtrat (phycocyanine) et 7,5 l de retentât (retenu par le filtre). Par contre avec la spiruline tunisienne nous avons obtenu une concentration de 1,90 mg/ml et un rendement de 2,3 soit un taux de rendement plus élevé de 50%. Ces différences de valeurs pourraient être liées aux conditions de culture, au climat, à la souche mère, ou encore aux moyens de séchage.

3. Caractérisation de phycocyanine

3.1. Polyphénols totaux

Nous avons regroupé les différentes concentrations selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 3.

On remarque que la concentration des polyphénols totaux à partir des différentes méthodes d'extractions de C-phycocyanine est comprise entre 4 et 22 mg/g de matière sèche pour la souche algérienne et 6 et 25 mg/g de matières sèches pour la souche tunisienne. Les phycocyanines sont riches en poly phénols. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Bujard *et al.* [15] à 4,9 µg/g. Toutefois nous avons noté que la concentration des polyphénols totaux la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol (25 et 22 g/gms). Cependant la souche tunisienne a donné des valeurs supérieures en poly phénols par rapport à la souche algérienne (25 vs 22 g/gms).

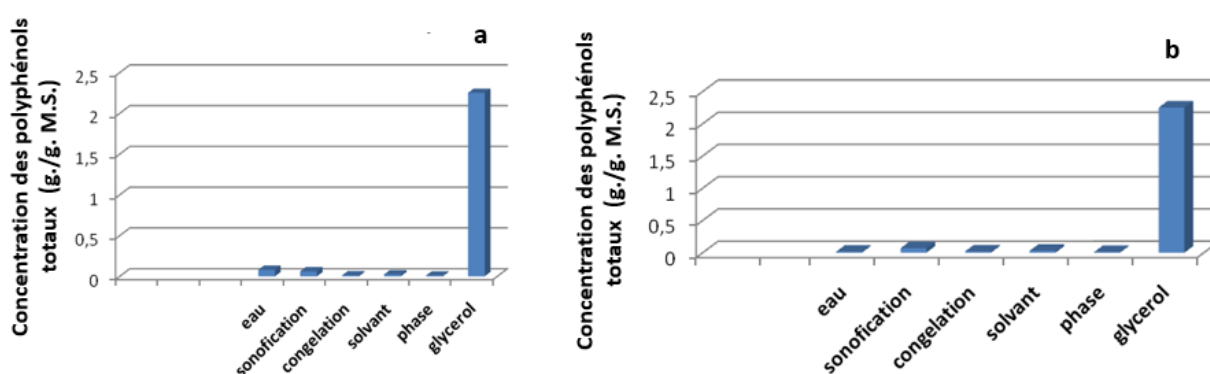


Figure 3: La concentration des polyphénols totaux issue de la phycocianine

(a) : Algérienne, (b) : Tunisienn

3.2. Détermination des polyphénols par HPLC

Nous avons regroupé au niveau du tableau 3 les composés polyphénoliques et flavonoïdes détectés dans chaque extrait selon le temps de rétention.

Tableau 3: Détermination des polyphénols pour chaque Extrait de la spiruline par HPLC

Extrait	Temps de rétention	Polyphénols
	Extrait 1	2,17
18,17		Pyrogallol
18,53		Rutin
19,0		Acide vanilline
Extrait 2	Temps de rétention	Polyphénols
	2,15	Inconnu
Extrait 2	2,4	Inconnu
	4,9	Acide gallique
	18,17	Pyrogallol
	18,53	Rutin
	18,99	Quercitine
Extrait 3	Temps de rétention	Polyphénols
	2,11	Inconnu
Extrait 3	2,3.14	Inconnu
	18,17	Pyrogallol
	18,85	Inconnu
	18,99	Quercitine

L'identification des pics sur le chromatogramme se fait grâce à des échantillons standards en se basant sur le temps de rétention des molécules analysées. Le profil chromatographique représenté dans la figure 4 a permis d'identifier au niveau des extraits, la présence des composés polyphénoliques dans *Spirulina platensis* d'acides phénoliques et de composés flavonoïdes

tels le pyrogallol, l'acide gallique, le rutin et la quercitine.

3.1. Les Flavonoïdes

Les concentrations des flavonoïdes obtenues par différentes méthodes d'extraction sont représentées dans le tableau 4 :

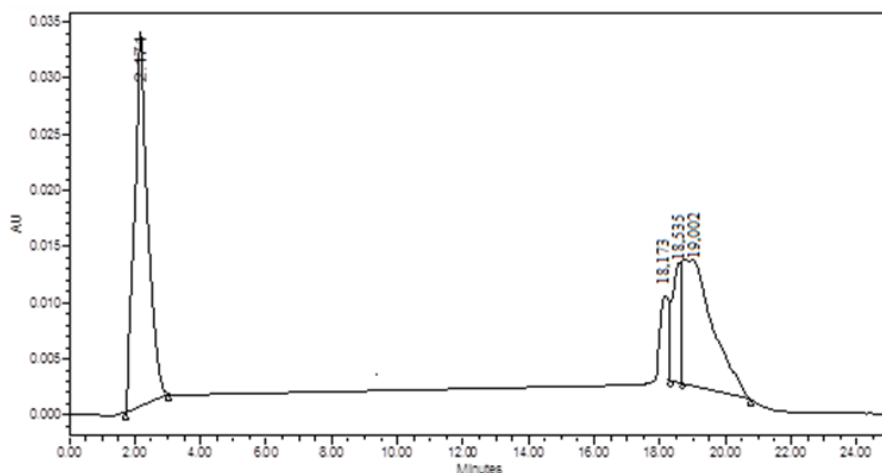
Tableau 4: Concentration en flavonoïdes pour la spiruline (Algérienne et Tunisienne)

Flavonoïde (mg/g)	Spiruline algérienne	Méthode d'extraction					
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase	Glycérol
	<i>Spiruline algérienne</i>	0,33	0,27	1,878	2,12	0,25	3,4
	<i>Spiruline tunisienne</i>	0,45	0,32	2,1	2,9	0,75	4,5

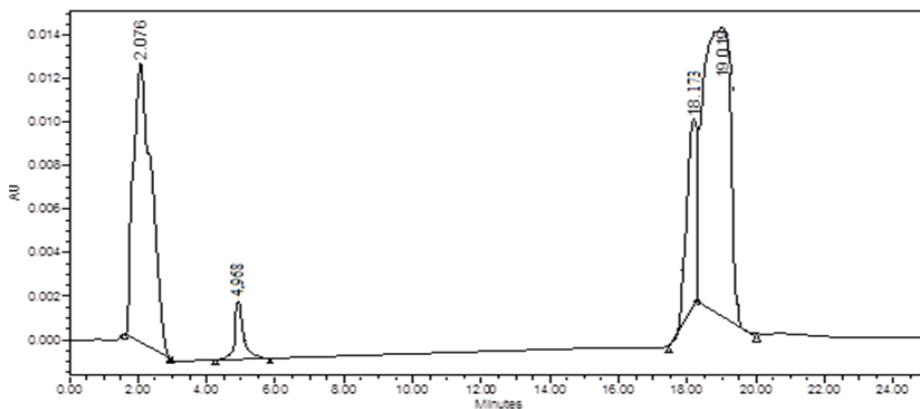
La concentration la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol pour les deux souches (algérienne et tunisienne) avec des valeurs respectives de 3,4 mg/g et 4,5 mg/g. Par contre, les concentrations les plus faibles sont obtenues par les méthodes d'extraction par sonification et par l'eau (0,33mg/g, 0,45 mg/g) respectivement. La phycocyanine Tunisienne montre des valeurs plus élevées par rapport à la phycocyanine Algérienne en flavonoïde quel que soit la méthode d'extraction utilisée.

4. Activité anti oxydante

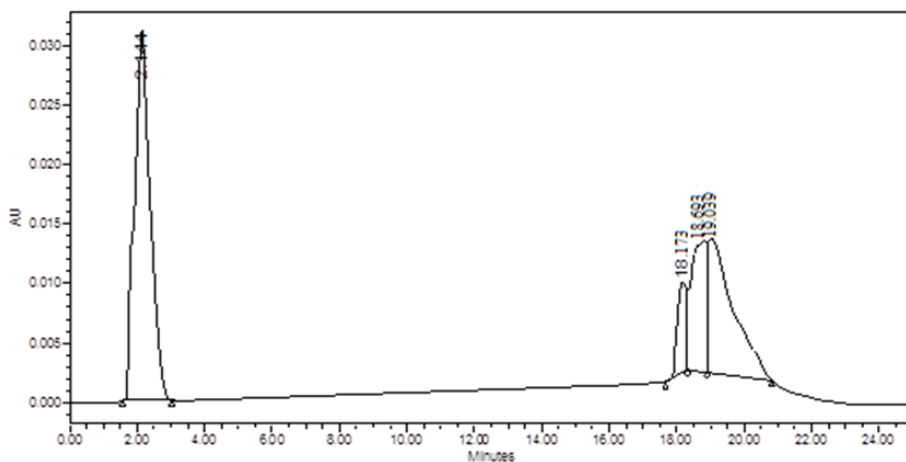
Les résultats de l'activité anti oxydante sont représentés dans le tableau 5. Nous avons obtenu une activité qui varie de 0,2 à 0,6% pour la souche Algérienne et une activité qui varie de 0,4 à 1,4% pour la souche Tunisienne.



Chromatographe de l'Extrait 1



Chromatographe de l'Extrait 2



Chromatographe de l'Extrait 3

Figure 4: Profils des polyphénols obtenus pour les 3 extraits
 Les conditions d'analyse par HPLC : Longueur d'onde 254 nm,
 Concentration de l'échantillon : 1mg/ml, Temps d'analyse 25 mn

Tableau 5: Valeurs (en %) d'activité anti oxydante pour la spiruline (Algérienne et Tunisienne)

		Méthode d'extraction				En phase	Glycérol
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant		
Activité anti oxydante (%)	Souche algérienne	0,2	0,16	0,01	0,23	0,06	0,6
	Souche tunisienne	0,4	0,13	0,015	0,33	0,09	1,4

D'après le tableau 6, nous remarquons que les méthodes d'extraction par le glycérol montrent une activité antioxydante la plus élevée avec toutefois, une activité antioxydante supérieure pour la souche tunisienne. Patil *et al.* [21], ont obtenu une activité antioxydante variant de 0,17 à 51,94% selon que la concentration de spiruline varie de 0,3 à 15 mg/ml.

La quantification de l'activité antioxydante d'un extrait par le biais du pouvoir réducteur (PR) implique la capacité des antioxydants analysés à transformer le fer (III) en fer (II), grâce à leur faculté donatrice d'électrons.

Tableau 6 : Pouvoir réducteur des deux souches de phycocyanine (Algérienne et Tunisienne)

Méthode d'extraction	Macération au glycérol Pouvoir réducteur (Abs)
Pycocyanine Algérienne	1,749 ±0,052
Pycocyanine Tunisienne	1,788 ±0,0026

Le même tableau indique que la phycocyanine Tunisienne extraite par macération avec le glycérol possède le meilleur pouvoir réducteur. Cependant, la différence est non significative ($p > 0,05$), sachant que la phycocyanine présente une meilleure activité antioxydante révélée par le test de DPPH.

CONCLUSION

Les travaux entrepris sur la spiruline avaient pour but une évaluation de différentes méthodes d'extraction pour un meilleur rendement d'extraction. Les résultats obtenus ont montré que l'extraction aqueuse à double phase a donné des valeurs supérieures comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant). La caractérisation de la phycocyanine de souche algérienne a permis de déterminer en termes de rendement les composés phénoliques, en flavonoïdes et surtout son activité antioxydante. Ainsi, différentes extractions sur *S. platensis* ont été réalisées par des solvants afin d'étudier l'activité antioxydante des composés phénoliques contenus dans cette souche algale. L'analyse s'est faite par chromatographie liquide de haute performance (HPLC). L'extraction des polyphénols a montré une richesse de la spiruline en polyphénols totaux, ainsi que les

composés phénoliques qui disposent d'un pouvoir antiradicalaire important.

Il est à noter enfin, que la souche algérienne, en pleine culture et de production artisanale au Sahara, espace de soleil et d'eau de la chaleur et des sels minéraux se doit à être valorisée. Sa production est simple à mettre en œuvre car la souche est maintenant disponible sur place. Une caractérisation plus poussée de cette souche par les techniques de résonance magnétique (RMN) permettrait de lui donner sa valeur indicative pour des éventuelles valorisations principalement en cosmétique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Bermejo-Bescós P; Piñero-Estrada E; and Ma Villar del Fresno A; (2008). Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron- induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in vitro*, 22: 1496 - 1502.
- [2]. Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert C.A.V., and Kalil, S.J., (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98: 1629–1634.
- [3]. Mata, T., Martins, A.A., and Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): 217-232.
- [4]. Albertson P.A. and Tjerneld F. (1994). *Methods in enzymology. Volume 228. Aqueous two phase systems*. Edited by: Harry Walter, Gote Johansson. Academic Press, INC. London.
- [5]. Cruchot, H., (2008). La spiruline : bilan et perspective ; Thèse de doctorat en pharmacie N° 25.08.15. Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon. Université de Franche-Compte.
- [6]. Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., and Pinto, L.A.A., (2009). Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. *Bioresource Technology*, 100 : 1297–1303.
- [7]. Pottcher F. (2014). *Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications*. WO 2014045177 A1

- [8]. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., and Raghavarao, K.S.M.S. (2006). Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127: 76–81.
- [9]. Hiri 2013 <http://www.les-sahariens.com/theme/actualites/>
- [10]. M'Baye, B.K., Lô, B.B., and Bassene, E., (2011). Etude des caroténoïdes, des phycocyanines et des protéines de la spiruline en Mauritanie. ScienceLib Editions Mersenne, 3, (110906). ISSN 2111.4706pp.
- [11]. Bennett. A. and Bogorad. L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419 – 435.
- [12]. Chen, T., Wong, Y.S., and Zheng, W., (2006). Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry* 67(22): 2424-2430.
- [13]. Bulgariu, L., and Bulgariu, D., (2008). Cd (II) extraction in PEG (1550)–(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase systems using halide extractants. *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (3) :341–350.
- [14]. Brand-Williams. W. Cuvelier. M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie /Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- [15]. Moukette Moukette, B., Pieme, C.A., Nya Biapa, P.C., Njimou, J.R. and Ngogang Yonkeu, (2015). Radicals quenching potential, protective properties against oxidative mediated ion toxicity and HPLC phenolic profile of a Cameroonian spice: *Piper guineensis*. *Toxicology Reports*; 2:792–805
- [16]. Bujard, E., Baco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholtz, A., and Wuhrmann, J.J., Clément, G., (1970). Composition and nutritive value of blue green algae (*Spirulina*) and their possible use in food formulations. 3rd International Congress of Food Science and Technology.
- [17]. Rito-Palomares, M., Nunez L., and Amador D., (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 76: 1273–128.
- [18]. Benedetti. S. Benvenuti. F. Pagliarani. S. Francogli. S. Scoglio. S. and Canestrari. F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences* 75: 2353 – 2362.
- [19]. Rito-Palomares, M., Nunez L., and Amador D., (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 76: 1273–128.
- [20]. Antelo F.S. Anschau, A. Costa. J.A.V. and Kalil, S.J. (2010). Extraction and Purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* in Conventional and Integrated Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5): 921-926.
- [21]. Patil, G.K.S. and Raghavarao M.S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34: 156–164.
- [22]. Colla, L.M., Furlong, E.B., and Costa, J.A.V., (2007). Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilien Archives of Biology and Technology*. 5(1): 161-167.
- [23]. Sudha, S.S., Karthic, R., Rengaramanujam, J., Athulya (2011). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* and *Aphanothece sp.* on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. *South As. J. Biol. Sci.* 1 (2): 87- 98.