

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N°:



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE

FILIÈRE : CHIMIE

OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par:

M^{elle}. Amina NAOUI

Intitulé:

**Optimisation des conditions de stabilité de la phycocyanine,
formation d'un complexe [PC: β -CD: Fibre] et étude de l'activité
Biologique**

Devant le jury composé de :

M ^{me} . S.YOUSFI	Université Mohamed Boudiaf- M'sila	Présidente
M ^{me} . S. ZIDANE	Université Mohamed Boudiaf-M'sila	Promotrice
M ^r . H.BOULEGHLEM	Université Mohamed Boudiaf-M'sila	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Mes premiers remerciements à Dieu Tout Puissant, par qui j' ai la force et le courage d' achever ce travail.

L' étude a été menée au laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l' Université Mohamed Boudiaf de M' sila, sous la supervision du Mme ZIDANE Salima. Je la remercie pour la confiance qu' elle m' a témoignée durant ces trois mois, pour ses conseils à mon égard dans ce travail, et pour sa gentillesse et sa patience.

Je lui ai témoigné un profond respect non seulement pour ses qualités scientifiques qui m' ont permis d' apprendre beaucoup de choses, mais aussi pour ses qualités humaines.

J' exprime également ma sincère gratitude à Mr BOULEGHLEM Hocine pour ses conseils pendant le travail au laboratoire, Je voudrais également le remercier ainsi que madame YOUSFI Samia d' avoir accepté d' évaluer mon modeste travail.

Mes remerciements aux enseignants de chimie pour leurs disponibilités, encadrement, bienveillance et le soutien apporté durant mon cursus universitaire.

Je tiens également à remercier tout le personnel de la faculté de chimie ainsi que les responsables des laboratoires de université de M' sila, qui m' ont aidé à la réalisation de ce mémoire.

Sans oublier de remercier tous mes enseignants depuis l' école primaire jusqu' à l' université.

Un remerciement particulier à la meilleure promotion 2022 de master en chimie pharmaceutique.



Dédicace

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

A mes parents pour avoir fait ce que je suis.

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

A mon respiratoire dans la vie : Mon cher père

A ma existence dans la vie : Ma chère mère

A mes chers frères : Oussama, Taha, Mostafa

A l'âme innocente de ma sœur Khawla

Je tiens à remercier mes amies : Imen, Fairouz, Rekaya

Mes cousins et cousines et ma grande famille

Amina

L'algue bleu-vert *Arthrospira platensis* communément appelée *Spiruline* est cultivée et commercialisée dans le monde sous différentes souches et formes, largement connue dans le domaine nutritionnel et thérapeutique en raison de sa richesse en éléments nutritifs principalement les protéines ainsi qu'une large gamme de composés bioactifs à propriétés fonctionnelles antioxydants. Nos travaux ont porté principalement sur l'étude des propriétés distinctives de la phycocyanine (PC), (anti-oxydante, anti-bactérienne). En raison de ses propriétés, la PC est considérée comme étant une biomolécule hautement exploitable en industrie et ses applications biotechnologiques. Ce travail vise à discuter les méthodes d'extractions, aussi bien que les paramètres physiques et chimiques (pH, température et lumière) susceptibles d'influencer la stabilité du PC (en présence de la β -cyclodextrine (β -CD) et/ou β -CD et une fibre). Les résultats ont montré que l'ajout de la β -CD a amélioré la stabilité de la PC et d'une façon importante lors de l'ajout de la fibre.

Les résultats de l'activité antioxydante ont montré des valeurs et une efficacité significatives de cet extrait et ses complexes et matrices ; d'après les résultats de l'activité antibactérienne, nous concluons que la matrice (PC:HP- β -CD:fibre) (à l'état liquide) est la plus active et la plus efficace contre les trois souches (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Staphylococcus aureus*). Et alors, d'après cette étude la PC et la matrice à base de fibre possède une activité biologique importante qui permet de lui conférer une valeur nutritionnelle et pharmacologique. Ce qui ouvre des perspectives pour être un médicament, un déjeuner et un traitement futur réussis et répandus.

Mots clés: *Arthrospira platensis*, *Spiruline*, phycocyanine, méthode d'extraction, culture, stabilité.

The blue-green algae *Arthrospira platensis* commonly known as *Spirulina* is cultivated and marketed worldwide in different strains and forms, widely known in the nutritional and therapeutic field due to its richness in nutrients mainly proteins as well as a wide range of compounds bioactives with antioxidant functional properties. Our work has mainly focused on the study of the distinctive properties of phycocyanin (PC) (anti-oxidant, anti-antibacterial). Because of its properties, PC is considered to be a highly exploitable biomolecule in industry and its biotechnological applications. This work aims to discuss the extraction methods, as well as the physical and chemical parameters (pH, temperature and light) likely to influence the stability of PC (in the presence of β -cyclodextrin (β -CD) and/or β -CD and a fiber). The results showed that the addition of β -CD improved the stability of PC and significantly when adding fiber.

Antioxidant activity results showed significant values and efficacy of this extract and its complexes and matrices; from the results of the antibacterial activity we conclude that the matrix (PC:HP- β -CD:fiber) (liquid) is the most active and the most effective against the three strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus aureus*). And then, according to this study, the phycocyanin and the fiber-based matrix have an important biological activity which makes it possible to confer on it a nutritional and pharmacological value. This opens prospects to be a successful and widespread medicine, lunch and future treatment.

Keywords: *Arthrospira platensis*, spirulina, phycocyanin, extraction method, culture, stability.

يتم زراعة وتسويق الطحالب الزرقاء والخضراء *Arthrospira platensis* المعروفة باسم سبيرولينا في جميع أنحاء العالم في سلالات وأشكال مختلفة ، وهي معروفة على نطاق واسع في المجال الغذائي والعلاجي نظرًا لغناها بالعناصر الغذائية بشكل أساسي البروتينات بالإضافة إلى مجموعة واسعة من المركبات النشطة بيولوجيا مع مضادات الأكسدة الوظيفية. ركز عملنا بشكل أساسي على دراسة الخصائص المميزة للفيكوسيانين (مضاد للأكسدة ، مضاد للجراثيم). بسبب خصائصه، يعتبر جزيئا حيويًا قابلاً للاستغلال في الصناعة وتطبيقات التكنولوجيا الحيوية. يهدف هذا العمل إلى مناقشة طرق الاستخراج ، بالإضافة إلى الخصائص الفيزيائية والكيميائية (الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والضوء) التي من المحتمل أن تؤثر على استقرار الفيكوسيانين (في وجود حلقي دكستريين (β -CD) و / أو β -CD والألياف).

أظهرت النتائج أن إضافة β -CD حسنت من ثبات الفيكوسيانين وبشكل ملحوظ عند إضافة الألياف. أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة قيمًا وفعالية لهذا المستخلص ومركباته ومصفوفاته ؛ من نتائج النشاط المضاد للبكتيريا نستنتج أن المصفوفة (PC: HP- β -CD:Fiber) (الحالة السائلة) هي الأكثر نشاطًا والأكثر فاعلية ضد السلالات الثلاثة (*Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aerogenosa* ، *Escherichia coli*). ثم ، وفقًا لهذه الدراسة ، يكون الفيكوسيانين والمصفوفة القائمة على الألياف نشاطًا بيولوجيًا مهمًا يجعل من الممكن إضفاء قيمة غذائية ودوائية عليها. وهذا يفتح آفاق أن يكون الدواء والغذاء والعلاج المستقبلي ناجحًا وواسع الانتشار.

الكلمات المفتاحية: *Arthrospira platensis*؛ سبيرولينا ، فيكوسيانين ، طريقة الاستخلاص ، الزراعة، الاستقرار.

AGPI:	Les acides gras poly-insaturés
APC:	Allophycocyanine
ARN:	Acide RiboNucléique
B-PE:	B- PhycoErythrin
CD:	Cyclodextrine
CDs:	Cyclodextrines
CEP:	Champ électrique pulsé
CGTase:	Cyclodextrine glycosyl transférase
COX²:	cyclooxygénase 2
PC:	Phycocyanine
Da:	unité de masse atomique
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
DPPH:	2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl
HP-β-CD:	2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
IC50:	concentration inhibitrice de 50 %
ITS:	Espace transcrit en interne
kDa:	Constante de dissociation
Kn:	Malaxage
LED:	diode électroluminescente
MH:	Muller Hinton
MPa:	unité de pression
Mw:	Micro-ondes
Mph:	mélange physique
OGM:	organisme génétiquement modifié
PE:	Phycoérythrine
PEC:	Phycoerythrocyanine
PH:	potentiel d'Hydrogène
PSU:	Unité de salinité
ROS:	reactive oxygen species
R-PE:	R-PhycoErythrin
SARM:	Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
SOD:	Super oxydes dismutases
US:	Ultrasons
UV:	Ultra violet
λ_{\max} :	longueur d'onde
α-CD:	Alpha-cyclodextrine
β-CD:	Béta-Cyclodextrine
γ-CD:	Gamma-cyclodextrine

Liste des figures

<i>Partie I: Partie théorique</i>		Page
Figure I.1	<i>Arthrospira platensis</i> : filament vu au microscope.....	02
Figure I.2	Récolte de la Spiruline.....	03
Figure I.3	<i>Spirulina maxima</i> et <i>Spirulina platensis</i> : Filaments de spiruline observés au microscope optique.....	06
Figure I.4	Cycle biologique de la Spiruline.....	08
Figure I.5	Zone de croissance naturelle de la Spiruline dans le monde.....	09
Figure I.6	Composition moyenne globale de la spiruline.....	12
Figure II.1	Représentation schématique d'un phycobilisome classique.....	19
Figure II.2	Structures chimiques de la phycocyanine, de la phycocyanobiline et de la bilirubine.....	22
Figure II.3	<i>Bienfaits thérapeutiques de la Spiruline</i>	31
Figure III.1	Structure des cyclodextrines natives, alpha, bêta et gamma.....	39
Figure III.2	Structure de la β -CD.....	40
Figure III.3	Structure tridimensionnelle des trois CDs.....	40
Figure III.4	Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion CD - xylène et de sa dissociation.....	42
<i>Partie II: Partie pratique</i>		
Figure I.1	Processus de filtration de la PC.....	47
Figure I.2	Spectre Uv de PC.....	48
Figure I.3	Formation du complexe (PC: β -CD) par mélange physique.....	49
Figure I.4	Formation du complexe (PC: β -CD) par malaxage.....	49
Figure I.5	Formation du complexe (PC: β -CD) par Micro-ondes.....	50
Figure I.6	Formation du complexe (PC:HP- β -CD) par Micro-ondes.....	50
Figure I.7	Formation du complexe (PC:HP- β -CD) par Ultrasons.....	51
Figure I.8	Préparation de fibre.....	51
Figure I.9	Formation du complexe (PC: β -CD:Fibre) par Micro-ondes.....	51
Figure I.10	Formation du complexe (PC:HP- β -CD:Fibre) par Micro-ondes.....	52
Figure I.11	Le suivit de la dégradation de la PC à différentes températures.....	52
Figure I.12	Spectre UV de PC à la température T= 30°C en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	53
Figure I.13	PC, (PC: β -CD) à la température T= 30°C.....	53
Figure I.14	Le complexe (PC:Fibre) (1),(PC: β -CD:Fibre) (2) à la température T= 30°C.....	53
Figure I.15	Stabilité de la PC à la température T= 40°C : Absorbance en fonction du temps.....	54
Figure I.16	Spectre Uv de PC à la température T= 40°C en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	54
Figure I.17	PC, (PC: β -CD) à la température T= 40°C.....	55
Figure I.18	PC (1), (PC: β -CD:Fibre) (2) à la température T= 40°C.....	55
Figure I.19	Spectre Uv de PC à la température T= 50°C en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	55
Figure I.20	PC (à gauche), (PC: β -CD) (à droite) à la température T= 50°C ...	56
Figure I.21	PC (à gauche), (PC: β -CD:Fibre) (à droite) à la température T= 50°C.....	56
Figure I.22	Spectre Uv de PC à la température T= 60°C en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	57
Figure I.23	PC, (PC: β -CD) à la température T= 60°C.....	57
Figure I.24	Le complexe (PC: β -CD:Fibre) à la température T= 60°C.....	57

Liste des figures

Figure I.25	Spectre Uv de PC à la température T= 70°C en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	58
Figure I.26	PC, (PC: β -CD), à la température T= 70°C.....	58
Figure I.27	Stabilité de PC à pH=7: Absorbance en fonction du temps.....	58
Figure I.28	Spectre Uv de PC à pH=7 en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	59
Figure I.29	Le complexe (PC: β -CD) (1) et la matrice (PC: β -CD:Fibre) (2) au pH=7.....	59
Figure I.30	Spectre Uv de PC à pH=10 en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps.....	60
Figure I.31	PC et le complexe (PC: β -CD) au pH=10.....	60
Figure I.32	Le complexe (PC:Fibre) (1) et la matrice (PC: β -CD:Fibre) (2) au pH=10.....	60
Figure I.33	Effet de la lumière naturelle sur la stabilité de PC: Absorbance en fonction du temps.....	61
Figure I.34	La PC en lumière naturelle en fonction du temps.....	61
Figure I.35	Effet de la lumière Forcée sur la stabilité de PC: Absorbance en fonction du temps.....	62
Figure I.36	Le suivit de l'effet de la lumière forcée sur la stabilité de PC en fonction du temps.....	62
Figure I.37	Le suivit de l'effet de la lumière forcée sur la stabilité du complexe (PC: β -CD) en fonction du temps.....	62
Figure I.38	Structure du DPPH avant et après la réaction avec un antioxydant.....	63
Figure I.39	L'absorbance de PC en fonction des concentrations.....	65
Figure I.40	L'absorbance de complexe en phase liquide (PC: β -CD) en fonction des concentrations.....	65
Figure I.41	L'absorbance de complexe en phase liquide (PC: β -CD:Fibre) en fonction des concentrations.....	65
Figure I.42	L'absorbance de complexe en phase liquide (PC:HP- β -CD) en fonction des concentrations.....	66
Figure I.43	L'absorbance de complexe en phase liquide (PC:HP- β -CD:Fibre) en fonction des concentrations.....	66
Figure I.44	L'absorbance de complexe en phase liquide (PC pur) en fonction des concentrations.....	66
Figure I.45	L'absorbance de complexe à l'état solide (PC: β -CD Mw) en fonction des concentrations.....	67
Figure I.46	L'absorbance de complexe à l'état solide (PC: β -CD:FibreMw) en fonction des concentrations.....	67
Figure I.47	L'absorbance de complexe à l'état solide (PC:HP- β -CD Mw) en fonction des concentrations.....	67
Figure I.48	L'absorbance de complexe à l'état solide (PC:HP- β -CD : Fibre Mw) en fonction des concentrations.....	68
Figure I.49	Histogramme des valeurs d'IC ₅₀ pour le PC et les complexes formé en phase liquide.....	70
Figure I.50	Histogramme des valeurs d'IC ₅₀ pour les complexes formé par MO...	71
Figure I.51	<i>Escherichia coli</i>	72
Figure I.52	<i>Staphylococcus aureus</i>	72
Figure I.53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
Figure I.54	Activité antimicrobienne d'extraits avec la souche <i>Pseudomonas</i>	

Liste des figures

	<i>aeruginosa</i>	75
FigureI.55	Activité antimicrobienne d'extraits avec la souche <i>Escherichia coli</i>	75
FigureI.56	Activité antimicrobienne d'extraits avec la souche <i>Staphylococcus aureus</i>	76

Liste des tableaux

Partiel:		Page
Partie théorique		
Tableau I.1	Classification de l' <i>Arthrospira platensis</i>	04
Tableau I.2	Les diverses appellations de la <i>Spiruline</i>	04
Tableau I.3	Différences morphologiques entre le genre <i>Spirulina</i> et <i>Arthrospira</i>	05
Tableau I.4	Résumé de plusieurs descriptions morphologique d' <i>Arthrospira platensi</i>	06
Tableau I.5	Différentes souches de spiruline.....	07
Tableau I.6	Distribution géographique naturelle de <i>Spirulina platensis</i>	10
Tableau I.7	Composition en acides aminés de <i>Spirulina platensis</i>	12
Tableau I.8	Analyse des vitamines de la <i>Spirulina platensis</i> « <i>Arthrospira</i>	13
Tableau I.9	Analyse des minéraux de la <i>Spirulina platensis</i> « <i>Arthrospira</i> ».....	14
Tableau I.10	Analyse des phytopigments naturels de la <i>Spirulina platensis</i> « <i>Arthrospira</i> ».....	14
Tableau I.11	Analyse des caroténoïdes naturels de la <i>Spirulina platensis</i> « <i>Arthrospira</i> ».....	15
Tableau I.12	Analyse des autres composantesde la <i>Spirulina platensis</i> « <i>Arthrospira</i> ».....	15
Tableau II.1	Caractéristiques des principales phycobiliproteines purifiés.....	20
Tableau II.2	Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines.....	27
Tableau II.3	Paramètres qui influencent la stabilité de la PC (pH, température et lumière).....	29
Tableau II.4	Propriétés pharmacologiques et biologiques des PCs.....	32
Tableau III.1	Principales caractéristiques physicochimiques des trois cyclodextrines.....	41
Tableau III.2	Liste de spécialités pharmaceutiques commercialises contenant des cyclodextrines.....	44
Partie II :		
Partie pratique		
Tableau I.1	Résultats de l'activité antioxydante par le test DPPH de PC et ses complexes.....	64
Tableau I.2	Activité anti radicalaire du PC et ses complexes d'inclusion.....	69
Tableau I.3	Résultats de l'activité antibactérienne par la PC et ses complexes et matrices en phase liquide et solide.....	74

Sommaire

Remerciements.....	I
Dédicace.....	II
Résumé.....	III
Abstract.....	IV
ملخص.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
Introduction générale.....	01
Pratique I: Partie théorique <i>Chapitre I : Généralité sur spiruline</i>	
I.Spiruline.....	02
I.1.Généralité sur spiruline.....	02
I.2.Historique.....	02
I.3.Classification.....	03
I.4.Taxonomie.....	04
I.5.Morphologie.....	07
I.6.Reproduction.....	08
I.7.Cycle biologique.....	08
I.8.Écologique.....	08
I.9. Facteurs influençant sur la croissance de la spiruline.....	11
I.9.1.Température.....	11
I.9.2.Lumière.....	11
I.9.3. pH.....	11
I.9.4.Salinité.....	11
I.10. Composition chimique de spiruline.....	11
I.10.1.Protéines.....	12
I.10.2.Lipides.....	13
I.10.3.Glucides.....	13
I.10.4.Vitamines.....	13
I.10.5.Minéraux.....	13
I.10.6.Pigments.....	14
I.10.7.Enzymes.....	14
I.11. Applications de la spiruline.....	15
Référence bibliographiques.....	16
<i>Chapitre II : Généralité et rappels bibliographiques sur la PC</i>	
II. PC.....	19
II.1.Constituants fonctionnels principaux.....	19
II.1.1.Phycobilisome.....	19
II.1.2.Phycobiliprotéines.....	20
II.2. Présentation de la PC.....	21
II.3. Propriétés physico-chimique de la PC.....	22
II.4. Méthodes d'extraction de la PC.....	23
II.4.1.Méthodes mécaniques.....	23
II.4.1.1.L'extraction par l'eau.....	23
II.4.1.2. Extraction par congélation/décongélation.....	23
II.4.1.3. L'extraction par Homogénéisation des cellules.....	23
II.4.1.4.Extraction par technique «Bead beating».....	24
II.4.2.Méthodes chimique.....	24
II.4.2.1.Extraction par solvant.....	24

Sommaire

II.4.2.2.Extraction par acide.....	24
II.4.2.3.Extraction enzymatique.....	24
II.4.3.Méthodes innovatrices d'extraction.....	25
II.4.3.1. Extraction assistée par les ultrasons.....	25
II.4.3.2. Extraction assistée par micro-ondes.....	25
II.4.3.3. Extraction assistée par les hautes pressions.....	26
II.4.3.4. Extraction des fluides supercritique.....	26
II.4.3.5.Champs électriques pulsée.....	26
II.5.Stabilité de PC.....	27
II.6 .Activités thérapeutiques de la PC.....	30
II.6.1.Activité antibactérienne.....	31
II.6.2.Activité anti-inflammatoire.....	31
II.6.3.Activité antioxydant.....	32
II.7.Intérêt de l'extraction de la PC.....	33
II.8.Utilisation de la PC.....	33
Référence bibliographiques.....	34

Chapitre III : Cyclodextrine

III.Cyclodextrine.....	39
III.1.Introduction.....	39
III.2.Historique.....	39
III.3. Caractéristique structure et physico-chimique.....	39
III.3.1.Structure.....	39
III.3.2.Caractéristique physicochimiques.....	41
III.3.2.1.Solubilité dans l'eau.....	42
III.4.Composition d'inclusion.....	42
III.4.1. Généralités sur la complexation.....	42
III.4.2. Formation des complexes d'inclusion.....	42
III.4.3. Conséquences de la complexation.....	43
III.5.Application pharmaceutique.....	43
Référence bibliographiques.....	45

Pratique :II Partie pratique

Chapitre I : Méthodes & Résultats et discussion

I. Extraction de la PC.....	47
I.1. Extraction par macération dans le mélange glycérol/eau.....	47
I.2.Caractérisation du PC.....	47
I.2.1.Spectroscopie Ultraviolet-Visible.....	47
I.2.1.1.Mode opératoire.....	47
I.3. Formation des complexes d'inclusion.....	48
I.3.1. Formation d'un nouveau complexe entre la PC et la β -CD.....	48
I.3.1.1. Formation du complexe par mélange physique (PC: β -CD Mph).....	48
I.3.1.2. Formation du complexe par malaxage (PC: β -CD Kn).....	49
I.3.1.3. Formation du complexe par Micro-ondes (PC: β -CD Mw).....	50
I.3.1.4. Formation du complexe par Ultrasons (PC: β -CD Us).....	50
I.3.2. Formation d'un nouveau complexe entre la PC, la β -CD et la fibre.....	51
I.4. Etude de la stabilité PC en présence de β -cyclodextrine et la fibre.....	52
I.4.1. Effet de la température.....	52
I.4.2. Effet du pH sur la stabilité de PC.....	58
I.4.3. Effet de la lumière naturelle sur la stabilité de PC.....	61
I.4.4. Effet de la lumière forcée.....	62
I.5. Etude de l'activité Antioxydante.....	63

Sommaire

I.5.1. Présentation du test au DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyle).....	63
I.5.2.Mode opératoire.....	63
I.5.3. Calcul des pourcentages d'inhibitions.....	68
I.5.4. Calcul des concentrations efficaces IC50.....	69
I.6.Activité biologique.....	71
I.6.1. Présentation des souches bactériennes.....	71
I.6.1.1. Escherichia coli.....	71
I.6.1.2. Staphylococcus aureus.....	72
I.6.1.3.Pseudomonasaeruginosa.....	72
I.6.2.Mode opératoire.....	73
I.6.3.Lecture du résultat.....	74
I.6.4.Discussion.....	76
I.7.Conclusion.....	77
Références bibliographiques.....	79
Conclusion générale.....	81

Introduction

Générale

Les cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, compte parmi l'une des plus anciennes formes de vie sur terre et constitue l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse et production d'oxygène. Dans ce groupe, existe le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une bactérie particulièrement intéressante dénommée *Spirulina platensis* plus connue sous le nom de algues spiruline. Elle est riche en nutriments tels que protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux. La spiruline est consommée depuis des siècles par certains peuples d'Afrique et d'Amérique.

Elle peut être une solution, pour améliorer la santé et la nutrition humaine notamment pour lutter contre la malnutrition dans les pays du tiers monde. Dès lors, de grandes entreprises se sont mises à cultiver cet organisme à l'échelle industrielle. Au-delà des propriétés nutritionnelles, la spiruline connaît aujourd'hui un regain d'intérêt auprès de la communauté internationale en raison de son utilisation potentielle comme source de produits thérapeutiques pour le système immunitaire, le cancer et le sida, ainsi que ses effets dans la lutte contre le vieillissement cellulaire, le foie, les propriétés anti-inflammatoires. La spiruline semble avoir un potentiel énorme et cela grâce à son pigment principal, la PC, donne à cet organisme sa couleur bleu-vert distinctive. C'est le double aspect, nutritionnel et pharmacologique qui sera développé ici à partir d'une revue des principales publications scientifiques sur *spirulina platensis* [1].

Ces propriétés extraordinaires ont retenu notre attention alors nous l'avons trempé dans un mélange eau/glycérol (20/80) pour extraire son principal constituant et étudier ses propriétés. La partie bibliographique de notre travail se compose de deux chapitres, le premier chapitre décrit l'histoire, la taxonomie, la morphologie et la composition de spiruline. Alors que le deuxième chapitre rassemble une présentation sur l'or bleue (la phycocyanine), leurs propriétés et les différentes méthodes pour l'extraire, les différents paramètres qui influencent sa stabilité et on termine ce chapitre par les différentes activités thérapeutiques de PC. En revanche la partie pratique résume les différents résultats et discussion trouvés lors du suivi cinétique de la stabilité de PC seul, en présence de β -CD et en présence de la β -CD et la fibre proposée ensemble en fonction de différents paramètres (pH, température, lumière naturelle et lumière forcée). On termine cette étude par une conclusion générale résume l'essentiel de nos résultats.

Partie I :

Partie

théorique

Chapitre. I

Généralités sur la *Spiruline*

I.1. Généralité sur spiruline

La *Spiruline* est une cyanobactérie spiralée de couleur bleu-vert photo-autotrophe. C'est un organisme procaryote qui partage avec les plantes la capacité d'effectuer de la photosynthèse. À partir de composés minéraux, d'eau, et de l'énergie lumineuse captée grâce à leur chlorophylle, elles transforment le gaz carbonique et dégagent l'oxygène [1]. Il est admis par la communauté scientifique que l'apparition des cyanobactéries date de 3,5 milliards d'années, constituant ainsi les plus anciennes formes de vie sur terre.

Toutefois, de récentes études, combinant des données paléo biologiques et des comparaisons phylogénétiques, datent l'apparition de ces dernières à la fin de l'archéen, il y a 2,7 milliards d'années. Ce qui fait des cyanobactéries, les plus anciennes formes de vie sur terre [2]. À la période précambrienne (2,5- 0,5 milliards d'années), les cyanobactéries ont constitué l'essentiel de la biomasse et ont alors permis un accroissement du taux d'oxygène et une diminution du taux de CO₂ de l'atmosphère terrestre [2]. Elles constituent aussi le socle de la vie dans les océans puisqu'elles sont à l'origine de la grande diversité du phytoplancton. Elles résistent aux conditions les plus extrêmes notamment grâce à leur capacité à se rétracter en un agrégat de plusieurs milliers de filaments lorsque les conditions de température ou d'hydratation leurs sont défavorables, elles conservent au centre de leurs capsules un minimum d'humidité nécessaire à leur survie dans l'attente d'une amélioration des conditions extérieures : on parle alors d'état de dormance [3] (Figure.I.1)



Figure I.1. *Arthrospira platensis* : filament vu au microscope [3]

I.2. Historique

La *Spiruline* (*Arthrospira platensis*) est une des premières formes de vie sur la planète terre, n'en a pas moins suscité que tardivement l'intérêt des scientifiques. Ils ont été découverts par Christophe Colomb au Mexique en **1492**, sous forme de petits gâteaux verts séchés et consignés dans son journal. Puis il est venu Cortès, qui en ses mémoires décrit vers

1521 la façon dont les aztèques la récoltaient et consommaient. En **1930**, il a été découvert au Tchad par un pharmacien français issu des forces coloniales puis en **1940** par le botaniste français Dangerd [4] elle attira en **1959** l'attention de Prandelli, anthropologue et cinéaste, écrit un article sur la spiruline. À travers les âges, la *Spiruline* a été exploitée par une tribu africaine au Tchad (Kanimbos) et est encore consommée aujourd'hui sous le nom de Dihé [4]. En **1967** à Mexico, où des chercheurs de l'Institut Français du Pétrole rendent compte de leurs travaux sur la spiruline [5].

La première culture artisanale de Spiruline qui mérite vraiment ce nom remonte sans doute à [5] qui ont lancé cette activité en Inde en **1973**, en coopération avec Navsari Agricultural Collegen [5].

C'est l'origine de sa première exploitation industrielle, en **1976**, par la société mexicaine Sosa Texecoco. Actuelle ente, le nombre de ces fermes est d'une trentaine [5,6].

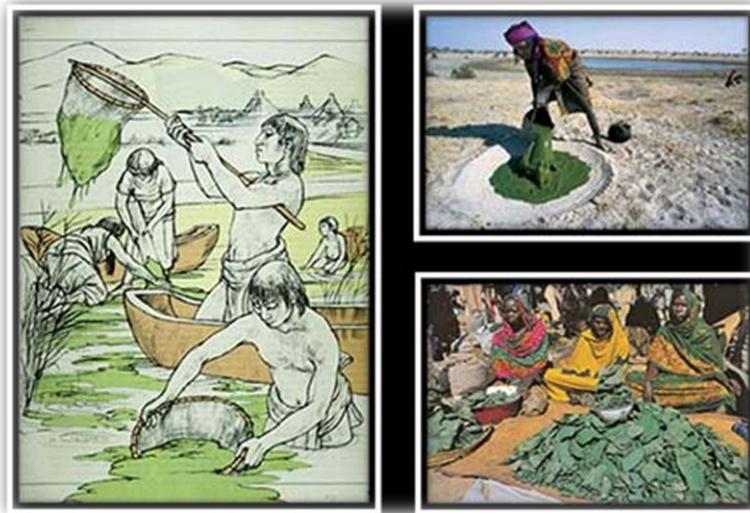


Figure.I.2 Récolte de la Spiruline[7]

I.3. Classification

La spiruline est apparue sur terre il y a environ trois milliards et demi d'années, et est donc, l'une des plus anciennes formes de vie photosynthétique [8].

La spiruline a été décrite pour la première fois par Wittrock et Nordsted en **1844** sous le nom de *Spirulina generiplantensis* Nordsted[9].

En 1960, une distinction a été faite entre les procaryotes et les eucaryotes. Cela dépend de la différenciation de l'organisation cellulaire. En **1962**, Stanier et ses collaborateurs découvrent que ces algues bleues ne possèdent pas de compartiments cellulaires. C'est donc l'un des procaryotes. Ils ont proposé d'appeler ces micro-organismes «cyanobactéries», avec

un préfixe d'origine grecque « cyano, cyan » du nom du pigment bleu PC qui les compose [10]. Cette nouvelle classification a été acceptée et est apparue pour la première fois dans le "Berg Handbook of Specific Bacteriology" en 1974 [9].

Tableau I.1. Classification de l'*Arthrospira platensis* [5]

Règne	<i>Monera</i> ou <i>Bacteria</i>
Sous-regna	<i>Prokaryota</i>
Phylum ou Division	<i>Cyanophyta</i> ou <i>Cyanobacteria</i>
Classe	<i>Cyanophyceae</i>
Ordre	<i>Oscillatoriales</i>
Famille	<i>Oscillatoriaceae</i>
Genre	<i>Arthrospira</i>
Espèce	<i>Platensis</i>

I.4. Taxonomie

En effet, dans la littérature, il existe des variations sur des termes tels que *spiruline*, *spirulina*, et *Arthrospira*. Ces confusions proviennent des décalages entre perception scientifique et le nom commercial de cette cyanobactérie [11]. La terminologie de la spiruline est assez confuse, le tableau ci-dessous détaille les remplissages possibles.

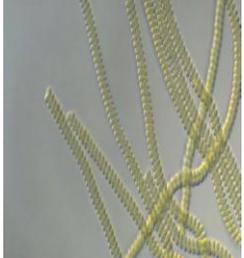
Tableau I. 2. Les diverses appellations de la *Spiruline* [8]

<i>Spiruline</i> [®]	Nom commercial d'une cyanobactérie appartenant toujours au genre <i>Arthrospira</i> .
<i>Spirulina</i> [®]	Nom commercial anglais de la même cyanobactérie. Nom scientifique et taxonomique d'une autre cyanobactérie fort éloignée des <i>Arthrospira</i> .
<i>Arthrospira</i>	Nom scientifique et taxonomique d'un groupe de cyanobactéries auxquelles appartient notre spiruline alimentaire.

La confusion entre les noms *Arthrospira* et *Spiruline* remonte à la décision d'unifier les genres *Arthrospira stizenberger* et *Spirulina* Turpin à base de trichomes hélicoïdal [12]. Cependant, la vraie spiruline n'appartient pas au genre *Arthrospira* [13].

Les organismes du genre *Arthrospira*, on le trouve généralement dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs saumâtres des régions tropical et subtropical [14].

Tableau I .3. Différences morphologiques entre le genre *Spirulina* et *Arthrospira* [1]

	<i>Arthrospira</i>	<i>Spirulina</i>
Trichomes	Hélice ouverte	Hélice presque fermée
Paroi cellulaire	Visible si les vacuoles à gaz ne sont pas trop nombreuses.	Difficilement visible (gaine non prononcée).
Taille et spécificité des cellules	6 à 12µm de large Possible constrictions entre cellules adjacentes.	2 à 4µm de large Peu ou pas de constrictions entre cellules adjacentes Forme non fixe
Mobilité	Rotation	Permanente par rotation
Reproduction	Scission simple : fragmentation du trichome en hormogonies à partir des cellules nécridiques Toutes les cellules se divisent sauf les cellules apicales	Scission simple : Fragmentation du trichome en hormogonies (sans les cellules nécridiques) Toutes les cellules se divisent
Représentation		
	Photo de <i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira platensis</i>)	Photo de <i>Spirulina subsala</i>

L'un des types de spiruline les plus populaires est *Spirulina platensis* est originaire d'Afrique et *Spirulina maxima* est originaire d'Amérique centrale. L'espèce qui nous intéresse dans ce mémoire est *Species platensis*, il est donc important de savoir les différencier (**Figure.I.3**).



Figure.I.3 *Spirulina maxima* et *Spirulina platensis* : Filaments de spiruline observés au microscope optique [1]

L'espèce mexicaine *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* a 7 trichomes, 70 à 80 µm de longueur et ils mesurent 7 à 9 µm de diamètre, se rétrécissent légèrement aux extrémités et forment une hélice Régulier de 3 à 8 spires et de 40 à 60 µm de diamètre. Cellules composées

de trichomes Ils mesurent de 5 à 7 micromètres de long et ne diminuent pas au niveau des articulations [1].

Les espèces de Chad *Spirulina (Arthrospira) platensis* sont constituées de trichomes. Il mesure 350 μm de long, 5 à 11 μm de diamètre et un peu étroit au niveau des joints. Constellations diamètre circulaire de 20 à 50 μm , légèrement effilé vers les extrémités [1] (Tableau.I.4).

Tableau.I.4. Résumé de plusieurs descriptions morphologique d'*Arthrospira platensis*[1]

Date	Lieu	Longueur des cellules μ	Diamètre Des cellules μ	Diamètre Des spires μ	Distance entre spires μ
1844	Uruguay	2 – 6	6 – 8	26 - 36	43 - 57
1893	Uruguay	2 – 6	6 – 8	26 - 36	43 - 57
1931	Kenya	3 – 10	6 – 11	36 - 60	15 - 45
1959	Uruguay	2 – 6	6 – 8	26 - 36	43 - 57
1967	Tchad	5	6 – 9	25 - 45	35 - 50
1980	Pérou	2.5*	7.8*	36*	95*
1984	Inde	4.5*	12*	99*	55*
1990	Mexique	3.2*	12.45*	52.3*	52*
1993	Pérou	2.4*	9.5*	33*	43*
1994	France (Camargue)	2.3*	11.6*	44*	109*
1994	Madagascar	3.8*	7.2*	12.2*	32.5*
1994	Californie	2.6*	6.1*	32*	65*
Moyennes		3.7	8.6	44	59.7

Note : La distance entre spires varie beaucoup selon l'intensité de la lumière. Sous éclairage de forte intensité, cette distance peut descendre à 10 μ ; sous faible éclairage, elle peut dépasser 100 μ .

(*) Valeurs moyennes.

I.5. Morphologie

La longueur moyenne de la spiruline est de 250 micromètres lorsqu'elle comporte 7 spires. Elles sont constituées de filaments mobiles (10 à 12 μm de diamètre) non ramifiés et enroulés en spirales, généralement en 6 ou 7 spires, qui ressemblent à un petit ressort hélicoïdal, d'où le nom de la spiruline [12].

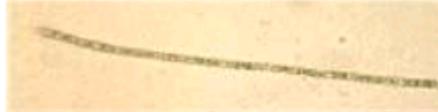
La question du nombre d'espèces de spiruline fait toujours débat parmi les scientifiques.

Il existe de nombreuses formes en spirale, ondulées et droites.

- les spiralées, désigne les races dont les filaments sont en forme de queue de cochon, comme *Lonar*.
- les ondulée, désigne les races dont les fils sont en spirale tendue, comme les *Paracas*.

- les "droites" désigne les souches dont les filaments sont tellement étirés qu'ils donnent l'impression d'être presque rectilignes telle le la variété M2[15].

Tableau I.5. Différentes souches de spiruline [15]

Forme spiralée (type <i>Lonar</i>)	
Forme ondulée (type <i>Paracas</i>)	
Forme droite (type M2)	

Ces différentes formes dépendent des conditions écologiques dans lesquelles vit la spiruline.

Une étude basée sur la caractérisation moléculaire de l'ITS (Internally Transcribed Espace) du facteur ARN ribosomique et de la diversité génétique associée dans 51^{ème} souches d'*Arthrospira* de 4 continents. À la conclusion que les génotypes sont très conservés et correspondent au plus à deux espèces génétiques [16].

I.6. Reproduction

La quantité de spiruline double en 4 jours, et elle croît de 25% chaque jour. La reproduction est végétative (asexuée) et s'effectue par bourgeonnement ou fragmentation aléatoire, par fission simple, fission binaire ou multiple.

Les trois étapes fondamentales de son cycle de vie sont:

- Fragmentation tricolore;
- Puis les cellules grossissent et le trichomate mûrit ;
- Il se divise en filaments par fission binaire, et ces filaments prennent la forme d'une spirale [17].

La vesse de reproduction est particulièrement rapide dès que la température dépasse 30°C à l'ombre ; Lorsque ces conditions sont réunies et que l'environnement est favorable, le temps de régénération est très court (7 heures) [18].

I.7. Cycle biologique

À maturité, le trichome forme des cellules spéciales appelées nocridies dans lesquelles le trichome se divise en plusieurs morceaux. Ces coupures donnent naissance à de courtes

chaînes (de 2 à 4 cellules) appelées hormones. Les hormones croissent en longueur par fission binaire (chaque cellule produira deux cellules par fission) et prennent la forme typique en spirale [19](figure I.4).

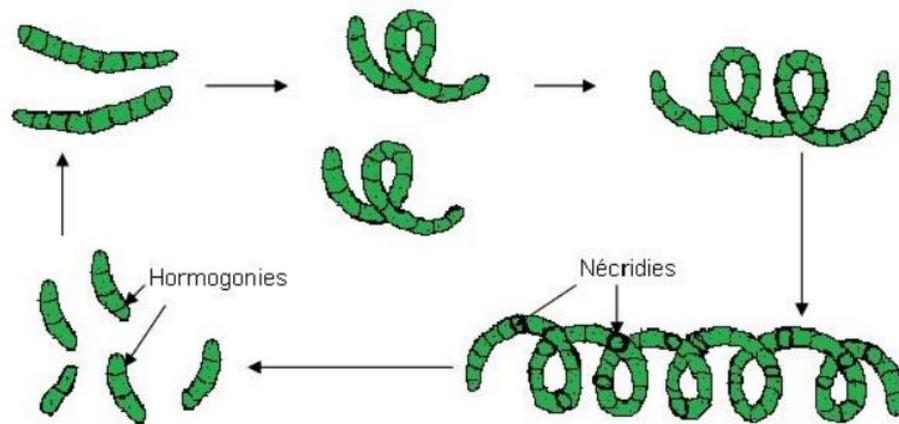


Figure I.4. Cycle biologique de la Spiruline [20]

I.8. Écologie

Le genre *Arthrospira* se distingue des autres cyanobactéries par le milieu naturel dans lequel il se développe. La spiruline se développe préférentiellement dans les eaux douces, chaudes, alcalines (pH 8-11,5) et minérales (nitrate, phosphate, fer) riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou en bicarbonate de sodium (NaHCO_3), on la trouve dans les lacs saumâtres des régions tropicales et subtropicales tropical. Ces lacs sont situés approximativement entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude sud (**Figure I.5**). Ainsi, on les trouve dans les lacs alcalins d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie du Sud. C'est certainement un organisme mondial mais moins abondant en Amérique du Nord et en Europe (**Tableau I.6**) [19].

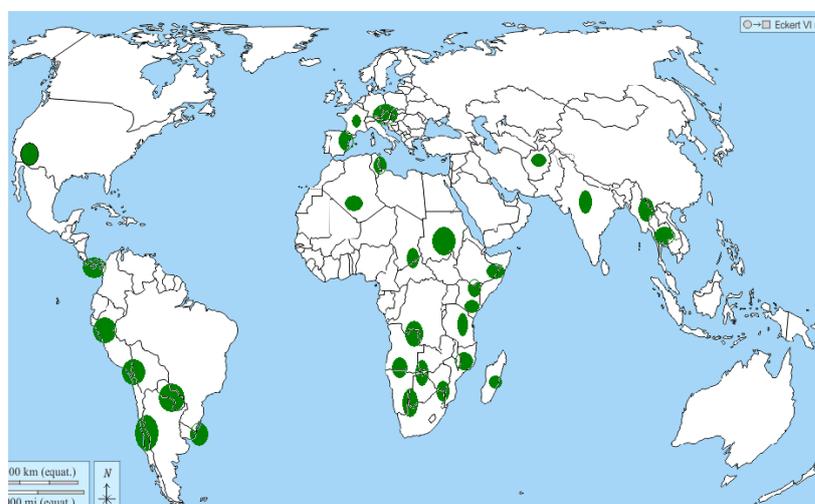


Figure I.5. Zone de croissance naturelle de la Spiruline dans le monde [5]

Tableau I .6. Distribution géographique naturelle de *Spirulina platensis* [1], [20]

Afrique	
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du Kanem : lacs Latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom, Ounianga kebir.
Soudan	Cratère de Djebel Marra
Djibouti	Lac Abber
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe
Congo	Mougounga
Kenya	Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron
Tanzanie	Lac Natron
Tunisie	Lac Tunis; Chott el Jerid
Zambie	Lac Bangweoulou
Madagascar	Beaucoup de petits lacs près de Toliara
Asie	
Inde	Lacs Lonar et Nagpur
Myanmar	Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank
Sri Lanka	Lac Beira
Pakistan	Mares près de Lahore
Thaïlande	Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de Radburi, 80 km au S.O. de Bangkok
Azerbaïdjan	non précisé
Amerique du Sud	
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas Près de l'île d'Amantani dans le lac Titicaca
Mexique	Lac Texcoco ; lac Cratère
Uruguay	Montevideo
Equateur	Lac Quiliotoa : cratère de 1km de diamètre
Amerique du Nord	
Californie	Oakland ; Del Mar Beach
Haïti	Lac Gonâve
République Dominicaine	Lac Enriquillo
Europe	
Hongrie	Non Précisé
France	Camargue
Autres sites possibles	
Partout où vivent le flamant nain, <i>Phoenicoparrus minor</i> (Afrique et Asie) et le flamant de James, <i>Phoenicoparrus jamesi</i> (Amérique du sud)	
Ethiopie	Lac Abiata
Kenya	Lac Rodolphe ; lac Hannington
Tanzanie	Lac Manyara ; lac Rukua
Zambie	Lac Mweru
Botswana	Makgadigka Salt Pans
Namibie	Etosha Salt Pan
Afrique du Sud	Etat libre d'Orange, près de Vaaldam
Bolivie	Lacs Colorado, Poopo, Chalviri, Salar de Uyuni
Chili	Aguas Calientes, Lagunas Brava, lac Vilama, Salar de Surire
Mauritanie	Côte sud
Inde	Rann of Kutch ; Gujarat
Madagascar	Côte Ouest

I.9. Facteurs influençant sur la croissance de la spiruline

I.9.1. Température

La température de l'environnement affecte directement la vitesse de croissance de la spiruline: bien qu'elle soit assez résistante au froid (jusqu'à 3°C à 5°C), la spiruline ne commence à pousser sensiblement qu'à des températures supérieures à 20°C. Le taux de croissance maximal est d'environ 35°C à 37°C. Une température supérieure à 44°C peut être fatale après quelques heures [3].

I.9.2. Lumière

La lumière est une source essentielle pour les organismes vivants qui effectuent la photosynthèse. Pour les microalgues, les zones plus ensoleillées seront plus propices à la culture des microalgues dont la spiruline. La lumière intense (plein soleil) peut être dangereuse si:

- une brusque illumination d'une culture froide (moins de 14°C à 15°C).
- une culture très chaude, (réchauffement).
- une culture très diluée (plus de 6 cm)

On réduit volontairement la luminosité en ombrageant si on veut ralentir la croissance de la spiruline, ou si on est dans un des trois états précédents [3].

I.9.3. pH

La spiruline pousse mieux à pH = 9 s'il est bas, la culture démarre mal, avec formation de mottes ou précipitation de spiruline au fond [5,6]. En revanche, si le nouveau milieu agit en complément d'une culture existante, le pH peut être de 8, ce qui permet de maintenir le pH de la culture suffisamment bas en ajoutant du bicarbonate.

I.9.4. Salinité

La spiruline peut être considérée comme une espèce à la fois halophile et très euryhaline, en milieu naturel les salinités tolérées vont de 8 PSU à 270 PSU. Les limites de la salinité et d'alcalinité permises sont assez larges, 13 g/litre pour la salinité et une alcalinité de 0,1 molécule-gramme/litre (b = 0,1) [6].

I.10. Composition chimique de spiruline

La composition de la spiruline varie selon les conditions de culture et la période de récolte, le mode de récolte origine géographique, broyage, séchage conditionnement, mais aussi par la luminosité moyenne du soleil et le fait que certains industriels complètent les environnements culture pour que la spiruline produite soit plus riche en fer, zinc ou acides gras en général [17]. En moyenne, la spiruline contient en poids sec jusqu'à **65 %** de

protéines, 15 % de glucides, jusqu'à 6% de lipides ,7% de minéraux , 2% de fibres, et 5% d'eau [3] (Figure I.6).

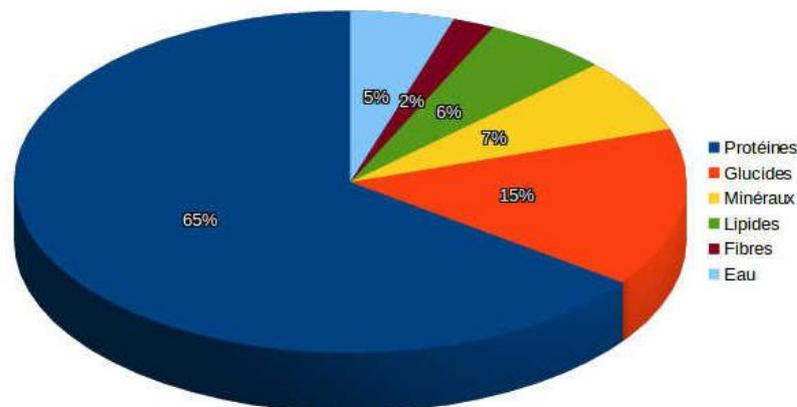


Figure I.6. Composition moyenne globale de la spiruline[7]

I.10.1. Protéines

La teneur en protéines *d'Arthrospira platensis* varie de 55 à 70 % en poids sec. La spiruline contient la plupart des acides aminés (Tableau.I.7) et en particulier tous les acides aminés essentiels, elle représente 60% du poids total des protéines. C'est l'aliment le plus riche en protéines connu à ce jour car il contient deux fois plus de soja et trois de plus que la viande ou le poisson [21].

Tableau I.7 : Composition en acides aminés de *Spirulina platensis*[21,22]

Acides aminés essentiels	%	Acides aminés non essentiels	%
Isoleucine	4.1	Alanine	5.8
Leucine	5.8	Arginine	6
Lysine	4	Acide aspartique	6.1
Méthionine	2.2	Cystine	0.7
Phénylalanine	4	Acide glutamique	8.9
Thréonine	4.1	Glycine	3.5
Tryptophane	1.1	Histidine	1.1
Valine	6	Proline	3
Tyrosine*	4.6	Sérine	4

*Acides aminés non essentiels

En plus de ces protéines, la spiruline contient également une grande proportion de protéines végétales de pigments de couleur impliquées dans la photosynthèse, classées en trois groupes: les phycoérythrine, les alluvocyanines et les PCs [23].

I.10.2. Lipides

Les matières grasses varient généralement 5 à 10% du poids sec de la spiruline. La composition des matières grasses totales se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés (AGPI). On retrouve 83% de la fraction saponifiée et 17% de la fraction non saponifiable dans les corps gras [19], [24].

I.10.3. Glucides

Comme vous le savez, les glucides sont une source essentielle d'énergie pour notre corps. Et les glucides contenus dans l'algue fournissent de l'énergie très rapidement à nos cellules sans fatiguer notre pancréas [25].

I.10.4. Vitamines

De nombreuses vitamines sont présentes dans la *Spiruline*, comme la vitamine A qui est connue pour ses vertus antioxydant, plusieurs vitamines du groupe B, notamment la B12 indispensable à notre métabolisme. Également présentent dans notre algue préférée : la vitamine E, qui aide à réduire le taux de cholestérol, et la vitamine K, qui fixe le calcium [26,27] (Tableau.I.8).

Tableau I.8. Analyse des vitamines de la *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » [26]

Biotine	250 mcg / kg
Vitamine B12	2000 mcg / kg
Acide pantothénique	8 mg / kg
Acide folique	610 mcg / kg
Inositol	830 mg /kg
Vitamine B3 (niacine)	146 mg /kg
Vitamine B6	7 mg / kg
Vitamine B2	35 mg / kg
Vitamine B1	21 mg / kg
Vitamine E	80 mg / kg
Vitamine D	120 000 UI / kg
Vitamine K	22 mg /kg

I.10.5. Minéraux

Parmi les minéraux que nous trouvons dans la *Spiruline* voici les plus importants : potassium, manganèse, sélénium, zinc, chrome, calcium, magnésium, sodium, phosphore et fer. Ce qui est intéressant avec cette algue c'est que sa structure cellulaire rend tous ces minéraux hautement assimilables. Il est donc d'autant plus efficaces de les consommés combinés à la spiruline plutôt que de les prendre séparément [5][22] (Tableau.I.9).

Tableau I.9. Analyse des minéraux de la *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » [22]

Calcium	8950 mg / kg
Phosphore	8940 mg / kg
Soufre	6900 mg / kg
Fer	980 mg / kg
Sodium	9000 mg / kg
Magnésium	3690 mg / kg
Manganèse	38 mg / kg
Cuivre	5 mg / kg
Zinc	30 mg / kg
Chrome	1 mg / kg
Potassium	16 000 mg / kg
Sélénium	140 mcg / kg
Cobalt	230 mcg / kg
Germanium	6000 mcg / kg

(mcg: Microgramme) $1\text{mcg} = 1\mu = 0.001\text{mg}$

I.10.6. Pigments

Trois pigments sont présents dans la *Spiruline* : la chlorophylle, qui lui donne sa couleur verte et qui participe à l'élimination des métaux lourds toxiques pour l'organisme. Les caroténoïdes, de couleur orangée qui sont connus pour protéger la peau des UV et qui aident aussi à lutter contre le vieillissement de la peau. Et enfin la phycocyanine, de couleur bleu, qui est un stimulant du système immunitaire [5] (**Tableau.I.10**).

Tableau I.10. Analyse des phytopigments naturels de la *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » [28,29]

Caroténoïdes	4 700 mg / kg
Chlorophylle	11 900 mg / kg
Phycocyanine	49 500 mg / kg

I.10.7. Enzymes

Les enzymes sont des protéines produites par le corps qui sont impliquées dans la catalyse de nombreuses réactions chimiques. Il en existe plusieurs dans la spiruline dont la plus importante est le superoxyde dismutase (SOD). C'est une enzyme au puissant pouvoir antioxydant qui participe à la défense de l'organisme contre les radicaux libres [25].

En revanche, la *Spiruline*, nous offre tous les éléments et substances indispensables à notre survie, qui constitue la source des substances vitales nécessaires à notre organisme. Les

différentes l'analyse des autres composantes de la *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » sont regroupées dans les tableaux ci-dessous.

Tableau I.11. Analyse des caroténoïdes naturels de la *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » [30]

Bêta-carotène	2 100 mg /kg
autres carotènes	400 mg / kg
Myxoxanthophylle	900 mg / kg
Zéaxantine	800 mg / kg
Cryptoxantine	100 mg / kg
Autres pigments xanthophylliens	400 mg / kg

Tableau I.12. Analyse des autres composantes de la *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » [31]

Acides nucléiques	4,5 %
Acide gamma linoléique	12 800 mg / kg
Acide linoléique	9 000 mg / kg
Activité D.O.S	D.O.S. 1 100 000 UI / kg
Glycolipides	20 000 mg / kg
Sulfolipides	1 000 mg / kg
Polysaccharides	46 000 chiffons / kg

I.11. Applications de la Spiruline

En 2005, Thajuddin, 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 [32]. De par sa composition, *Spirulina platensis* « *Arthrospira* » nous offre plusieurs propriétés bénéfiques et nombreuses domaines d'applications représentées comme suite :

- ✓ Domaine Agro-alimentaire [33];
 - ✗ Adjuvants de régime amaigrissant [34];
 - ✗ Utilisation de la *Spiruline* pour usage animal [35] ;
- ✓ Domaine de l'industrie cosmétique [36,37];
- ✓ Domaine de la santé [38-40].

- [1].WHO. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon; 1999.
- [2]. Bernard, Cécile (2014). Les cyanobactéries et leurs toxines. Revue Francophone des Laboratoires, 2014(460), 53–68.
- [3].Vonshak A. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology, and biotechnology*. London: Bristol, PA: Taylor & Francis; 1997.
- [4]. Farrar, W. V. (1966). Tecuitlatl; a glimpse of Aztec food technology.Nature.
- [5]. Fox, R. D. (1999). La spiruline: Technique, pratique et promesse. Edisud
- [6]. J.P. Jourdan (2015). Cultivez votre spiruline - manuel de culture artisanale.*Published by Aquatek .1-50*
- [7]. Bocar Kalidou M'BAYE, Baidy LÔ et Emmanuel Bassene. Etude quantitative de quelques pigments de la Spiruline cultivée en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle. Int. J. Biol. Chem. Sci. 5(5): 2035-2038
- [8]. Girardin-Andréani, C. (2005). Spiruline: système sanguin, système immunitaire et cancer. Phytothérapie, 3(4), 158-161.
- [9]. Vonshak A. *Spirulina platensis "Arthrospira": physiology, cell-biology, and biotechnology*. London: Bristol, PA: Taylor & Francis; 1997.
- [10]. George B, Pancha I, Desai C, Chokshi K, Paliwal C, Ghosh T and Mishra S, 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae Ankistrodesmus falcatus – A potential strain for bio-fuel production.Bioresour Technol. 2014; 171: 367– 374.
- [11]. Ciferri O., Tiboni O., Riccardi G., Sanangelantoni A. M., De Rossi E., Milano A., Di Pasquale G. (1993) Mutants, genes, and phylogeny of *Spirulina platensis*. Bull. Inst. Océanog.Monaco, n° spécial 12 : 25-29
- [12]. Geitler L. Cyanophyceae. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Reprinted 1971. p.1-1196.
- [13]. 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.
- [14] Castenholz R.W., Rippka R., Herdman M. and Wilmotte A. Form-genus I. *Arthrospira* Stizenberger 1852. D. R. Boone, R.W. Castenholz, eds.Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.NewYork, USA: Springer; 2001. 1. 542-543.

- [15]. Jarisoa T., 2005. Adaptation de spiruline du sud de Madagascar à la culture en eau de mer, Mise au point de structures de production à l'échelle villageoise. Thèse doctorat en Es Sciences en Océanologie Appliquée. Université de Toliara.
- [16]. wilmotte A., (2010). Diversifier ses pigments : la stratégie gagnante des Cyanobactéries. Sciences envies. 2010.
- [17]. Manet, A. (2016). La spiruline: indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine. Sciences pharmaceutiques.
- [18]. Zarrouk, C. (1966). Contribution à l'étude d'une Cyanophyceae. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina mixima*. Thesis. University of Paris, France.
- [19]. Charpy, L., Langlade, M. J., & Alliod, R. (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique. Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.
- [20]. Balloni W, Tomaselli L, Giovannetti L, Margheri MC (1980) Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: Materassi R (ed) Prospettive della Coltura Massiva di *Spirulina* in Italia. CNR Rome, 49–85.
- [21]. Merchant RE, Andre CA. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Alternative Therapies*. 2001;7.3: 79–92.
- [22]. Ahounou, M. N. (2018). La spiruline: un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation.
- [23]. Lupatini AL., Colla LM., Canan C., Colla E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *J Sci Food Agric* 2017;97:724–32.
- [24]. Colla, L. M., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V. (2004). Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(1-2), 55-59.
- [25]. Claudio Sili, Giuseppe Torzillo et Avigad Vonshak, « *Arthrospira (Spirulina)* », dans *Ecology of Cyanobacteria II*, Springer Netherlands, 2012, p. 677–705.
- [26]. Tang G, Suter PM. Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *J Pharm Nutr Sci*. 2011; 1: 111–118.
- [27]. Dagnelie PC., van Staveren WA., van den Berg H. Vitamin B-12 from algae appears not to be bioavailable. *Am J Clin Nutr* 1991;53:695–697.

- [28]. Danesi, E.D.G.; Rangel-Yagui, C.O.; Carvalho, J.C.M.; Sato, S. (2004). Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenergy*, 26, 329-335.
- [29]. PottecherF., (2014). Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications. Brevets WO 2014045177 A1.
- [30]. Terao J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*.1989; 24: 659-661.
- [31]. Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs A. (2002). Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*. 77: p. 9-13.
- [32]. Thajuddin, N. et Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. National Facility for Marine Cyanobacteria, Department of Microbiology. *Current Science*. Vol. 89 :1-10.
- [33]. Banakar, V., Alam, Q., Rajendra, S. V., Pandit, A., Cladius, A., & Gnanaprakash, K. (2020). *Spirulina*, The Boon of Nature. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 57-62.
- [34]. Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000). "Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future". *Ann NY Acad Sci.*, 899: 136-147.
- [35]. Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fish Aquac Circ*. 2008; 1034: 33.
- [36]. Anita I., Kalpana M. and Bhavanath J. (2006). Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 220–222.
- [37]. Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P., (2016). Phycobiliproteins: A new perspective in natural pigments derived from microalgae. *JOceanogrMarRes*, 4:114.
- [38]. Schwartz, J. et Shklar, G. (1988). Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina- dunaliella* algae. *Nutr Cancer*. 11:127-134.
- [39]. Strasky Z., Zemankova L., Nemeckova I., Rathouska J., Wong R.J., Muchova L., Subhanova I., Vanikova J., Vanova K., Vitek L., (2013). *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis, *FoodFunct.*, vol. 4, p. 1586-1594.
- [40]. Romay C., Armesto J., Ramirez D., González R., Ledon N. and García I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*.47(1): p. 36-4.

Chapitre. II

Généralités et rappels bibliographiques sur la Phycocyanine (PC)

II. Phycocyanine

La phycocyanine (PC), constituée de l'allophycocyanine et de la C-PC, est le pigment le plus noble de la spiruline, c'est lui qui donne sa couleur bleutée à la micro algue. Toutefois, de nombreux autres pigments sont également retrouvés dans la spiruline comme la chlorophylle ou les caroténoïdes. La nature a doté les végétaux de pigments pour leur permettre de se défendre contre les agressions extérieures. La PC est présente à hauteur de 22% dans les spirulines fraîches les plus riches [1], mais de nombreuses pertes sont à déplorer lors de la transformation en comprimés, granulés ou poudre. Le séchage de la spiruline à des fins de conservation entraîne la perte d'au moins 45% du pigment auquel s'ajoutent les pertes liées au conditionnement, au façonnage et au stockage. Une spiruline séchée peut donc présenter un taux de PC de 12% maximum qui s'abaisse à 8% après conditionnement [2]. Les marques qui affichent un taux bien supérieur prennent souvent en compte la totalité de la PC, celle active, comme celle dénaturée, rendue inactive par le séchage et les diverses manipulations. Ainsi, si la spiruline est un complément alimentaire intéressant, ce n'est pas pour sa teneur en PC mais plutôt pour sa richesse en nutriment.

II.1. Constituants fonctionnels principaux

II.1.1. Phycobilisome

Les phycobiliprotéines localisées (C-PC, APC, et PE) à la surface des thylakoïdes sont regroupées de manière superposée dans une même unité appelée phycobilisomes. Les pigments sont conçus de manière à améliorer la capture de la lumière et le transfert d'énergie [3]. Absorbant directement la lumière incidente, il participe à la chaîne de transfert d'énergie du phycobilisome [4]. Il est le composé principal, collecteur d'énergie lumineuse de l'appareil photosynthétique des cyanobactéries.

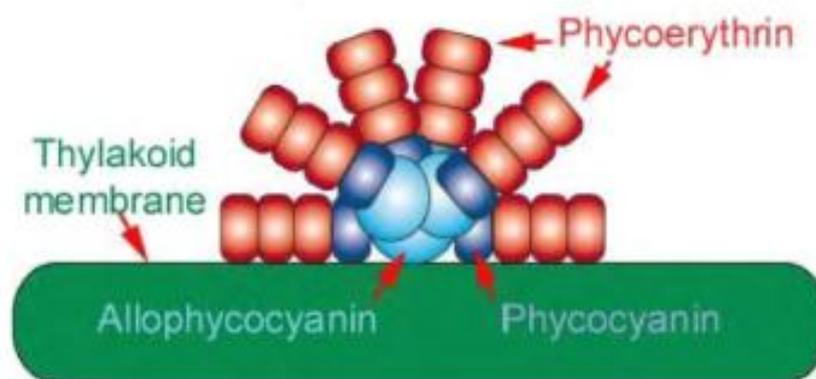


Figure II.1. Représentation schématique d'un phycobilisome classique [3]

II.1.2. Phycobiliprotéines

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 [5]. Les principaux chromophores décrits sont:

- La phycocyanobiline ;
- La phycoérythrobiline ;
- La phycourobiline ;
- La cryptovine.

Chacun d'eux possède un spectre d'absorption spécifique modifié par les interactions avec l'apoprotéine [5]. Les principales phycobiliprotéines sont:

- L'allophycocyanine (APC).
- Le phycocyanine (C-PC).
- Le phycoerythrine (R-PE et B-PE).
- Le phycoerythrocyanine (PEC).

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

Tableau II.1. Caractéristiques des principales phycobiliprotéines purifiées [5]

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

**Épaulement*

Le fragment protéique ou apoprotéique est constitué de deux sous-unités protéiques α et 15-20 kDa qui forment un hétérodimère également appelé monomère. Les chromophores des groupements phycobiline ou biline correspondent aux groupements prothétiques linéaires synchrones de type tétrapyrrole [3].

Ils sont classés selon leur structure moléculaire qui varie selon l'arrangement des doubles liaisons et leur confère des propriétés spectrales distinctes bien perçues par une absorption UV importante [3].

- 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 bleu absorbe dans le rouge [5].

Les phycobiliprotéines caractérisées par l'un de leur chromophore appelé accepteur terminal d'énergie.

- ✘ Pour les phycoérythrine, c'est toujours une phycoerythrobiline ;
- ✘ Pour la PC, la phycoerythrocyanine et l'allophycocyanine, ce chromophore est toujours une phycocyanobiline [5].

II.2. Présentation de la PC

Pigment bleu spécifique des cyanobactéries, il est responsable avec la chlorophylle de la couleur bleue verte caractéristique de la spiruline. Couramment utilisée dans l'industrie alimentaire et cosmétique en tant que colorant naturel en raison de sa couleur bleue, elle est aujourd'hui étudiée pour ses propriétés fonctionnelles et thérapeutiques. On estime que la spiruline est une excellente source de ce pigment puisque sa fraction protéique en contient 200g/kg [6] et représente 20% du poids sec de la spiruline [6]. Il s'agit d'une protéine complexe comprenant deux sous-unités α et β qui sont composées 162 et 172 acides aminés respectivement [6]. La publication de Liu et de ses collaborateurs portant sur les effets de la PC rapporte des effets antioxydant, anti-inflammatoire (*par un mécanisme d'action anti COX²*), antitumoral et immunostimulant.

La structure chimique de la PC se rapproche de celle de la bilirubine et la phycocyanobiline .

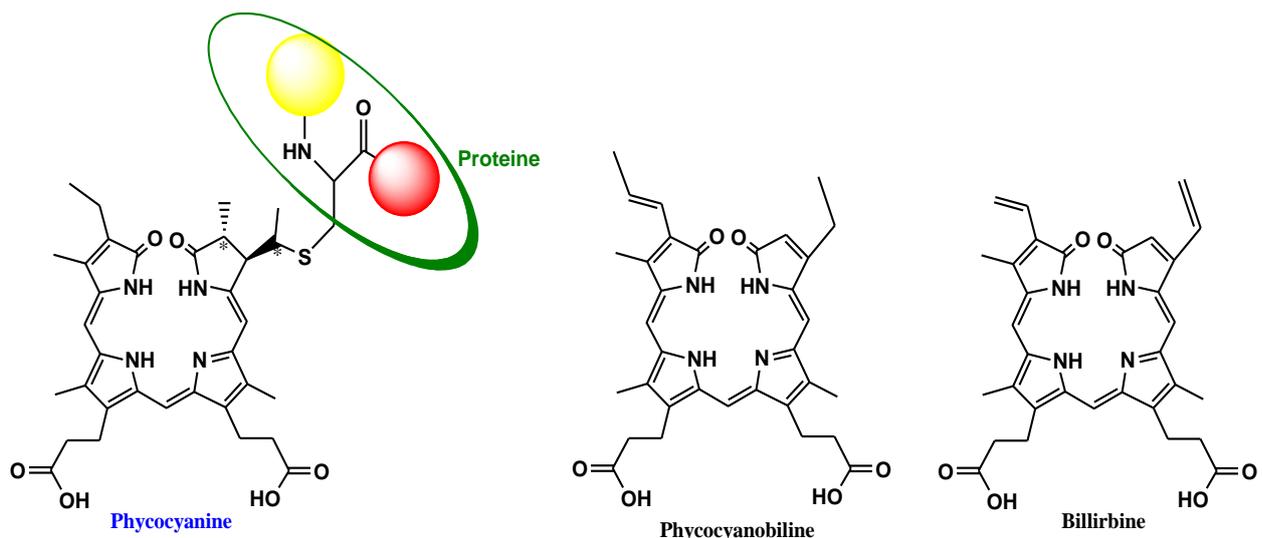


Figure II.2. Structures chimiques de la PC, de la phycocyanobiline et de la bilirubine [6]

II.3. Propriétés physico-chimiques de la PC

Les groupements prosthetiques de la PC 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 PC est de 37468,5 Da (détermination par ionisation par électrospray 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 attaches à la sous-unité α (α 84) et à la sous-unité β (β 84, β 155)[7].

La PC peut se retrouver sous forme de mélanges complexes d'agrégats en tant que trimère ($\alpha \beta$) 3, hexamère ($\alpha \beta$) 6 et dodécaèdre ($\alpha \beta$) 12. 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 PC chez *Spirulina platensis* est formée de l'association de deux hexamères qui se font face formant une unité asymétrique (**Figure II.2**). Au total sur cette unité asymétrique, 36 chromophores de phycocyanobiline sont liés par un pont thioether à la partie protéique [8,9].

La PC est le pigment le plus abondant de la spiruline représentant plus de 15 % de son poids [10]. Le spectre d'absorption de la PC montre une bande d'absorption forte à 615 nm et une seconde plus faible à 360 nm, ces deux bandes sont dues aux propriétés du chromophore biline. Ce groupe biline est constitué du noyau tétra-pyrrolique de la chlorophylle ouvert et sans magnésium. Ces propriétés d'absorption aussi bien que la fluorescence du chromophore augmentent en intensité lorsque les structures secondaire, tertiaire et quaternaire de la protéine sont dénaturées [3].

Constituant majeur du thylacoïde, l'hexamère de PC semble être le principal responsable des propriétés qui sont données à la spiruline. Il a donc fallu trouver des méthodes d'extraction pour pouvoir l'étudier de plus près [3].

II.4. Méthodes d'extraction de la PC

L'utilisation de la PC par l'industrie est encore limitée en raison des inconvénients des méthodes d'extraction et de la faible stabilité de ces composés après le processus d'extraction. Pour surmonter ces limitations, une alternative les méthodologies d'extraction ont été évaluées et des agents stabilisants ont été utilisés dans différentes conditions dans les années passés [11]. L'extraction de PC est principalement influencée par les paramètres physiques et chimiques suivants : température, pH, type de solvant, rapport biomasse/solvant et forme de la biomasse (séchée ou fraîche) [11].

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

II.4.1. Méthodes mécaniques

II.4.1.1. l'extraction par l'eau

Elle permet de briser les cellules fragiles avec un minimum de dommages, les cellules, incubées dans une solution hypotonique, cherchent à rétablir l'équilibre osmotique. L'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique. La biomasse de spiruline suspendue dans l'eau distillée permet l'extraction de la PC qui sera dosée par spectrophotométrie [12].

II.4.1.2. Extraction par congélation/ décongélation

La PC a été extraite par des étapes de congélation suivie d'une décongélation répétées des cellules, dans du tampon phosphate (50 Mm, pH 6,8). Les chercheurs ont également utilisé une autre méthode à savoir : l'homogénéisation dans un virtimixer à différentes vitesses. La biomasse humide récoltée mise en suspension dans du tampon phosphate a été soumise à 5, 10, 20 et 1000 tr/min pendant une durée d'intermittence de 10 minutes [13].

II.4.1.3. L'extraction par Homogénéisation des cellules

Le broyage se fait à l'aide d'un mortier et un pilon en présence de sable neutre lavé à l'acide tout en utilisant un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,8. L'extrait est ensuite centrifugé et le surnageant obtenu contient de la PC [14]. D'après les auteurs, cette méthode présente le meilleur rendement d'extraction comparée à la congélation/ décongélation.

II.4.1.4. Extraction par technique « Bead beating »

Le "Bead beating", également connu sous le nom de broyeur à perles, est une technique très simple de dégradation cellulaire. Cette technique consiste en une très forte agitation du milieu comprenant la solution de la microalgue à traiter, par ajout d'un solvant (à une concentration de 100 à 200 g/L) et perles de métal [15].

II.4.2. Méthodes chimique

II.4.2.1. Extraction par solvant

L'extraction de la PC a été évaluée en utilisant de l'eau distillée et une solution de CaCl₂ à 1 % [16]. La macération, en utilisant l'hexane, a été également utilisée [17]. Malheureusement ces solvants posent un problème crucial : l'hexane et l'éther de pétrole sont toxiques. L'éthanol permet l'extraction la plus efficace, mais pose de nombreux problèmes : toxicité et perte de l'activité antioxydante.

II.4.2.2.Extraction par acide

La biomasse humide est traitée avec différentes concentrations d'acide chlorhydrique (2, 4, 6, 8 et 10 N) à température ambiante. A différents intervalles de temps (2, 4, 24 h), les échantillons ont été centrifugés et les surnageants ont été collectés pour la quantification de la PC [13,14].

II.4.2.3.Extraction enzymatique

La rupture enzymatique de la paroi cellulaire a été réalisée en plaçant de la poudre de *Spirulina platensis* dans un bain agité à 30°C pendant 24h en présence de lysozyme. Des enzymes lytiques telles que la cellulase, la protéase, la pectinase, la xylanase, etc., peuvent être utilisées pour briser les parois de ces cellules [17].

Les méthodes d'extraction traditionnelles présentent plusieurs inconvénients [18], tels que:

- Un rendement faible :
- Une durée du traitement assez élevée ;
- Une consommation d'énergie élevée ;
- L'utilisation d'une grande quantité de solvants qui sont parfois toxiques.

Ainsi, une approche systémique et économique a été réalisée pour une extraction maximale des pigments par d'autres moyens innovateurs.

II.4.3. Méthodes innovatrices d'extraction

Diverses techniques ou « technologies innovatrices » sont actuellement proposées Il s'agit, essentiellement, de techniques telles que l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par champ électrique pulsé, l'extraction à haute pression, l'extraction par eau subcritique et enfin l'extraction par fluide supercritique. Ces nouvelles technologies font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches, à la fois fondamentales et appliquées. Si certaines d'entre elles ont même été développées à l'échelle industrielle, d'autres sont encore au stade du laboratoire. Des essais portant sur des tentatives d'introduction des techniques d'irradiation, et plus récemment des organismes génétiquement modifiés (OGM), ont échoué. De ce fait les industries alimentaires restent très prudentes vis-à-vis de l'introduction de ce type de technologies [18].

II.4.3.1. Extraction assistée par les ultrasons

Un ultrason est une vibration de même nature que le son, mais de fréquence supérieure à la plus haute fréquence audible pour un homme. Il existe en effet quatre types de sons

différents suivant une fréquence donnée. Ces vibrations sont produites dans la matière à une fréquence supérieure à 20 000 Hz (entre 20 et 100 kHz)[18]. Dans le domaine des microalgues, les ultrasons ont montré leur efficacité sur *Nannochloropsis sp* [18]. Concernant l'extraction des lipides,[14]ont étudié trois types de microalgues dont dépendent différentes méthodes de destruction. Testé (autoclave, perlage, micro-onde, choc osmotique et ultrason). L'échographie semble être la technique privilégiée pour obtenir le meilleur rendement gras.

II.4.3.2. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes ont la particularité de chauffer instantanément et notamment les molécules d'eau. Les cellules de microalgues étant constituées de 65-85 % d'eau, et suite à une exposition aux micro-ondes, la cellule est sujette à des contraintes importantes qui entraînent une déstructuration des cellules favorisant ainsi la libération des molécules d'intérêts. Le phénomène peut donc conduire à augmenter l'efficacité des procédures d'extraction de lipides des micro-algues [18]. Seule contrainte, les micro-ondes imposent de travailler à partir d'une biomasse humide. L'étude mis en évidence d'efficacité des micro-ondes par rapport à d'autres techniques (ultrasons, «Bead beating») sur différentes microalgues [19, 21]. Par ailleurs, avec le procédé micro-ondes, le temps d'extraction a été considérablement réduit (30 minutes pour les micro-ondes contre 10 heures pour le Soxhlet).

II.4.3.3. Extraction assistée par les hautes pressions

Le procédé des hautes pressions consiste à soumettre un produit alimentaire à des pressions comprises entre 100 et 800 MPa, à température ambiante ou inférieure à 50 °C. La durée de traitement est généralement comprise entre 5 et 30 minutes [18]. L'extraction des liquides pressurisés de la spiruline a été étudiée de manière intensive [22-24]. Pour l'extraction de la PC, [17] ont appliqué une pression hydrostatique de 5000 bars à 2 °C pendant 15 minutes. Le traitement sous haute pression a été effectué sur un sac plastique spécial scellé hermétiquement et contenant une suspension de poudre de *S. platensis* dans de l'eau distillée. Par la suite l'échantillon a été immergé dans de l'eau à 4 °C pendant 12 heures, suivie d'une filtration sous vide en utilisant du papier-filtre.

II.4.3.4. Extraction par des fluides supercritique

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le fluide à l'état supercritique. L'état supercritique d'un fluide est obtenu en menant le gaz au-dessus de sa température critique ou en comprimant le liquide au-delà de sa pression critique [25]. Le CO₂ est le fluide supercritique le plus utilisé car il présente des avantages notables: non toxique, non polluant, non inflammable [25]. Le CO₂ supercritique a été utilisé pour l'extraction de l'astaxantine à partir de *Haematococcus pluvialis* et la PC à partir de *Spirulina maxima*.

Également l'effet de la pression et de la température sur l'extraction supercritique des caroténoïdes a été intensément étudié [18].

II.4.3.5. Champs électriques pulsés

L'un des principaux avantages de l'utilisation du CEP pour l'extraction de PC à partir de la spiruline est que son application favorise une extraction sélective. CEP favorise probablement des changements sur la structure des trichomes, entraînant des lésions cellulaires et la libération de composés intracellulaires sans la désintégration de toute la structure cellulaire [11]. Ces effets sont liés aux pores formation qui provoquent progressivement la désintégration cellulaire, par rapport à méthodes de rupture mécanique des cellules. En conséquence, certains internes les composés migrent vers le milieu d'extraction tandis que d'autres sont retenus à l'intérieur de la structure cellulaire. En raison des caractéristiques du C-PC, l'extraction peut nécessiter l'élargissement des pores créés par le CEP. La taille des pores dépend de l'intensité du CEP, de la température, du temps et de l'agitation les conditions [11]. Le tableau ci-dessous regroupe les avantages et les inconvénients des méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines.

Tableau II.2. Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines[18]

Méthodes d'extraction	Biomasse	Avantages	Limite
Congélation/décongélation	Fraîche et sèche	Simple, rapide (10-12h), reproductible, ne dépend pas de la qualité de biomasse, pas de corrosion du matériel, n'affecte pas la qualité biologique des protéines douce et non dénaturante.	Difficile à réaliser à l'échelle industrielle
Sonication	Fraîche et sèche	Grande productivité à petite échelle.	Difficile à réaliser à l'échelle industrielle Utilise une forte fréquence (20 à 50 kHz)
Chromatographie échangeuse d'ion	Fraîche et sèche	Utiliser pour une purification élevée des phycobiliprotéines	Difficile à réaliser à l'échelle industrielle
Homogénéisation (mortier et pilon)	Fraîche	Rapide (10 à 12h).	Risque de contamination
Extraction à l'eau	Fraîche	Non toxique	Très lente
Extraction à l'acide	Fraîche	L'extraction d'acide serait utile pour l'extraction directe du pigment phycocyanobiline à partir de la PC.	Dénaturation des phycobiliprotéines

II.5. Stabilité de PC

La structure de PC consiste en une chaîne ouverte chromophore tétrapyrrole (phycobiline) lié de manière covalente à une protéine molécules. Les modifications de la structure du chromophore favorisent la décoloration et les pertes d'activité antioxydante. Par conséquent, les composés qui réagissent avec la structure tétrapyrrole, comme l'oxygène, les radicaux libres et les acides, favorise la dégradation de PC. Ces réactions se produisent plus rapidement à des températures élevées et sous exposition lumineuse [18].

La structure des protéines est hautement responsable de la stabilité du PC, favorisant un effet protecteur sur le chromophore. Ainsi, tout facteur affectant la stabilité et la structure des protéines peuvent empêcher ou accélérer la dégradation de PC [18]. Lorsque la dénaturation des protéines se produit, la réduction de la liaison hydrogène réseau conduit au réarrangement des molécules de phycobiline à partir de la conformation cyclique, entraînant des pertes de couleur [26]. Par conséquent, les principaux paramètres qui affectent la stabilité de PC sont pH, température et lumière. PC est plus stable à pH variant de 5 à 7,5 une fois la forme hexamérique prédomine dans cette plage de pH. Près du point isoélectrique de protéines, l'aggrégation et la précipitation se produisent, favorisant la turbidité, la couleur évanouissement et pertes de contenu PC [13].

La température est également un facteur critique pour la stabilité du PC. Les taux de dégradation du PC sont augmentés à des températures supérieures à 50°C, ont démontré que la dégradation du PC les taux était plus faible à 26 - 43°C (pH 5-7) et augmentaient lorsque les pigments ont été chauffés de 47 à 64°C [27]. La couleur s'estompe à plus haut les températures ont été attribuées à la précipitation des protéines. À des températures plus basses, PC est relativement stable. Cependant, à température ambiante, des pertes de 20 % ont été signalées après 10 jours d'incubation. En ce qui concerne l'exposition à la lumière, le PC est plus sensible aux effets photochimiques dégradation à pH = 7 de 5. Sous exposition à une lumière intense ($3 \cdot 10^5$ Lux) pendant 24 h, des pertes d'environ 80 % ont été observées à pH 7 et d'environ 65 % à pH 5. Dans les deux conditions, un précipité a été observé, indiquant que la dénaturation de la protéine [28]. Même une courte exposition à la lumière LED aux pertes de couleur : exposition à la lumière jaune, blanche, UV-A et UV-B pendant 5 h induit jusqu'à 13% de pertes PC [29] (Tableau II.3).

Tableau II.3. Paramètres qui influencent la stabilité de la PC (pH, température et lumière)[11]

Paramètre	Plage de paramètres Temps	Optimum range	Principaux résultats	Référence
pH	6,0– 8,0 (tampon phosphate) 4 jours	pH 6.0 - 6.5	Le pH optimal pour l'extraction PC (7,5) était différent du pH optimal pour la stabilité. À température ambiante, pH supérieur à 6,5, la couleur a chuté de façon spectaculaire	[30]
T	30 à 90°C 75 min	Jusqu'à 50°C	À des températures supérieures à 50 °C, la concentration de C-PC considérablement diminué.	[31]
T et pH	50, 60, 70, 80 ±1 °C 5,0, 7,0 et 9,0 (tampon phosphate) 30 minutes	pH 5.0 et 7.0, à T 50°C pH 9.0, à T 40°C	Le PC purifié est légèrement plus stable en milieu acide (pH 5, Température de fusion de 61,8°C) plutôt que dans des conditions neutres ou alcalines (pH= 9, température de fusion de 49,9°C).	[32]
Lumière	Lumière blanche et jaune, UV-A et Rayonnement UV-B jusqu'à 5 h	Ténèbres	Une dégradation de 5,7, 6,3, 8,9 et 12,7 % s'est produite après 5 h sous lumière, lumière blanche, rayonnement UV-A et UV-B, respectivement.	[29]
Glucose et saccharose et chlorure de sodium	0, 2,5, 5, 10, 20 et 40 % (p/v)	pH 7.0; 60°C; 15 min	20 à 40 % du glucose ou du saccharose ont augmenté la demi-vie du PC à partir de 19 min à 30-44 min, tout en utilisant du chlorure de sodium à 2,5 %, il a été portée à 67 min. Le sucre et le sel ont pu enrober surface PC, protégeant le chromophore.	[33]
Glucose, saccharose et fructose	10 et 15 % (p/p)	pH 6,0; 40, 60 et 80°C ; 60 minutes	Sans aucun ajout de sucre, la teneur en PC de manière significative diminué. La stabilité de PC a été affectée par l'interaction sucre-protéine via une liaison glycosidique, empêchant réactions de dégradation. À 60°C, 10 et 15% de glucose PC stabilisé, conservant jusqu'à 54% de la teneur en pigment.	[34]

Application du PC dans les formulations alimentaires est limitée en raison de sa sensibilité aux acides, à la chaleur et à la lumière. Pour surmonter ces problèmes, les agents stabilisants ont été évalués pour protéger la molécule PC. Parmi eux, de petits saccharides ont montré une contribution positive, en maintenant les protéines natives structure et couleur PC [35]. Le type de sucre et la concentration influencent la stabilité du PC. L'ajout de saccharose (20%, *p/p*) et de glucose (20%, *p/p*) a été considéré comme approprié pour prolonger la stabilité des extraits de PC [36]. Le saccharose (20%, *p/p*) a eu un effet plus positif que le tréhalose à la même concentration. Lorsque l'on compare différentes concentrations de saccharose, 70% ont favorisé un meilleur effet protecteur que 20% [35]. Certaines études ont montré que l'ajout de polysaccharides contribue à augmenter la viscosité du milieu, ne convenant pas à des concentrations élevées selon l'application.

D'autres auteurs ont suggéré l'utilisation de protéines pour protéger la structure PC à des valeurs de pH faibles dans le cadre de la transformation des aliments [37]. L'azotate de sodium et le dithiothreitol sont couramment utilisés comme conservateurs pour la PC à des fins analytiques, mais ils sont toxiques et ne peuvent donc pas être utilisés pour la production de PC de qualité alimentaire [18]. Du fait que la PC sous forme aqueuse se dégrade rapidement en cas de contamination bactérienne. Elle doit donc être conservée sous forme stérile ou au froid (congélation) [18].

L'huile essentielle de *Ravintsara (Cinnomomum camphora)* retarde le développement bactérien tout en restant compatible avec un usage alimentaire, mais ce traitement ne convient que pour une préservation à court terme de la PC car les développements bactériens sont freinés mais pas annihilés. Il n'est pas possible non plus d'acidifier fortement le milieu pour empêcher le développement de bactéries car la PC est très sensible au pH et toute variation importante entraîne une précipitation des molécules. La PC devient instable et précipite en dessous de pH = 5 et au-delà de pH = 7.5 [18][38].

II.6. Activités thérapeutiques de la PC

La littérature a montré que la PC joue un rôle bénéfique pour la santé humaine grâce à ses propriétés pharmacologiques et biologiques potentielles. Illustrés dans des crèmes de beauté en jouant un rôle dans la stimulation de la synthèse de collagène, ces pigments peuvent avoir des applications dans l'industrie cosmétique [18]. Au repos, la PC a une couleur bleue et est pourvue d'une fluorescence rouge. Elle présente une absorption maximum à 620 nm et une radiation d'émission à 635 nm. Cette qualité en fait un produit fluorescent naturel qui est un marqueur de choix dans les diagnostics biomédicaux [52, 37] (Figure .II.3).

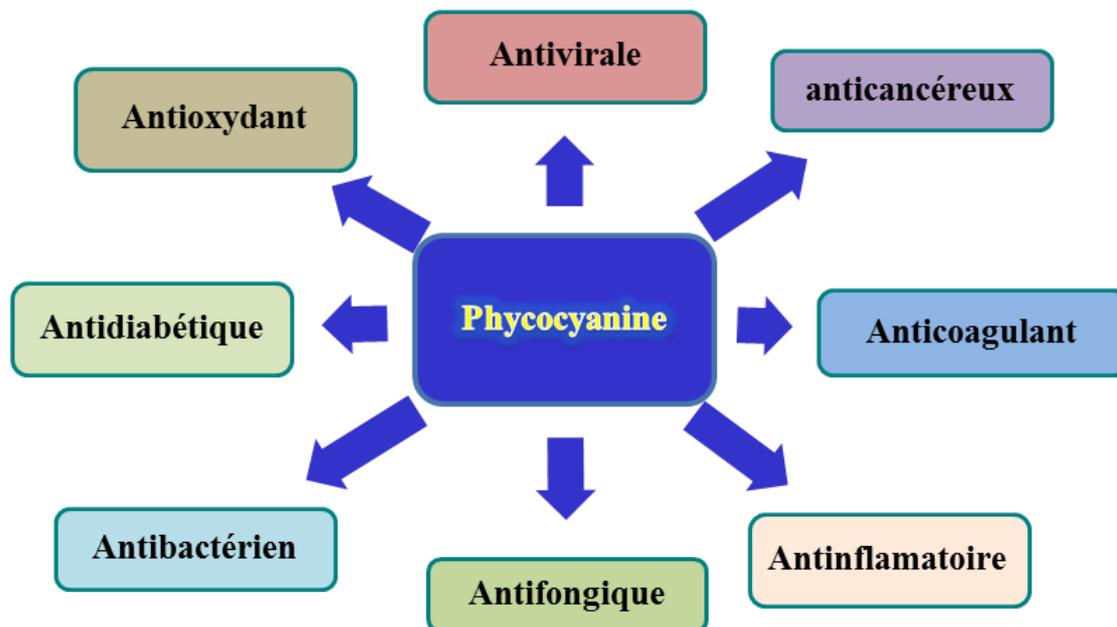


Figure II.3. Bienfaits thérapeutiques de la *Spiruline*

II.6.1. Activité antibactérienne

Certaines études préliminaires in vitro d'extraits de spiruline sur certaines bactéries pathogènes (*E. coli* et *S. aureus*) ont observé un effet antimicrobien efficace [39]. Ce résultat indique que les cyanobactéries possèdent un mécanisme de défense pour combattre les bactéries pathogènes et donc la possibilité de développer une plante antibiotique à base d'agent antimicrobien, sûr avec moins d'effets secondaires qui peuvent remplacer les médicaments synthétiques. Les résultats de différents extraits de spiruline sur différentes bactéries n'ont pas encore permis d'identifier une substance antibactérienne spécifique mais le spectre d'actions servirait de support pour démontrer le potentiel de cette activité sur certains microbes pathogènes[39].

II.6.2. Activité anti-inflammatoire

Il est bien établi que la génération des ROS peut initier et engendrer des cascades inflammatoires, provoquant des lésions au niveau du foie, des reins, du cœur, etc... Plusieurs études ont montré le pouvoir de la PC dans l'atténuation du processus inflammatoire in vivo et in vitro [40]. Plusieurs études ont montré que la PC inhibe les réactions inflammatoires, selon différentes voies. Les voies, les plus répandues, sont l'inhibition de l'expression de certaines enzymes impliquées dans le processus inflammatoire, telle que la cyclooxygénase-2 (COX²), l'oxyde nitrique synthétase, la myéloperoxydase, ...etc.[40].

II.6.3. Activité antioxydant

Le déséquilibre entre les systèmes antioxydants et la production de dérivés réactifs à l'oxygène est appelé « stress oxydatif ». Ce dernier peut être à l'origine de diverses maladies, notamment, l'athérosclérose, le cancer, le diabète, les maladies inflammatoires, ainsi que le processus de vieillissement. En 1998, l'activité antioxydante de la PC a été décrite, pour la première fois, par Romay et coll [41].

La PC serait capable de piéger plusieurs radicaux libres, incluant l'hydroxyle (OH^\bullet), le radical alcoyle (RO^\bullet) et l'anion superoxyde (O_2^\bullet), l'acide hypochloreux (HOCl), le radical peroxy (ROO^\bullet), le peroxy-nitrite (ONOO^-) ainsi que l'oxyde nitrique (NON^\bullet) [40].

Tableau II.4. Propriétés pharmacologiques et biologiques des PCs [18]

Espèce de micro algue étudiée	Propriété physiologique	Références
<i>Spirulina platensis</i> , <i>Aphanizomenon flos aquae</i>	Antioxydante	[42]
<i>Spirulina platensis</i> ; <i>Arthrospira maxima</i>	Anti inflammatoire	[42, 43]
<i>Spirulina platensis</i>	Neuroprotective	[43]
<i>Spirulina platensis</i>	Néphroprotectrice	[44]
<i>Arthonema africanum</i> (Cyanophyceae)	Anti tumorale, Anti cancer	[45]
<i>Spirulina platensis</i>	Anti radicalaire	[46]
<i>Spirulina platensis</i>	Anti cataractogène	[47]
<i>Spirulina platensis</i>	Anti diabétique	[48]
<i>Spirulina platensis</i>	Immunomodulatrice	[42]
<i>Spirulina platensis</i>	Cicatrisante des plaies	[49]
<i>Spirulina platensis</i>	Atheroprotective	[50]
<i>Spirulina</i>	Hepatoprotective	[51]
<i>Spirulina platensis</i>	Anti hyperalgique	[52]
<i>Spirulina platensis</i> (<i>Arthrospira</i>)	Antivirale	[53]
<i>Spirulina platensis</i>	Antifongique	[53]
<i>Spirulina platensis</i>	Cosmétique	[54]
<i>Spirulina platensis</i> (<i>Arthrospira</i>)	Anticoagulant	[55]
<i>Spirulina platensis</i> (<i>Arthrospira</i>)	Antibactérien	[39][48,49]

II.7. Intérêt de l'extraction de la PC

La PC est une molécule de grand intérêt notamment en raison de ses propriétés bénéfiques pour la santé humaine (Tableau.II.4). Elle est consommée notamment pour ses propriétés antioxydantes et aussi pour sa capacité à favoriser la production de cellules souches [38]. La forte teneur de ce pigment a un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique. La production de la C-PC dépend de plusieurs paramètres à savoir : la souche de spiruline, l'intensité de l'éclairage, la composition du milieu de culture...etc. Selon Walter et coll l'utilisation d'une lumière rouge pour l'éclairage de la culture à la place d'une lumière ordinaire augmente la teneur et la pureté de C-PC [56]. Il existe des spirulines de haute qualité

particulièrement riche en PC (environ 20 % du poids sec au lieu de 10 à 11 % qui représente la teneur minimale dans la spiruline de base) [57].

II.8. Utilisations de la PC

Les multiples utilisations de la PC, nous a incités à approfondir la connaissance des meilleurs moyens d'obtention de cette molécule bioactive. Nous pouvons citer par exemple [58]:

- ✓ Sorbets ;
- ✓ Sucettes glacées ;
- ✓ Bonbons ;
- ✓ Boissons sans alcool ;
- ✓ Gelées ;
- ✓ Produits laitiers.

- [1] Todd Lorenz. (1999). Spirulina Technical Bulletin (Cyano tech) Quantitative analysis of C-phycoyanin from spirulina pacifica.
- [2] Yoshikawa N. et Belay A. Single-Laboratory Validation of a Method for the Determination of c-Phycocyanin and allophycocyanin in *Spirulina (Arthrospira)* Supplements and Raw Materials by Spectrophotometry journal of AOAC international vol. 91,3, 2008
- [3]. Patil G.,Raghavarao K.S.M.S., (2007). Aqueous two-phase extraction for purification of C-phycoyanin.Biochem Eng J.,vol. 34, p. 156.
- [4]. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y ., Jing K., (2006). Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent.Biochem. Eng. J., vol. 109, P. 282-296.
- [5].Lafri, I. Optimisation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline HTAM (Doctoral dissertation, Université Blida1-Saad Dahlab).
- [6].Ahounou, M. N. (2018). La spiruline: un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation.
- [7]. 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.
- [8]. Jensen GS., Drapeau C., Lenninger M., Benson KF. (2016). Clinical Safety of a High Dose of Phycocyanin-Enriched Aqueous Extract from *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study with a Focus on Anticoagulant Activity and Platelet Activation. *J Med Food* . 19:645–53.
- [9]. Wu Q., Liu L., Miron A., Klímová B., Wan D., Kuča K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Arch Toxicol* 2016;90:1817–1840.
- [10].Wang X-Q., Li L-N., Chang W-R. Zhang J-P., Gui L-L., Gua B-J., Liang D-C. (2001). Structure of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* at 2.2Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. *Acta Crystallographica*, 57: 784-792.
- [11].Jaeschke, D. P., Teixeira, I. R., Marczak, L. D. F., Mercali, G. D. (2021). Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, 110314-110329.
- [12]. Siegelman, H. W., Kycia, J. H. (1978). Algal biliproteins.–In: Hellebust, JA and JS Craigie,(eds.), *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press. Cambridge, London, New York, Melbourne, 528-537.

- [13]. Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G., Ravishankar, G. A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process biochemistry*, 34(8), 795-801.
- [14].Prabakaran P., Ravindran A.D.(2013). Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Pharma Research Library. Int. J. Res. Pharm. Life Sci*, 1(1): 15-20.
- [15].Mercer P., Armenta R.E., (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113,539-547.
- [16]. Prabuthas P., Majumdar S., Srivastav P.P., Mishra H.N., (2011). Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2(5): 93-96.
- [17]. Seo Y. C., Choi W.S., Park J.H., Park J.O., Jung K-H.,Lee H.Y., (2013). Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 1778-1787.
- [18]. Aouir, A. (2017). Extraction des composés bioactifs de la *spiruline* par le champ électrique pulsé (Doctoral dissertation, ENSA).
- [19]. Luque-Garcia J.L., De Castro M.L., (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1):41-47.
- [20]. Lee J.Y., Yoo C., Jun S.Y., Ahn C.Y., Oh H.M., (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101, 75-77.
- [21]. Balasubramanian S., Allen J.D., Kanitkar A., Boldor D. (2011). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system--design, optimization, and quality characterization. *Bioresour Technol*, 102(3):3396-3403.
- [22]. Plaza M., Avalo B., Cifuentes A Ibanez E. (2008). Pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction of functional ingredients from *Chlorella vulgaris*. *Chemical characterization using HPLC-DAD and GC-MS*.
- [23]. Shang Y.F., Kim S.M., Lee W.J. Um B.H., (2011). Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (kjellman) setchell. *J Biosci Bioeng*.111, 237-241
- [24]. Koo S.Y., Cha K.H., Song D.G., Chung D., Pan C.H. (2012). Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *chlorella ellipsoidea*. *J Appl Phyc*. 24, 725-730.

- [25]. Marzorati, S.; Schievano, A.; Idà, A.; Verotta, L. (2020). Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: supercritical CO₂ and water extraction methods for added value products cascade. *Green Chem*, 22, 187-196.
- [26]. Berns, D.S., MacColl, R. (1989). Phycocyanin in physical–chemical studies. *Chemical Reviews*, 89(4), 807–825.
- [27]. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659–664..
- [28]. Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2005). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 261–266.
- [29]. Munawaroh, H. S. H., Gumilar, G. G., Alifia, C. R., Marthania, M., Stellasary, B., Yuliani, G., Show, P.-L. (2020). Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. *Process Biochemistry*, 94, 297–304.
- [30]. Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M., Abbaspourrad, A. (2020). Extraction of phycocyanin A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing.1-9
- [31]. Chentir, I., Hamdi, M., Li, S., Doumandji, A., Markou, G., & Nasri, M. (2018). Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. *Algal Research*, 35, 395–406.
- [32]. Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49(1), 154–159.
- [33]. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, 102(14), 7159–7164.
- [34]. Hadiyanto, Christwardana, M., Sutanto, H., Suzery, M., Amelia, D., & Aritonang, R. F. (2018). Kinetic study on the effects of sugar addition on the thermal degradation of phycocyanin from *Spirulina* sp. *Food Bioscience*, 22, 85–90.
- [35]. Faieta, M., Neri, L., Sacchetti, G., Di Michele, A., & Pittia, P. (2020). Role of saccharides on thermal stability of phycocyanin in aqueous solutions. *Food Research International*, 132, 109093-109100.
- [36]. Stanic-Vucinic, D., Minic, S., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. C. (2018). *Spirulina* Phycobiliproteins as Food Components and Complements. In *Microalgal Biotechnology*. InTech..

- [37]. Pan-utai, W., Kahapana, W., & Iamtham, S. (2018). Extraction of C-phycoyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) and its thermal stability with citric acid. In *Journal of Applied Phycology*, Springer Netherlands.30, 231–242.
- [38]. Pottecher F. (2014). Procédé d'extraction et de stabilisation de phycoyanine et ses applications. Brevets WO 2014045177 A1.
- [39]. Kaushik P., Chauhan A. (2008). In vitro Antibacterial Activity of Laboratory Grown Culture of *Spirulina platensis*. *Indian J. Microbiol.* 48 :348–352.
- [40]. Imene Chentir., Moncef Nasri. (2020). Structure unique, fonctionnalités multiples: La phycoyanine en biotechnologie. *Nutrition et Santé*, 9(1), 28-42.
- [41]. Durackova Z. (2010).Some current insights into oxidati-ve stress. *Physio Res* 59:459-69.
- [42].Chen H.W., Yangb T.S., Chena M.J., Chang Y.C.(2014), Purification and immunomodulating activity of C-phycoyanin from *Spirulinaplantensis* cultured using power plant flue gas. *ProcessBiochemistry*, 49, 1337-1344.
- [43].Penton-Rol G., Marin-Prida J., Pardo-Andreu G., Martinez-Sanchez G., Acosta-Medina E.F., Valdivia-Acosta A., Lagumersindez-Denis N., Rodriguez-Jimenez E., Llopiz-Arzuaga A., Lopez-Saura P.A., (2011). C-Phycoyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils, *BrainRes.Bull.*86, 42-52.
- [44].Rodríguez-Salgueiro S., Ramírez-Carmenate Z, González-Núñez L.(2017). An update on potential applications of *Spirulina sp.* and C-phycoyanin to treat kidney diseases. *AnnResAntioxid*,2(1):1-7.
- [45].Gardeva E.G., Toshkova R.A., Yossifova L.S., Minkova K., Ivanova N.Y., Gigova L.G., (2014). Antitumor activity of C-phycoyanin from *Arthronemafricanum* (Cyanophyceae). *Brazilian Archive sof Biology and Technology*.57,675-684.
- [46].Shalaby E.A., Shanab S.M.M., (2013). Antiradical and antioxidant activities of different *Spirulinaplantensis* extracts against DPPH and ABTS radical assays. *J Mar Biol Oceanogr*, 2(1):1-8.
- [47]. Kumari R.P., Sivakumar J., Thankappan B., Anbarasu K., (2013). C-phycoyanin modulates selenite-induced cataractogenesis in rats. *Biological Trace Element Research*, 151(1):59-67.
- [48].Ou Y., Lin L., Yang X., Pan Q., Cheng X., (2013). Antidiabetic potential of phycoyanin: Effects on KKAY mice. *PharmBiol*, 51(5):539-44.
- [49].Gur C.S., Erdogan D.K., Onbasilar I., Atilla P., Cakar N., Gurhan I.D., (2013). In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude *Spirulina* extract and C-phycoyanin. *J.MedicinalPlantsRes*,7, 425-433.

- [50]. Straský Z., Zemanková L., Nemecková I., Rathouská J., Wong R.J., Muchová L., Subhanová I., Vaníková J., Vanová K., Vitek L. (2013). *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis, *Food Funct*, 4, 1586-1594.
- [51]. Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V., (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci*, 4, 207-216.
- [52]. Shih C.M., Cheng S.N., Wong C.S., Kuo Y.L., Chou T.C., (2009). Anti inflammatory and anti hyperalgesic activity of C-phycocyanin, *Anesth. Analg.*, vol. 108, p. 1303-1310.
- [53]. Murugan T., (2011). Screening for antifungal and antiviral activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmacy Research*, 4(11): 41-61.
- [54]. Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P. (2016). Phycobiliproteins: A new perspective in natural pigments derived from microalgae. *J Oceanogr Mar Res*, 4(1):114-120.
- [55]. Jensen GS., Drapeau C., Lenninger M., Benson KF. (2016). Clinical Safety of a High Dose of Phycocyanin-Enriched Aqueous Extract from *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study with a Focus on Anticoagulant Activity and Platelet Activation. *J Med Food*, 19: 645 - 653.
- [56]. Walter A., Cesar de Carvalho J., Vanete T.S., Ana B.B. de Faria, Ghiggi V., Soccol C.R. (2011). Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 54(4):675-682.
- [57]. Jourdan J. (2012). *Cultivez votre Spiruline*. Manuel de culture artisanale, Antenna Technology. Genève, Suisse, 226-255.
- [58]. Cruchot H, (2008). *La Spiruline*, Bilan et Perspective. Thèse docteur en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon. Université de France-Comite.

Chapitre III

Cyclodextrines

III.1. Introduction

Les cyclodextrines (CDs) naturelles ou chimiquement modifiées font partie de la famille des molécules-cages. Elles sont connues pour leur aptitude à modifier les propriétés physico-chimiques (solubilité, stabilité...etc.) de nombreuses molécules organiques par formation des composés; ou complexes d'inclusion [1]. Les cyclodextrines ont aujourd'hui d'innombrables applications industrielle, et on les retrouve dans une multitude de produits courants. Elles sont aussi l'objet de très nombreuses recherches scientifiques [2].

III.2. Historique

L'histoire des cyclodextrines commence il y a un peu plus de 100 ans [3]. Il se divise en trois périodes. Leur découverte a été publiée en 1891 par un scientifique français, A. Villiers, qui a obtenu par digestion bactérienne de 1000 g d'amidon, 3 g de substance cristalline, nommée alors "cellulosine". Elles seront ensuite nommées cristalline dextrine, puis alpha-dextrine et bêta-dextrine puis dextrines de Schardinger en l'honneur du chercheur qui a décrit leur préparation, leur isolement et leurs principales caractéristiques de 1903 à 1911. La gamma-cyclodextrine a été découverte en 1935 [4].

III.3. Caractéristique structure et physico-chimique

III.3.1. Structure

Les cyclodextrines d'intérêt pharmaceutique sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon, ou plus précisément de l'amylose. L'enzyme impliquée, la cyclodextrine glycosyl transférase (CGTase) est produite par différents microorganismes [5].

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités α -Dglucopyranose. Les principales CDs sont l' α -CD (6 unités glucopyranose), la β -CD (7 unités) et la γ -CD (8 unités). Ces unités glucopyranose, en conformation chaise, sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques α -1,4 [5]. (Figure III.1)

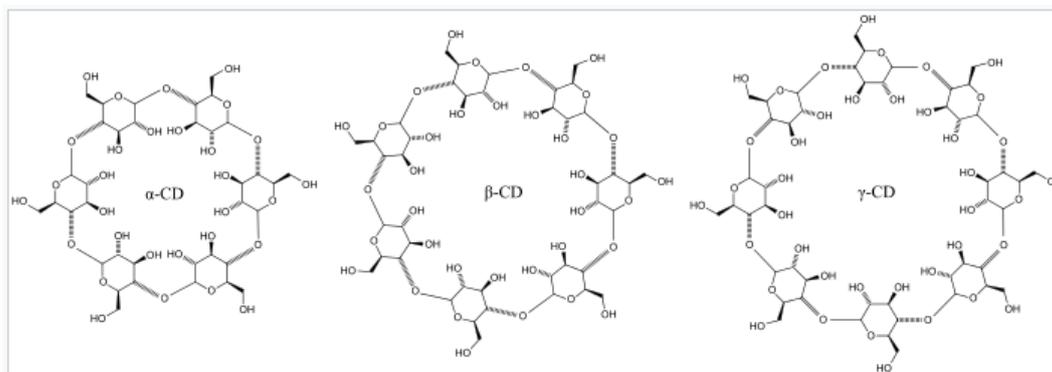


Figure III.1. Structure des cyclodextrines natives [6]

Il existe des CDs de plus grandes tailles constituées de 9, 10...unités, et de taille plus petite (la cyclo- α (1 \rightarrow 4)-glucopentaoside) qui ont été isolées ou totalement synthétisées. Différentes nomenclatures sont utilisées dans la littérature pour l'appellation des CDs (la β -cyclodextrine se trouve par exemple sous le nom de β -dextrine de Sharding, cycloheptaamylose, cyclomaltoheptaose, cycloheptaglukan, β -CD, B-CD ou C7A). Nous utiliserons dans la suite de notre travail le terme de β -CD [7].

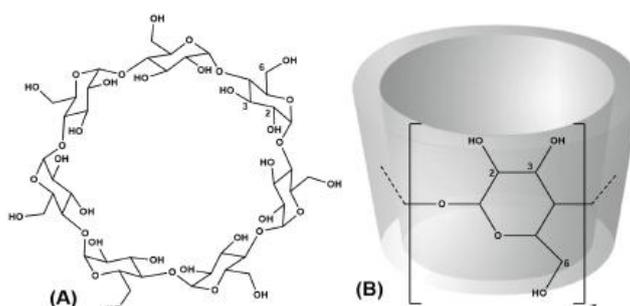


Figure III.2. A) Structure chimique de la β -CD et (B) sa forme en cône tronqué. [5].

Les CDs ont une structure tridimensionnelle en forme de cylindre conique dont la paroi est constituée par les unités glucoses, en conformation chaise 4C_1 [7].

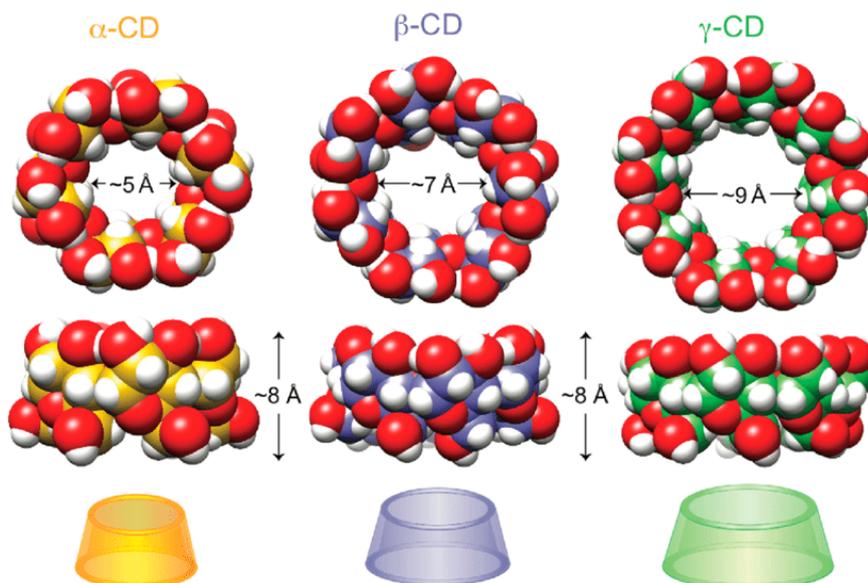


Figure III.3. Structure tridimensionnelle des trois CDs [7]

Les CDs ont une apparence de cône tronqué, et un beignet, toroïdal ou cylindrique, en raison de la disposition spatiale caractéristique des différents groupes fonctionnels des unités de glucose. En conséquence de cette conformation, tous les groupes hydroxyle secondaires (correspondant aux atomes de carbone C2 et C3 des unités de glucose) sont à l'un des bords

de la cavité, tandis que les hydroxyles primaires sont à l'autre extrémité de la cavité. Rotation de ces groupes OH réduisent la taille effective de la cavité, ce qui lui confère une forme conique tronquée plus ouverte vers le côté des hydroxyles secondaires [8]. Cette disposition donne un caractère apolaire à l'intérieur de la cavité, alors que la présence des groupements -OH sur les bords du tronc du cône les rend très aqueux soluble. Par exemple, des hôtes hydrophobes seront logés à l'intérieur de la cavité en raison des interactions hydrophobes de type van der Waals, alors que simultanément des interactions polaires [8].

III.3.2. Caractéristiques physicochimiques

Les trois principales CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques [5]. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau suivant:

Tableau III.1. Principales caractéristiques physicochimiques des trois cyclodextrines[5]

	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombre d'unités glucopyranose	6	7	8
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Masse molaire (g.mol⁻¹)	972	1135	1297
Diamètreexterne (nm)	1,46 ± 0,04	1,54 ± 0,04	1,75 ± 0,04
Hauteur (nm)	0,79 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Diamètre de la cavité (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Volume de la cavité (nm³)	0,174	0,262	0,472
Solubilité dans l'eau (g/L à 25°C)	145	18,5	232
pKa à 25°C	12,3	12,2	12,1
[α]^D à 25°C	150 ± 0,5	162,5 ± 0,5	177,4 ± 0,5

Les CDs sont entourées de molécules d'hydratation qui sont labiles et peuvent être éliminées par séchage, et de molécules d'eau d'inclusion dans la cavité qui ne peuvent être que remplacées, mais non éliminées [7]. Le caractère amphiphile des CDs, lié à leur structure spatiale, leur confère leur propriété majeure: celle de former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une ou des molécules invitées hydrophobes [7].

III.3.2.1. Solubilité dans l'eau

La solubilité dans l'eau varie de façon plus inattendue. En effet, la β -CD, bien que possédant un nombre d'unités glucopyranose intermédiaire entre l' α -CD et la γ -CD, possède la solubilité la plus faible. Ceci peut s'expliquer par les liaisons hydrogène intramoléculaires qui s'établissent entre les fonctions hydroxyle secondaires les CDs sont biodégradables, ce

qui, ajouté au fait qu'elles sont produites à partir d'une ressources, la γ -CD, non planaire et plus flexible, possède la plus grande solubilité dans l'eau [8].

III.4. Composition d'inclusion

III.4.1. Généralités sur la complexation

Un complexe d'inclusion est une association d'au moins deux molécules (**Figure III.4.**) dont l'une, le substrat (ou « invité ») est encapsulée de façon totale ou partielle par l'autre, le récepteur (ou « hôte ») sous l'effet d'interactions faibles [5]. Aucune on covalente n'est créée, ce qui permet une dissociation aisée et douce du complexe formé. Les CDs, ainsi que d'autres types de molécules comme les éthers couronnes, les calixarènes, etc. peuvent jouer le rôle de molécule hôte [5].

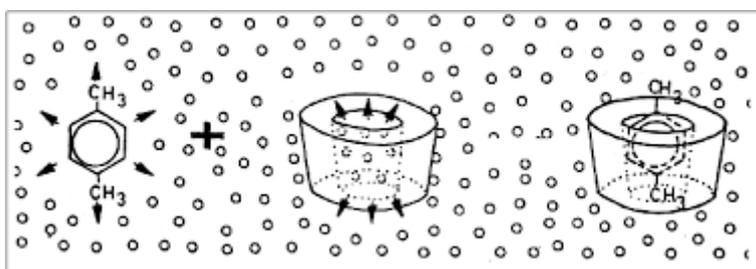


Figure III.4. Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion CD - xylène et de sa dissociation [9].

III.4.2. Formation des complexes d'inclusion

Formation d'un CD : Le complexe d'intégration d'invités peut être décrit en 5 étapes [10].

1. Les molécules d'eau sont libérées de la cavité DC à la suite de la combinaison CD invité. Lorsque le degré de liberté des molécules d'eau expulsées augmente, En raison des interactions plus faibles et du nombre de liaisons hydrogène avec lumière.
2. L'invité hydrophobe perd la couche d'hydratation qui l'entoure.
3. L'invité entre et occupe la cavité du CD formant ainsi le complexe d'encastrement Stabilisé par Vander Waals et interactions hydrophobes et/ou par liaisons hydrogène.
4. Réorganisez les molécules d'eau libres et formez des liaisons hydrogène entre elles.
5. La structure de l'eau autour de l'invité simple est restaurée.

III.4.3. Conséquences de la Complexation

La formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et une molécule invitée confère à ce complexe des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes de celles de la CD et de la molécule incluse prises séparément [11].

1. Modification de la solubilité dans l'eau.
2. Modification des propriétés spectrales.

- 3 .Modification de la réactivité chimique due à la molécule.
4. Diminution de la diffusion et de la volatilité (dans le cas de substances volatiles).
- 5 .Modification des propriétés chirales.
- 6 .Modification des propriétés biologiques (par exemple, le caractère hémolytique). En

outre, comme les CDs sont capables de différencier les énantiomères et, plus généralement, les composés structurellement proches comme les isomères, les homologues...etc, cette propriété est mise à profit dans le domaine de la chimie analytique et plus particulièrement dans celui des méthodes séparatives [12]

III.5. Application pharmaceutique

Dans l'industrie, les propriétés des CDs sont largement exploitées dans le milieu pharmaceutique [13,14]

Les principales CDs utilisées à l'heure actuelle par l'industrie pharmaceutique sont des β -CD normales ou modifiées. On trouve quelques exemples avec l' α -CD et l' γ -CD. La plupart des médicaments à base de CDs sont administrés par voie orale (tablettes, dragées, sirops...). Cependant, on remarque que toutes les spécialités administrées par voie nasale ou oculaire utilisent des CDs modifiées (HP- β -CD). Ces systèmes d'absorption font appel à des mécanismes de passage transmembranaire. Ces mécanismes sont sans doute facilités par le caractère amphiphile que confèrent les groupements alkyles greffés sur les CDs employées. Beaucoup de ces médicaments sont utilisés comme anti-inflammatoires (Piroxicam)[7].

Tableau III.2. Liste de spécialités pharmaceutiques commercialisées contenant des cyclodextrines[7]

Type de cyclodextrine	Molécule médicamenteuse	Nom commercial	Forme pharmaceutique	Indication
β -CD	Benexate	Lonmiel	Capsule	Antiulcéreux
β -CD	Benexate	Ulgut	Capsule	Antiulcéreux
β -CD	Chlordiazepoxide	Tranxllium 5mg/25mg	Comprimé	tranquillisant
β -CD	Dexamethasone, glyteer	Glymesason	Pommade	Analgésique, Anti- inflammatoire
β -CD	Cephalosporin	Meiact	Comprimé	Antibiotiques
HP- β -CD	Hydrocortisone	Dexacort	Liquide	Bain de bouche, gingivite, etc
β -CD	Lode	Mena-Gargle	Solution de gargarisme	Désinfectant pour la gorge
HP- β -CD	Itraconazole	Sporanox	Liquide oral	Candidose oesophagienne
β -CD	Piroxicam	Brexin	Comprimé, sachet	Analgésique, Anti-inflammatoire

- [1]. Khalil, H. (2004). Étude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : Solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse de Doctorat.
- [2]. Thatiparti, T.R. Shoffstall, A.J. Von Recum, H.A. (2010). Cyclodextrin-based device coating for affinity-based release of antibiotics.
- [3]. Szejtli J. (1998). Chem. Rev., 98(5), 1743-1753
- [4]. Jeulin, H. (2008). Impact virologique et pharmacologique de la complexation de la ribavirine aux cyclodextrines sur un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- [5]. Jacquet, R. (2006). Cyclodextrines hydrophiles: caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométriques et complexantes. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- [6]. Prochowicz, D., Kornowicz, A., Justyniak, I., Lewiński, J. (2016). Metal complexes based on native cyclodextrins: Synthesis and structural diversity. Coordination Chemistry Reviews, 306, 331-345.
- [7]. Moutard, S. (2003). Relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles (Doctoral dissertation, Amiens).
- [8]. Martin, J., Díaz-Montaña, E. J., Asuero, A. G. (2018). Cyclodextrins: past and present. Cyclodextrin: A Versatile Ingredient; Arora, P., Dhingra, N., Eds, 1-43.
- [9]. Bakkour, Y. (2005). Étude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées (Doctoral dissertation, Lille 1).
- [10]. Umeyama, H.; Morokuma, K. (1977). J. Am. Chem. Soc. 99, 2, 330-343
- [11]. Kois, D. Brinker, U.H. Metal Catalyzed Reductive C-C Bond Formation. Chem. Soc, 45, 1998, 4314-4325.
- [12]. Bouzit, H. (2017). Synthèse, Structure, et Réactivité d'une série de sulfonamides couplés à l'acide lipoïque et étude de leurs complexes d'inclusion avec la β -cyclodextrine. Thèse du doctorat, 37.
- [13]. Rajewski R. A. Stella V. J. (1996). J. Pharm. Sci. 85(11), 1142-1159
- [14]. Fröming K.-H. Szejtli J. (1994). Cyclodextrins in pharmacy, Kluwer Academic Publishers :Dordrecht, 224-237.

Partie II

Partie Pratique

Chapitre I :

Méthodes

&

Résultats et

discussion

I. Extraction de la PC

I.1. Extraction par macération dans le mélange glycérol/eau (C₃H₈O₃/H₂O) 80/20[1]

100g de poudre de spiruline obtenu est mélangé dans le mélange glycérol/eau (80/20). On a laissé macérer pendant 7 jours à température ambiante à l'obscurité. Une filtration effectuée par un filtre compatible alimentaire (Poche Nylon 330x500 filtres 50 microns).



Figure.I.1 Processus de filtration de la PC

I.2. Caractérisation du PC

I.2.1. Spectroscopie Ultraviolet – Visible

I.2.1.1. Mode opératoire

- ✓ Placer dans l'appareil une cuve de mesure (dite cuve de référence ou blanc) ne contenant que le solvant.
- ✓ Relever l'absorbance, et calibrer l'appareil pour lui signifier que cette absorbance doit être nulle.
- ✓ Placer la cuve contenant l'échantillon (l'extrait dilué dans le solvant), relever la mesure.
- ✓ Recueillir un spectre d'absorbance en permettant à l'instrument parcourir les différentes longueurs d'onde et recueillir l'absorbance.

✓ À partir du spectre d'absorbance collectées, on détermine le maximum d'absorbance (λ_{\max}) de PC (voire figure I.2)

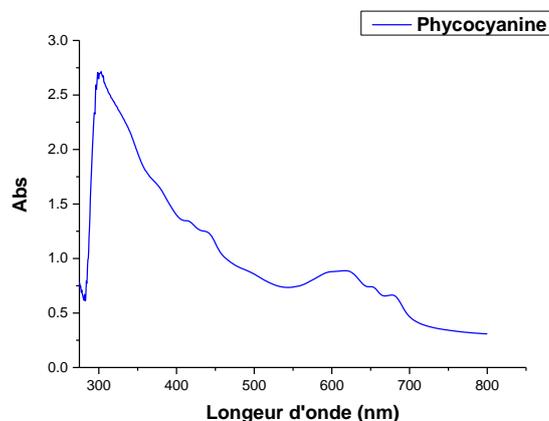


Figure I.2. Spectre Uv de PC

D'après la figure I.2, la PC présente deux maximums d'absorption, $\lambda_1 = 301 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 614 \text{ nm}$, ce résultat est en accord avec la littérature.

I.3. Formation des complexes d'inclusion

I.3.1. Formation d'un nouveau complexe entre la PC et la β -CD

La conservation de la PC exige des précautions particulières. Il convient ainsi d'utiliser de petits flacons en verres teintés ou opaques et les préserver à l'abri de la lumière, l'oxygène, l'humidité,...etc. Les chercheurs ont donc dû faire preuve d'ingéniosité pour trouver des formulations permettant d'améliorer la stabilité de la PC afin de favoriser son application dans les nombreuses applications dans les domaines de l'alimentaire, de la pharmacologie, de la cosmétique et de la recherche. Nous avons étudié l'effet de la β -CD sur la stabilité de la PC. La préparation du complexe d'inclusion entre la β -CD et la PC avec un rapport molaire (1.2), a été réalisée par différentes méthodes.

I.3.1.1 Formation du complexe par mélange physique (PC: β -CD Mph)

Nous avons mélangé à sec des quantités de β -CD et de PC d'un rapport (1:2) dans un mortier, on a soumis le mélange au malaxage pendant 30 min jusqu'à l'obtention d'une pâte. Un séchage complet a été réalisé, on plaçant le complexe obtenu à l'air libre pendant 24 h [2].

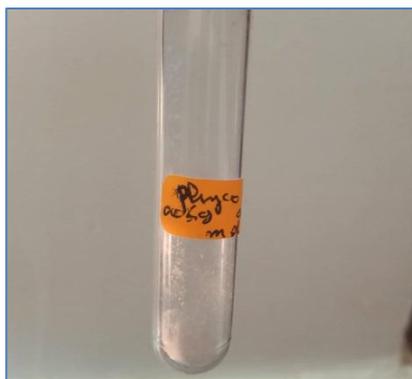


Figure I.3. Formation du complexe (PC:β-CD) par mélange physique

I.3.1.2 Formation du complexe par malaxage (PC:β-CD Kn)

Des quantités de β-CD et de PC d'un rapport molaire (1:2) ont été placées dans un mortier, 0,8 mL solution eau/éthanol 50:50 v/v ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été malaxé manuellement au pilon 30 min ou plus jusqu'à l'obtention d'une pâte. Un séchage à l'air libre a été réalisé pendant 24 h [3].



Figure I.4. Formation du complexe (PC:β-CD) par malaxage

I.3.1.2 Formation du complexe par Micro-ondes (PC:β-CD Mw) et (PC: HP-β-CD Mw)

Les complexes préparés par Mw ont été préparés à partir des mélanges physiques correspondants, les Mp ont été placés dans un mortier, 1 mL d'éthanol a été ajouté, après un léger malaxage, le mélange a été mis au micro-onde à 350 watts pendant 15 min [4].

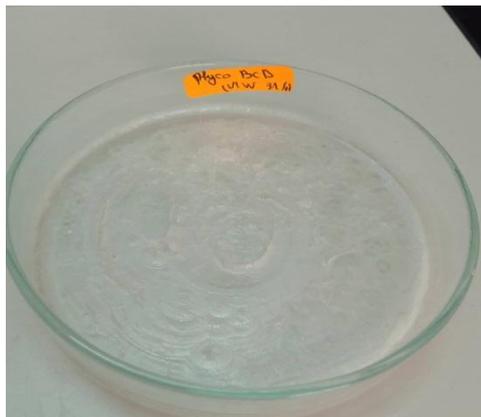


Figure I.5. Formation du complexe (PC:β-CD) par Micro-ondes

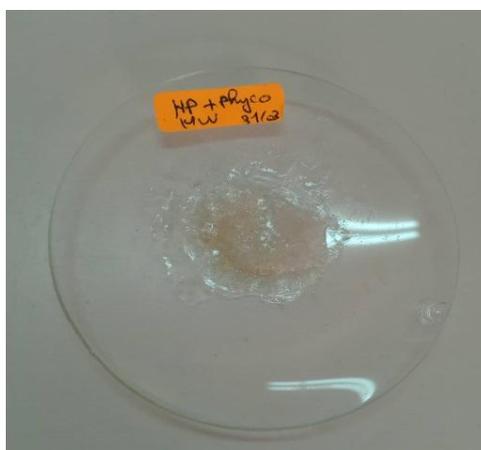


Figure I.6. Formation du complexe (PC:HP-β-CD) par Micro-ondes

I.3.1.3 Formation du complexe par Ultrasons (PC:β-CD Us) et (PC:HP-β-CD Us)

A une solution aqueuse de β-CD et/ou HP-β-CD (10mL) ($M = 1135 \text{ g/mol}$, $m = 0,227\text{g}$), une quantité de la PC est ajoutée. Puis nous avons agité la solution un certain temps. Ensuite le mélange est placé aux Ultrasons pendant 1h, le complexe s'est formé par précipitation à l'air libre.

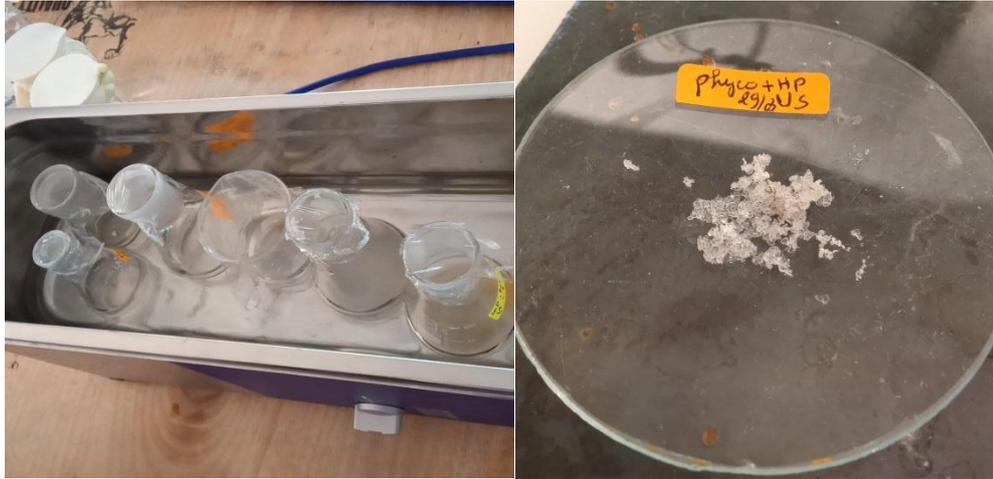


Figure I.7. Formation du complexe (PC:HP- β -CD) par Ultrasons

I.3.2. Formation d'un nouveau complexe entre la PC, la β -CD et/ou HP β -CD et la Fibre

Pour préparer les complexes d'inclusion (PC: β -CD:Fibre) et/ou (PC:HP- β -CD:Fibre) avec un rapport molaire [1:2 :1], nous avons choisis les mêmes procédures utilisés pour la formation des complexes (PC: β -CD) dans le paragraphe ci-dessus, et nous avons obtenus les complexes suivant: (PC: β -CD:Fibre) Mph, (PC: β -CD:Fibre) Kn, (PC: β -CD:Fibre) Mw, (PC:HP- β -CD:Fibre) Mw, (PC: β -CD:Fibre) Us et (PC:HP- β -CD:Fibre) Us.

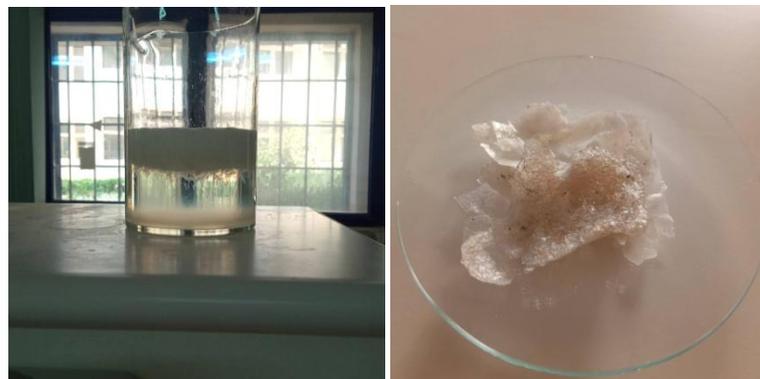


Figure I.8. Préparation de fibre

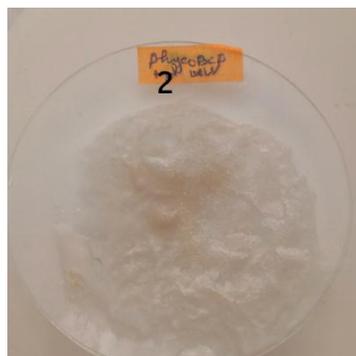
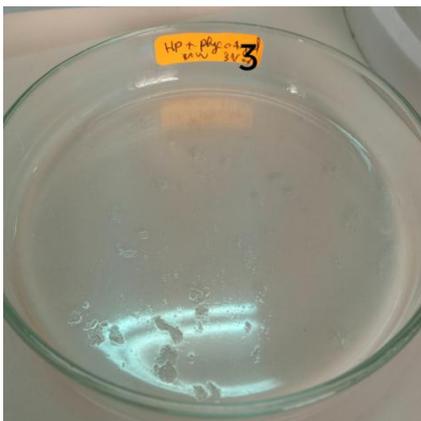
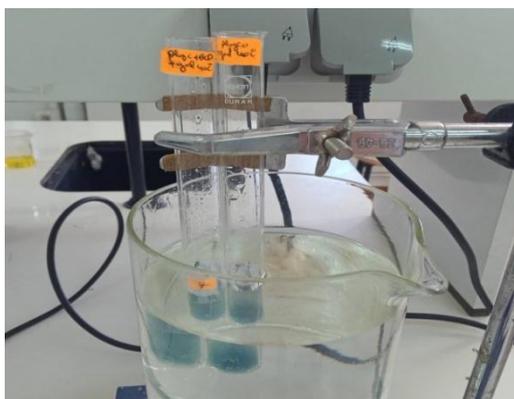


Figure I.9. Formation du complexe (PC: β -CD:Fibre) par Micro-ondes**Figure I.10.** Formation du complexe (PC:HP: β -CD:Fibre) par Micro-ondes

I.4. Etude de la stabilité PC en présence de β -Cyclodextrine et la fibre

La PC est sensible à la photodégradation [5]. Or il est bien décrit que les cyclodextrines peuvent protéger de la photodégradation certains principes actifs [6-8]. Une expérience de dégradation forcée a été effectuée afin d'observer l'éventuelle formation de produits de dégradation. Le complexe a été solubilisé à environ 1mg/mL dans l'eau avant d'être exposée pendant 2h aux conditions de dégradation suivantes: dégradation basique (pH de 9) et pH=7, lumière naturelle et lumière à partir d'une lampe (65W), thermodégradation (30°C-70°C). L'évaluation des résultats a été comparée par rapport à une solution conservée à 25 °C et à l'obscurité.

I.4.1 Effet de la température

**Figure I. 11.** Le suivit de la dégradation de la PC à différentes températures

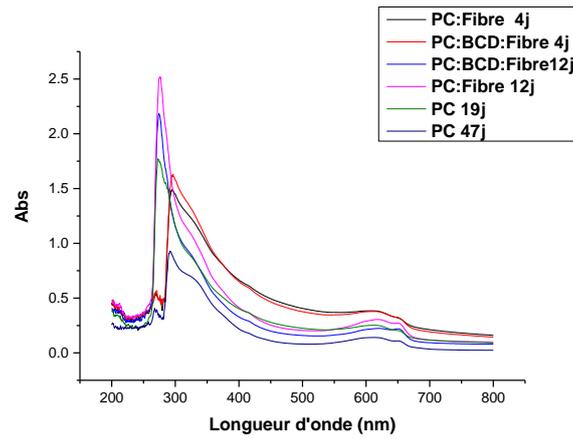


Figure.I.12. Spectre UV de PC à la température $T= 30^{\circ}\text{C}$ en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps



Figure.I.13. PC, (PC; β -CD) à la température $T= 30^{\circ}\text{C}$

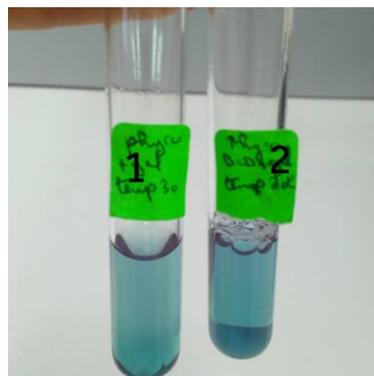


Figure.I.14. Le complexe (PC:Fibre) (1), (PC; β -CD:Fibre) (2) à la température $T= 30^{\circ}\text{C}$

D'après les figures (I.12-I.14), et d'après notre suivi quotidien à l'œil nue, on a remarqué que la PC conserve sa couleur bleu à $T=30^{\circ}\text{C}$, et ça est traduit par les deux bandes d'absorption apparait dans le spectre Uv de PC.

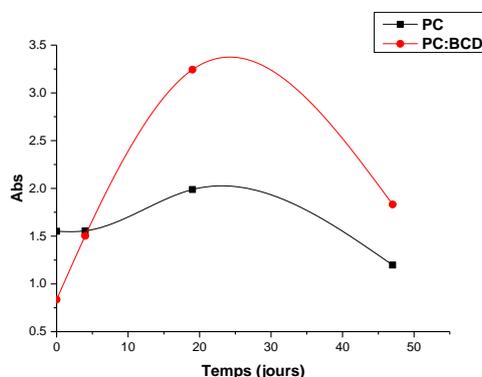


Figure. I.15. Stabilité de la PC à la température $T= 40^{\circ}\text{C}$: Absorbance en fonction du temps

D'après la figure. I.14, on remarque que l'absorbance de PC en présence de la β -CD augmente graduellement par rapport à la PC libre ce qui se traduit par la bonne stabilité de la PC en présence de la β -CD. Aussi le suivi de la PC en présence de la β -CD montre que la couleur bleu n'a pas été altérée, à la température $T= 40^{\circ}\text{C}$ contrairement à son présence seul. Aussi l'ajout de la fibre au β -CD conserve aussi les deux λ_{max} de PC à température 40°C (voir figures ci-dessous)

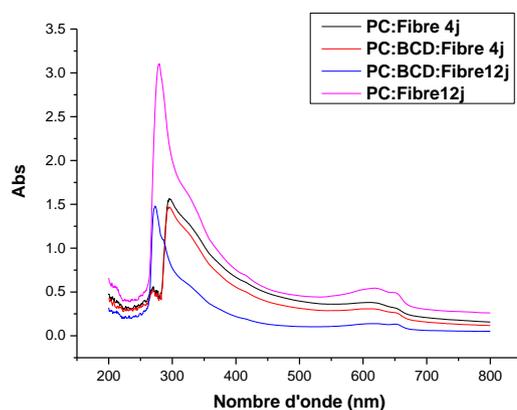


Figure.I.16. Spectre Uv de PC à la température $T= 40^{\circ}\text{C}$ en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps

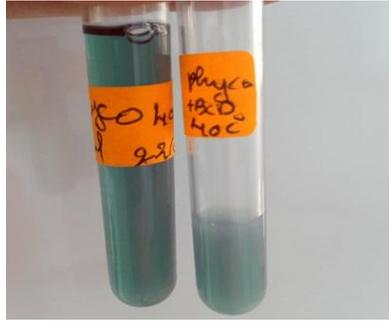


Figure.I.17. PC, (PC: β -CD) à la température T= 40°C



Figure.I.18. PC (1), PC: β -CD:Fibre) (2) à la température T= 40°C

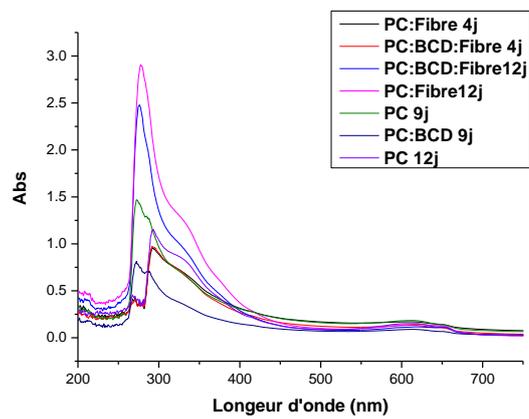


Figure.I.19. Spectre Uv de PC à la température T= 50°C en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps



Figure.I.20. PC (à gauche), (PC: β -CD) (à droite) à la température T= 50°C



Figure.I.21. PC (à gauche), (PC: β -CD:Fibre) (à droite) à la température T= 50°C

D'après les figures précédentes, on remarque que l'absorbance de la PC diminue en fonction du temps, lors de son exposition à T=50°C alors que la présence de la β -CD et la fibre inhibe l'absorbance de se diminuer, et ça peut être due à la stabilité prouvée par la présence de la β -CD et la fibre. Les mêmes remarques sont enregistrées pour la température 60°C et 70°C (voir figures ci-dessous).

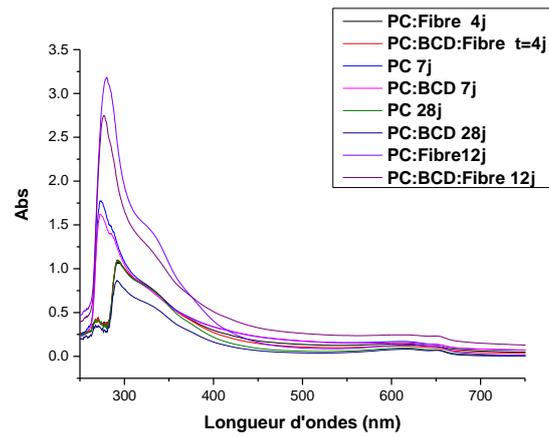


Figure.I.22. Spectre Uv de PC à la température $T= 60^{\circ}\text{C}$ en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps



Figure.I.23. PC, (PC: β -CD) à la température $T= 60^{\circ}\text{C}$



Figure.I.24. Le complexe (PC: β -CD:Fibre) à la température $T= 60^{\circ}\text{C}$

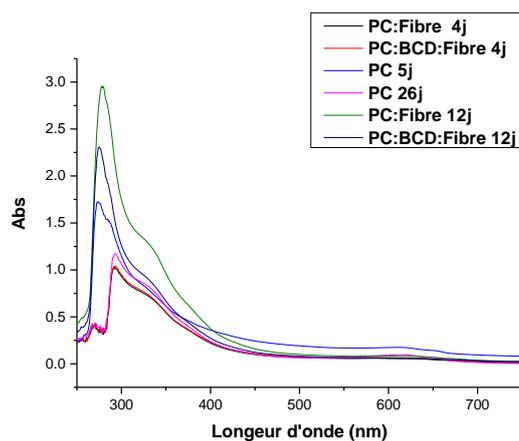


Figure.I.25. Spectre Uv de PC à la température $T= 70^{\circ}\text{C}$ en présence de $\beta\text{-CD}$ et la fibreen fonction du temps

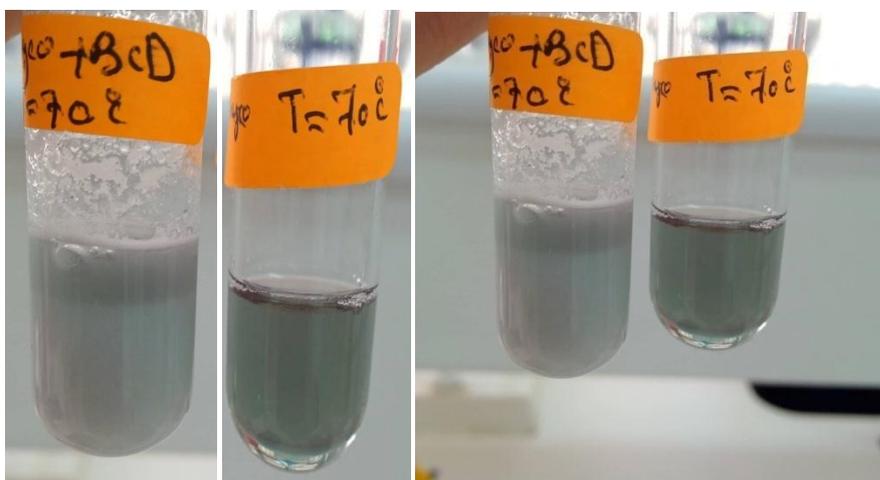


Figure.I.26. PC, (PC; $\beta\text{-CD}$) à la température $T= 70^{\circ}\text{C}$

I.4.2. Effet du pH sur la stabilité de PC

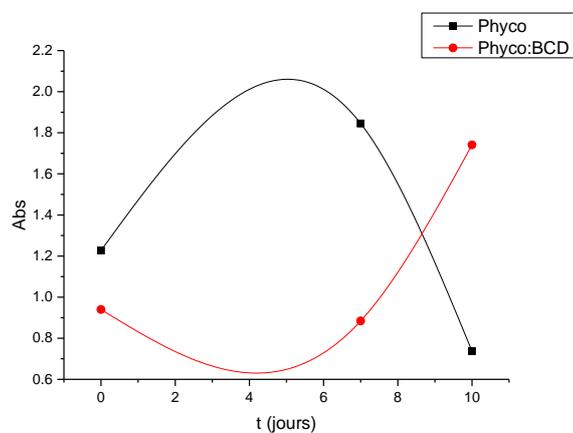


Figure.I.27. Stabilité de PC à $\text{pH}=7$: Absorbance en fonction du temps

Dans les conditions expérimentales éprouvées, Aucun changement de couleur n'est remarqué, donc la dégradation de la PC n'a pas été observée à la solution tampon (pH neutre), et l'absorbance de la PC augmente en fonction du temps, en présence de la β -CD.

Tandis que l'absorbance de la PC seul, se diminue en fonction du temps et la PC a perdu sa couleur graduellement.

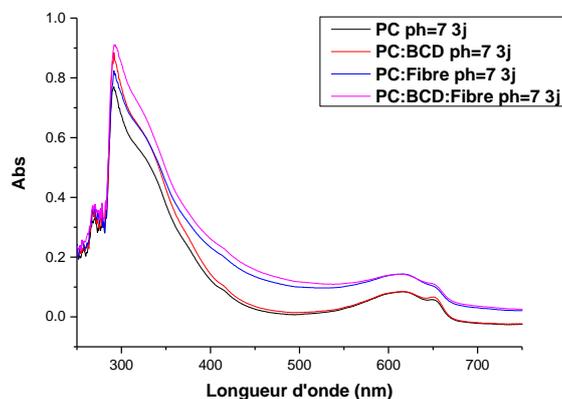


Figure. I.28. Spectre Uv de PC à pH=7 en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps



Figure. I.29. Le complexe (PC: β -CD) (1) et la matrice (PC: β -CD:Fibre) (2) au pH=7

On remarque que pendant les trois premiers jours de la surveillance de l'absorbance de PC dans les trois cas, la forme générale du spectre n'a pas changé, ce qui implique que la PC est stable à pH 7, aux premiers jours mais malheureusement, on pas pu continuer la surveillance. Même remarque pour le pH 10.

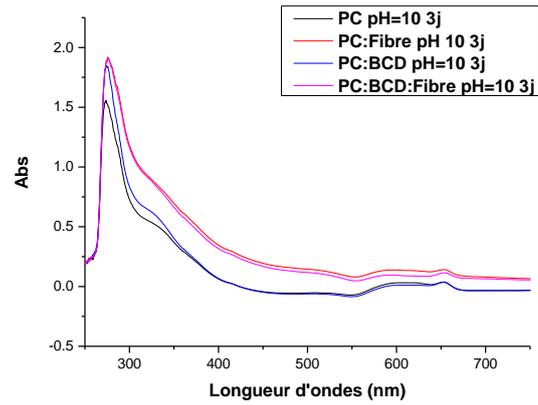


Figure.I.30. Spectre Uv de PC à pH=10 en présence de β -CD et la fibre en fonction du temps

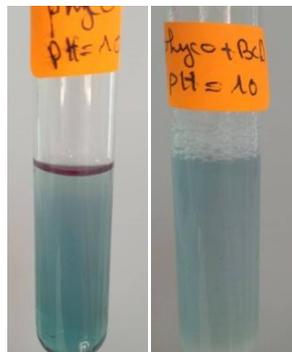


Figure.I.31. PC et le complexe (PC: β -CD) au pH=10

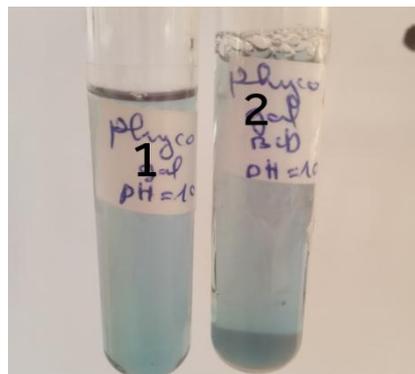


Figure.I.32. Le complexe (PC:Fibre) (1) et la matrice (PC: β -CD:Fibre) (2) au pH=10

I.4.3. Effet de la lumière naturelle sur la stabilité de PC

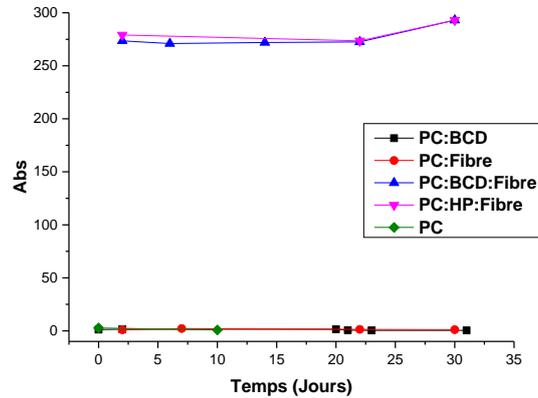


Figure.I.33. Effet de la lumière naturelle sur la stabilité de PC: Absorbance en fonction du temps



Figure.I.34. La PC en lumière naturelle en fonction du temps

On remarque ici, que la combinaison du β -CD, la fibre et/ou la HP β -CD, la fibre peut protéger la dégradation et le changement de couleur de la PC pour une période dépasse le mois. Pour la dégradation forcée, l'absorbance est stable en présence de la β -CD et de la fibre.

I.4.4. Effet de la lumière forcée

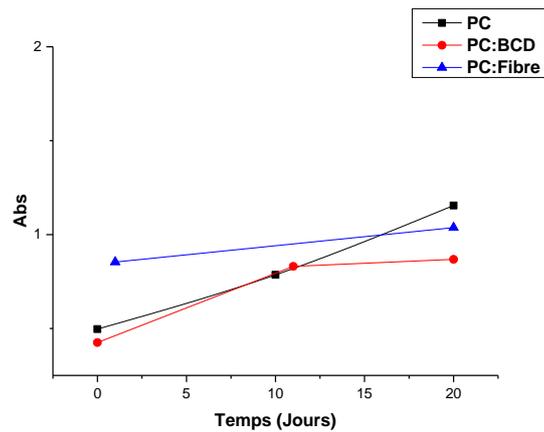


Figure.I.35. Effet de la lumière Forcée sur la stabilité de PC: Absorbance en fonction du temps



Figure I.36. Le suivit de l'effet de la lumière forcée sur la stabilité de PC en fonction du temps

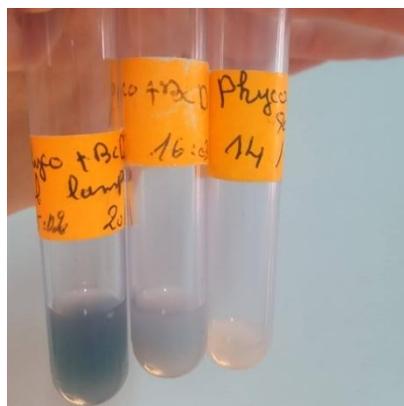


Figure.I.37. Le suivit de l'effet de la lumière forcée sur la stabilité du complexe (PC:β-CD) en fonction du temps

I.5. Etude de l'activité Antioxydante

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet). Notre étude s'est intéressée à l'évaluation des activités antioxydantes d'extraits de PC. (*spirulina platensis*) et en présence de la β -CD et/ou β -CD et une fibre en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, dans notre étude c'est la méthode de DPPH (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) [9]

I.5.1. Présentation du test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre stable qui agit en se combinant avec d'autres radicaux libres. Ce composé a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité des composés phénoliques [9]. Le radical possède un électron libre sur un atome du pont d'azote. La délocalisation de cet électron se traduit par la coloration bleue-violette caractéristique du réactif. Cette délocalisation permet également au DPPH• de rester stable à température ambiante. (Figure.I.38) La réduction du radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants.

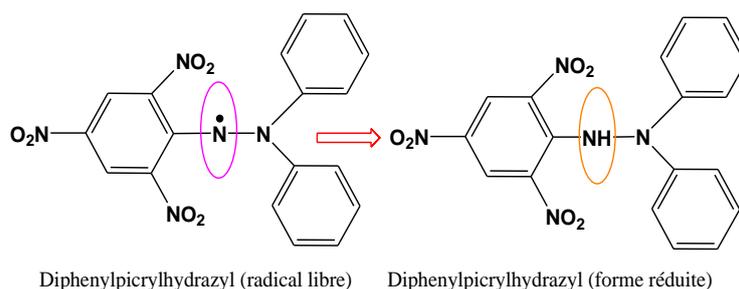


Figure.I.38. Structure du DPPH avant et après la réaction avec un antioxydant

I.5.2. Mode opératoire

L'activité d'élimination des radicaux libres des extraits a été mesurée par le 2,2-diphényl-2- picrylhydrazyle (DPPH) selon le protocole décrit par *Bounatirouetal.* [10] avec quelque modification:

✓ Préparer la solution DPPH dans du méthanol (2.4mg / 100mL) et bien couvrir avec du papier aluminium.

✓ Préparer une gamme de dilution partant d'une solution mère dissoute dans le méthanol.

✓ 100 μ L de chaque dilution sont ajoutés à 1 mL de la solution du DPPH.

✓ Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 μ L de méthanol avec 1mL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite dans un spectrophotomètre UV contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante (voir Tableau.I.1).

Tableau.I.1. Résultats de l'activité antioxydante par le test DPPH de PC et ses complexes

PC	Concentration (mL/mL)	2	1.4	1	0.2
	Abs	0.365	0.587	0.825	0.944
PC:β-CD (L)	Concentration (mL/mL)	2	1.6	1.4	1
	Abs	0.316	0.410	0.568	0.975
PC:β-CD:Fibre (L)	Concentration (mL/mL)	2	1	0.6	0.4
	Abs	0.466	0.487	0.532	0.623
PC:HP-β-CD (L)	Concentration (mL/mL)	2	1.4	0.6	
	Abs	0.564	0.596	0.75	
PC:HP-β-CD:Fibre(L)	Concentration (mL/mL)	2	1.8	1.6	
	Abs	0.467	0.568	0.572	
PC:β-CD Mw	Concentration (mg/mg)	5	3	1	
	Abs	0.378	0.446	0.714	
PC:β-CD:FibreMw	Concentration (mg/mg)	5	2	1	
	Abs	0.452	0.561	0.856	
PC:HP-β-CD Mw	Concentration (mg/mg)	5	3	1	
	Abs	0.451	0.487	0.901	
PC:HP-β-CD:FibreMw	Concentration (mg/mg)	5	2	1	
	Abs	0.376	0.536	0.842	
PC pur	Concentration (mg/mg)	0.2	0.1	0.05	
	Abs	0.120	0.257	0.394	

Les figures ci-dessous représentent la variation de l'absorbance de la PC seul et en présence de β -CD et /ou β -CD et la fibre en fonction des concentrations

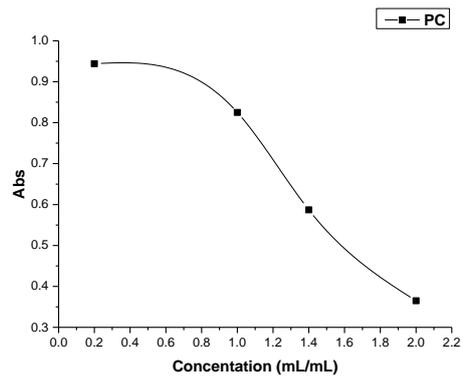


Figure.I.39. L'absorbance de PC en fonction des concentrations

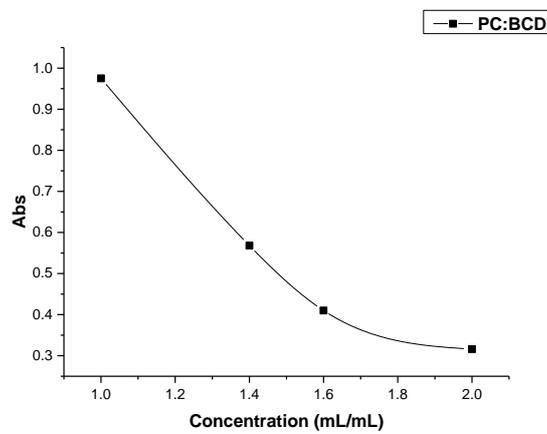


Figure.I.40. L'absorbance de complexe en phase liquide (PC: β -CD) en fonction des concentrations

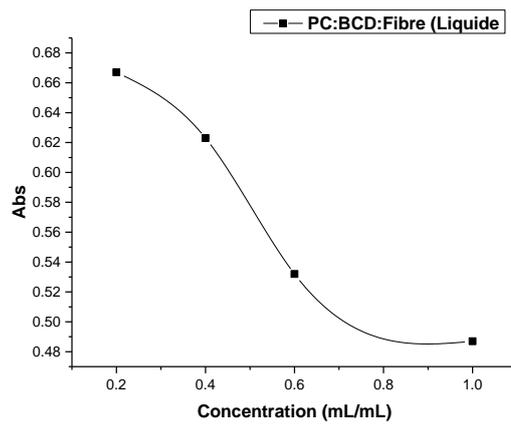


Figure.I.41. L'absorbance de complexe en phase liquide (PC: β -CD:Fibre) en fonction des concentrations

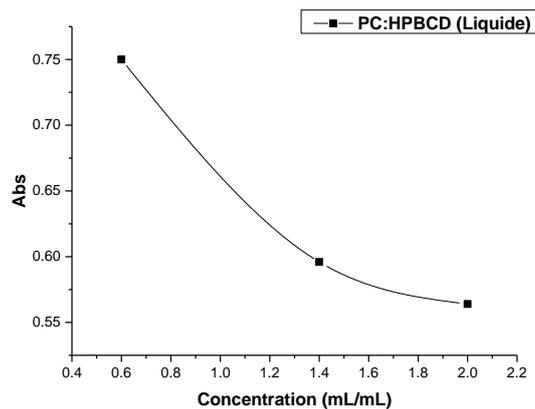


Figure .I.42. L'absorbance de complexe en phase liquide (PC:HP- β -CD) en fonction des concentrations

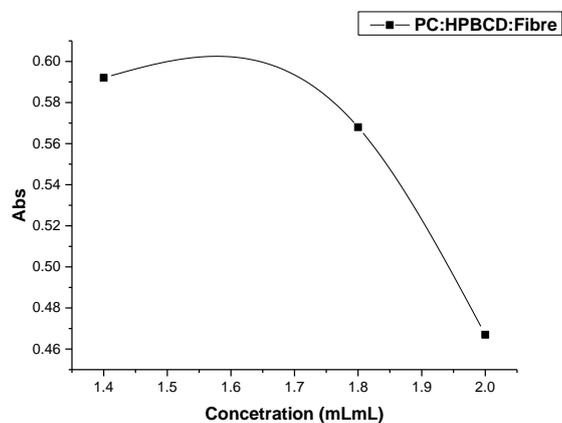


Figure.I.43. L'absorbance de complexe en phase liquide (PC:HP- β -CD:Fibre) en fonction des concentrations

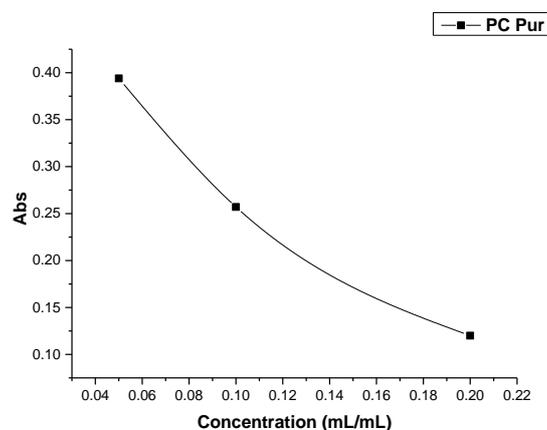


Figure.I.44. L'absorbance de complexe en phase liquide (PC pur) en fonction des concentrations

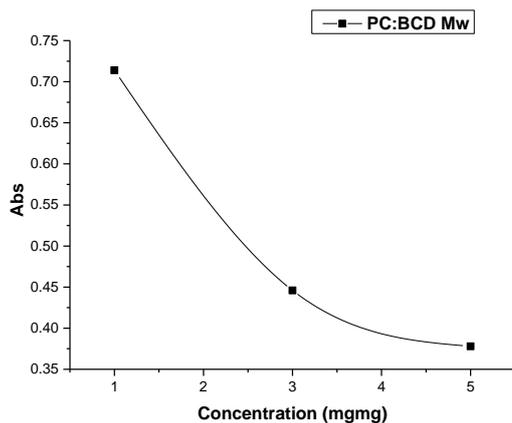


Figure.I.45. L'absorbance de complexe à l'état solide (PC:β-CD Mw) en fonction des concentrations

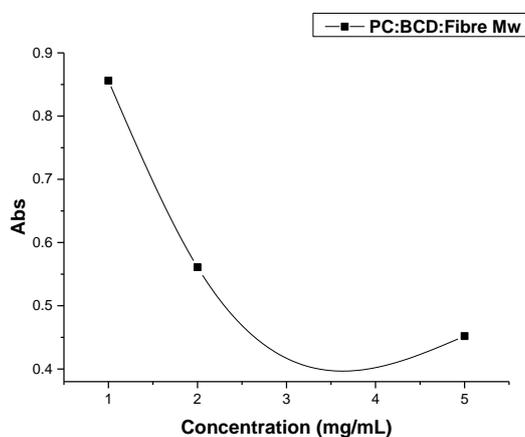


Figure.I.46. L'absorbance de complexe à l'état solide (PC:β-CD:FibreMw) en fonction des concentrations.

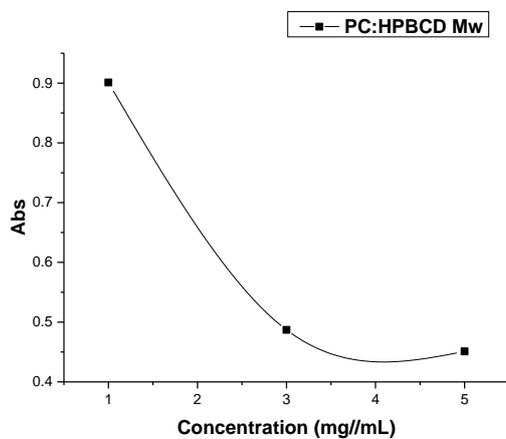


Figure.I.47. L'absorbance de complexe à l'état solide (PC:HP-β-CD Mw) en fonction des concentrations

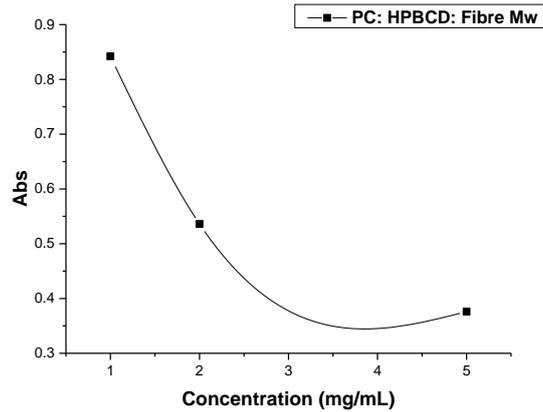


Figure.I.48. L'absorbance de complexe à l'état solide (PC:HP- β -CD : Fibre Mw) en fonction des concentrations

I.5.3. Calcul des pourcentages d'inhibitions

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) et ont été calculés à l'aide de la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At)/Ac] \times 100 \quad (2)$$

Ac : Absorbance du contrôle négatif (sans extrait)

At : Absorbance du test effectué (en présence de l'extrait)

Les résultats des pourcentages d'inhibitions sont présentés dans le tableau.I.2

Tableau.I.2. Activité anti radicalaire du PC et ses complexes d'inclusion.

PC)	Concentration (mL/mL)	2	1.4	1	0.2
	I%	62.02	38.91	14.15	1.76
PC: β -CD (L)	Concentration (mL/mL)	2	1.6	1.4	1
	I%	67.11	57.34	40.89	1.45
PC: β -CD:Fibre (L)	Concentration (mL/mL)	2	1	0.6	0.4
	I%	51.51	49.32	44.64	35.17
PC:HP- β -CD (L)	Concentration (mL/mL)	2	1.4	0.6	
	I%	41.31	37.98	21.95	----
PC:HP- β -CD:Fibre(L)	Concentration (mL/mL)	2	1.8	1.6	
	I%	51.40	40.89	40.47	----
PC: β -CD Mw	Concentration (mg/mg)	5	3	1	
	I%	60.66	53.59	25.70	----
PC: β -CD:FibreMw	Concentration (mg/mg)	5	2	1	
	I%	52.96	41.62	10.92	----
PC:HP- β -CD Mw	Concentration (mg/mg)	5	3	1	
	I%	53.07	49.32	6.24	----
PC:HP- β -CD:FibreMw	Concentration (mg/mg)	5	2	1	
	I%	60.87	44.22	12.38	----
PC pur	Concentration (mg/mg)	0.2	0.1	0.05	
	I%	87.51	73.26	59.00	----

I.5.4. Calcul des concentrations efficaces IC₅₀

La capacité antioxydante de nos différents composés est déterminée à partir des concentrations inhibitrices IC₅₀, paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. L'IC₅₀ a été définis comme la quantité d'antioxydant nécessaire de diminuer la concentration de radicaux DPPH initiale de 50%. Une valeur faible d'IC₅₀ correspond à une activité antioxydante plus élevée de composé. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement sont résumés dans les histogrammes présentés ci-dessous.

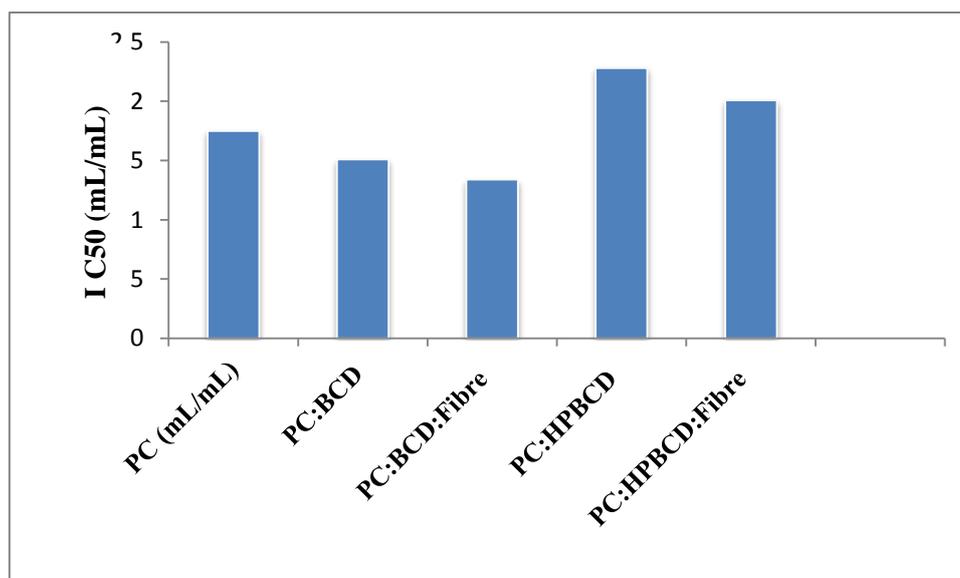


Figure.I.49. Histogramme des valeurs d'IC₅₀ pour le PC et les complexes formés en phase liquide

Il est clair que l'IC₅₀ est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

D'après la figure ci-dessus, l'histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC₅₀ montre que l'IC₅₀ de PC:β-CD:Fibre est inférieure à celle de l'extrait PC, suivi par l'IC₅₀ de l'extrait PC:β-CD, sachant que plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante est importante, ceci a révélé la haute capacité de piégeage de DPPH de la PC en présence de β-CD et la fibre qui présente l'activité antioxydante la plus élevée. Donc, on peut conclure que la PC, constitue un excellent antioxydant naturel de substitution et l'ajout de la β-CD et la fibre a augmenté son activité antioxydante. On peut constater aussi que notre extrait brut et ses complexes sont capables de donner un effet inhibiteur important même à de très faibles concentrations.

Concernant les complexes formés en phase solide, ils ont montré aussi une activité antioxydante mais inférieure aux complexes formés en phase liquide et ça peut être due au rapport molaire qu'on a pris (figure.I.50)

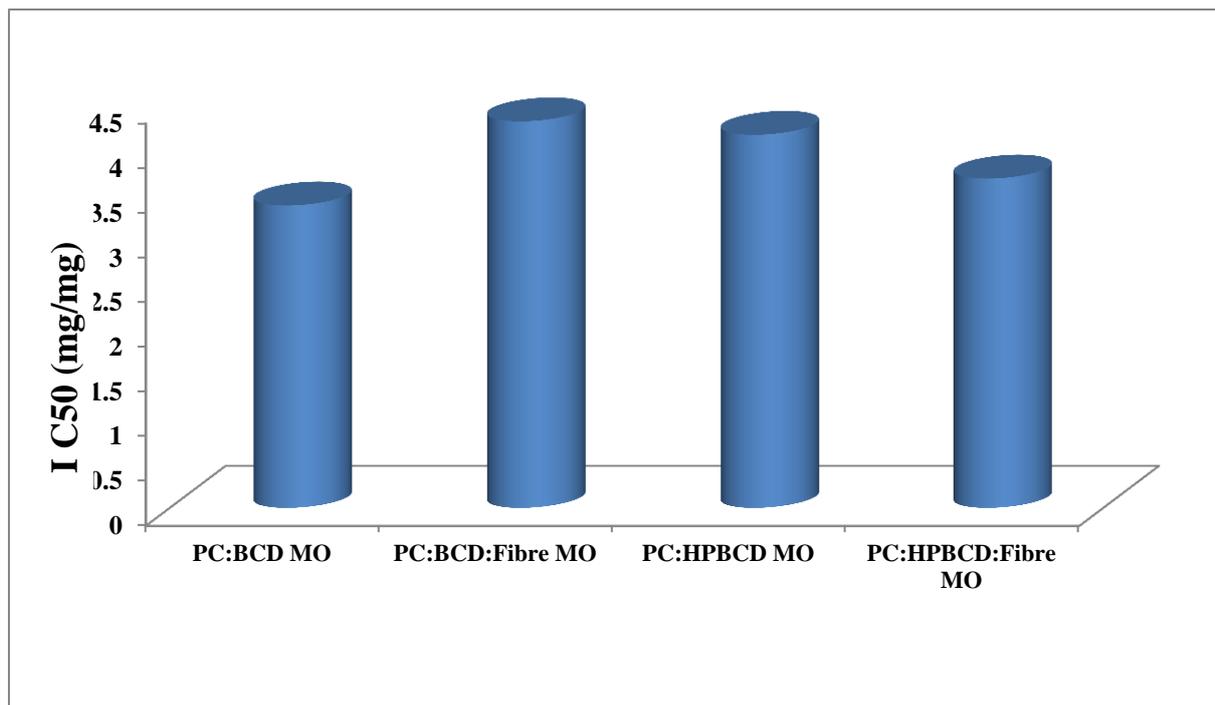


Figure.I.50. Histogramme des valeurs d'IC₅₀ pour les complexes formés par MO

I.6. Activité biologique

I.6.1. Présentation des souches bactériennes

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des extraits précédents sur les espèces suivantes :

- ✓ *Escherichia coli* Escherich ATCC 25922.
- ✓ *Staphylococcus aureus* Rosenbach ATCC 25923.
- ✓ *Pseudomonas aerogenosa* Migula ATCC 27853.

I.6.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli reste l'une des causes les plus fréquentes de plusieurs infections bactériennes courantes chez les humains et les animaux. *E. coli* est la principale cause d'entérite, d'infection des voies urinaires et d'autres infections cliniques. La prévalence des souches *E. coli* multirésistantes augmente dans le monde principalement en raison de la propagation d'éléments génétiques mobiles, la propagation de la résistance chez *E. coli* est un problème de santé publique croissant dans les pays européens [11].

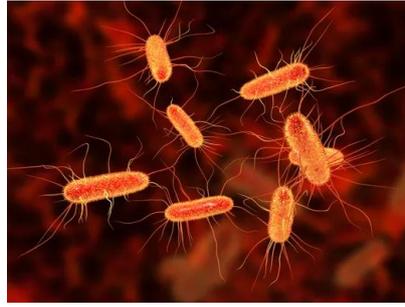


Figure.I.51. *Escherichia coli* [12]

I.6.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie gram-positif qui provoque une grande variété de maladies cliniques. Les infections causées par cet agent pathogène sont courantes à la fois dans les milieux communautaires et hospitaliers. Le traitement reste difficile en raison de l'émergence de souches multi-résistantes telles que le SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) [13].

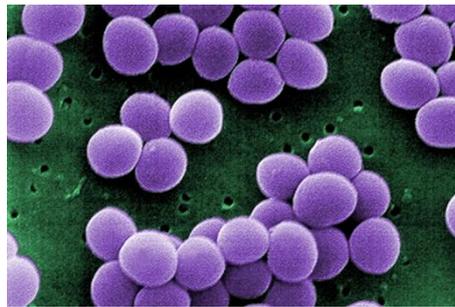


Figure.I.52. *Staphylococcus aureus* [14]

I.6.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie omniprésente dans l'environnement qui provoque des infections humaines opportunistes. Un grand nombre de voies métaboliques et de gènes régulateurs rendent cette bactérie hautement adaptative à diverses conditions de croissance. Sa polyvalence nutritionnelle, son grand nombre de facteurs de virulence et sa résistance élevée aux antibiotiques rendent cette bactérie extrêmement difficile à éradiquer des individus infectés, en particulier des infections pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose [15].



Figure.I.53. *Pseudomonas aeruginosa* [16]

I.6.2. Mode opératoire

L'activité antimicrobienne des extraits de *Spirulina platensis* par la méthode de diffusion sur disque a été réalisée selon le protocole proposé [17]:

- ✓ Trois colonies bien isolées furent prélevées et émulsionnées dans une solution saline dans un tube à essai, ensuite des dilutions ont été faites afin de standardiser la suspension bactérienne.

La suspension bactérienne préparée a été coulée à l'aide d'un coton-tige stérile sur le milieu de culture gélose de Muller Hinton (MH) puis. Incuber à 37°C pendant 24 heures

- ✓ Préparer des différentes concentrations de l'extrait (0.5-50 mg/ml).
- ✓ Ensemencer l'inoculum (turbidité ajustée à 0.5 McFarland) en surface par coton tige et laisser sécher les boîtes pendant cinq minutes.
- ✓ Imprégner des disques stériles de 7 mm par 20 µl de chaque extrait préalablement, solubilisé avec le DMSO 10% avec différent concentration (0.5-50 mg/mL).
- ✓ Déposer les disques à la surface du milieu de culture à l'aide d'une pince stérile et presser doucement pour assurer leur contact avec la surface de milieu.
- ✓ Déposer les disques d'antibiotique et de DMSO (témoin) à la surface du milieu de culture à l'aide d'une pince stérile et presser doucement pour assurer leur contact avec la surface de milieu.
- ✓ Incuber à 37°C à l'abri de la lumière pendant 24 heures.

I.6.3. Lecture du résultat

Tableau.I.3. Résultats de l'activité antibactérienne par la PC et ses complexes et matrices en phase liquide et solide

L'extrait et les complexes à différents concentrations en (mg/mL)		Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
		Escherichia Coli	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus Aureus
PC	C ₀ :	-	19mm	9mm
	C ₁ :20	-	10mm	8mm
	C ₃ :15	-	11mm	-
	C ₄ :10	-	11mm	-
	C ₅ :8	-	-	-
PC:β-CD (liquide)	C ₆ :	-	-	8mm
	C ₇ :20	-	-	9mm
	C ₈ :15	-	-	-
	C ₉ :10	-	-	-
	C ₁₀ :8	-	-	-
PC:β-CD:Fibre (liquide)	C ₁₁ :	-	10mm	11mm
	C ₁₂ :20	-	9mm	9mm
	C ₁₃ :15	-	-	-
	C ₁₄ :10	-	-	-
	C ₁₅ :8	-	-	-
PC:HP β-CD:Fibre (liquide)	C ₂₁ :	10mm	8mm	10mm
	C ₂₂ :20	8mm	8mm	10mm
	C ₂₃ :15	-	-	-
	C ₂₄ :10	-	-	-
	C ₂₅ :8	-	-	-
PC:β-CD:Fibre (solide)	C _{5'} :200	-	15mm	12mm
	C _{6'} :150	-	14mm	-
	C _{7'} :100	-	-	-
	C _{8'} :50	-	-	-
	C _{9'} :25	-	-	-
PC:HP β-CD (solide)	C _{10'} :200	-	8mm	-
	C _{11'} :150	-	8mm	-
	C _{12'} :100	-	6mm	-
	C _{13'} :50	-	7mm	-
	C _{14'} :25	-	7mm	-
PC:HP β-CD:Fibre (solide)	C _{15'} :200	-	-	8mm
	C _{16'} :150	-	-	-
	C _{17'} :100	-	-	-
	C _{18'} :50	-	-	-
	C _{19'} :25	-	-	-

- non sensible



Figure.I.54. Activité antimicrobienne d'extraits avec la souche *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure.I.55. Activité antimicrobienne d'extraits avec la souche *Escherichia coli*.



Figure.I.56. Activité antimicrobienne d'extraits avec la souche *Staphylococcus aureus*.

I.6.4. Discussion

L'efficacité antibactérienne des extraits sélectifs et bruts a été réalisée a été évaluée en mesurant le diamètre d'halo d'inhibition. Les résultats obtenus et représentés sur les figures (I.54-56), d'après le tableau ci-dessus, les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que :

- Les intervalles d'inhibition de PC varient entre : (10-19mm) pour *Pseudomonas aeruginosa* et (08-09mm) pour *Staphylococcus aureus*, et aucun effet contre la bactérie souche *Escherichia coli*.
- Les intervalles d'inhibition du complexe PC: β -CD (liquide) varient entre : (08-09mm) pour *Staphylococcus aureus*, et aucun effet contre la bactérie souche *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.
- Les intervalles d'inhibition du complexe PC: β -CD:Fibre (liquide) varient entre : (09-10mm) pour *Pseudomonas aeruginosa* et (09-11mm) pour *Staphylococcus aureus*, et aucun effet contre la bactérie souche *Escherichia coli*.
- Les intervalles d'inhibition du complexePC:HP β -CD:Fibre (liquide) varient entre : (08-10mm) pour *Escherichia Coli*, (08mm) pour *Pseudomonas aeruginosa* et (10mm) pour *Staphylococcus aureus*.

- Les intervalles d'inhibition du complexe PC: β -CD:Fibre (solide) varient entre : (14-15mm) pour *Pseudomonas aeruginosa* et (12mm) pour *Staphylococcus aureus*, et aucun effet contre la bactérie souche *Escherichia coli*.
- Les intervalles d'inhibition du complexe PC:HP β -CD (solide) varient entre : (06-08mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*, et aucun effet contre la bactérie souche *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.
- Les intervalles d'inhibition du complexe PC:HP β -CD:Fibre (solide) il existe une seule zone d'inhibition (8mm) de *Staphylococcus aureus*.

D'après les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par la PC et ses complexes, on conclut:

- la PC exerce l'effet le plus important avec une zone d'inhibition qui atteint 19 mm de diamètre contre la souche *Pseudomonas aeruginosa*,
- Moins d'activité sur le composé PC:HP- β -CD:Fibre (solide).
- L'ajout de β -CD a montré une activité modérée sur le complexe PC: β -CD(liquide) contre la souche *Staphylococcus aureus*.
- l'ajout de HP- β -CD a montré une activité modérée contre la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* avec différentes concentrations.
- le composé PC et HP- β -CD et fibre (liquide) a montré une activité contre toutes les souches bactériennes à des concentrations élevées ; contrairement au composé à l'état solide, il n'a pas présenté d'activité efficace sauf contre la souche *Staphylococcus aureus*.
- alors que le composé PC: β -CD:Fibre à l'état solide et à l'état liquide a fourni une activité modérée contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.
- Toutes les souches n'ont montré aucun effet contre la souche pathogène d'*E. coli* à l'exception de PC : HP- β -CD (liquide), où la souche a été inhibée.
- Nous concluons que le composé la matrice (PC:HP β -CD:fibre) (liquide) est le plus actif et le plus efficace contre les trois souches.

I.7. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons concentré nos travaux sur les méthodes d'extraction de la PC (Extraction par macération dans le mélange glycérol/Eau), aussi bien que les paramètres physiques et chimiques (pH, température et lumière naturelle et lumière forcée) susceptibles d'influencer la stabilité du PC.

D'après les résultats et les données obtenus, nous concluons que la PC est plus stable au pH=7 et à la température 40°C, Quant à l'effet de la lumière, nous avons remarqué que la combinaison du β -CD et/ou du HP- β -CD et la fibre peut protéger la dégradation et le changement de couleur de la PC pour une période dépasse le mois. Pour la dégradation forcée, l'absorbance est stable en présence de la β -CD et de la fibre. Et nous avons aussi formé des complexes d'inclusion par mélange physique, malaxage, Micro-ondes, Ultrasons en présence de la β -CD et/ou HP- β -CD et de la fibre, les résultats ont montré que l'ajout de la β -CD a amélioré la stabilité de la PC et d'une façon importante lors de l'ajout de la fibre.

Concernant les résultats de l'activité antioxydante, ont montré des valeurs et une efficacité significatives de cet extrait et ses complexes et matrices ; d'après les résultats de l'activité antibactérienne nous concluons que la matrice (PC:HP- β -CD:fibre) (liquide) est la plus active et la plus efficace contre les trois souches (*E.coli*, *P. aerogenosa* , *S. aureus*).

- [1]. Pottcher F. (2014). *Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications*. (brevetWO 2014045177 A1)
- [2]J.S Patil, D.V Kadam, S.C Marapur, M.V Kamalapur, Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2 (2010) 29-34.
- [3].P.S Mohanachandran, P.G Sindhumol, T.S Kiran, Enhancement of solubility and dissolution rate, *An overview Muvattupuzha, Kerala, India*. ISSN 0976-8157,(2010).
- [4]S.Zidane, A Maiza, H. Bouleghlem,W. Herizi, S. Dahmani, Investigation of Cyclodextrin Inclusion Compounds Using FT-IR, SEM and X-Ray Diffraction. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 7(3) (2016) 182-185.
- [5].FengTian, David Buso, Tongming Wang, Manuel Lopes, UrbainNiangoran and Georges Zissis. Effect of red and blue LEDs on the production of phycocyanin by *SpirulinaPlatensis* based on photosynthetically active radiation.. *Journal of Science and Technology inLighting*, 2017, 41 : 148-152. doi: 10.2150/jstl.IEIJ160000597
- [6]. S. Zidane, A. Maiza, H. Bouleghlem, B. Fenet, Y. Chevalier. *J. Incl. Phenom. Macrocycl.Chem*, 2019, 93, 253 – 264.
- [7].H. Bouleghlem, N-E. Aouf, S. Zidane, H. Cherifi. *Indian J. Heterocycl. Chem*.2020, 30(2), 171 – 179.
- [8]. Popielec A, Loftsson T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. *Int J Pharm*. 2017 Oct 15;531(2):532–42.
- [9].Popovici, C., I. Saykova, and B. Tylkowski, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. 2010.
- [10]. Bounatirou, S., et al., Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chemistry*, 2007. 105(1): p. 146-155.
- [11].Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an ocoli Infection, E. E.
- [12]. Nelson, D. E., & Young, K. D. (2000). Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 182(6), 1714-1721.
- [13]. Taylor, T. A., &Unakal, C. G. (2021). *Staphylococcus aureus*.In *StatPearls [Internet]*.StatPearls Publishing.

Références bibliographiques

- [14]. Tran, N., Mir, A., Mallik, D., Sinha, A., Nayar, S., & Webster, T. J. (2010). Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine*, 5, 277
- [15]. Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular medical microbiology* (pp. 753-767). Academic Press.
- [16]. *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique à balayage de Wikipédia
- [17]. BAUER, A.W.M. MKIRBY, JC ; 1996. Sherris and microalgae spirulina platensis. *Revista de Ciencia M. Turc. Antibiotic susceptibility testing by a Farmaceuticas Basicae Aplicada, Araraquara, standardized single disk method. Amer. J. Clin. 30(3) 97-301. Pathol., 45(4) :493-496.*

Depuis la nuit des temps, il existe sur terre une source nutritionnelle et thérapeutique naturelle sans égale. Richesse protéique, acides aminés essentiels, acides gras essentiels, complexes vitaminiques multiples, fer biodisponible, activités antioxydantes, anti inflammatoires, anticancéreuses, antivirales, immunomodulatrices, tout ceci condense dans une simple algue bleue microscopique nommée *Spirulina platensis*.

Dans la première partie nous avons décrit tous les aspects biologiques de la *Spiruline* (morphologique, taxonomique, cycle biologique, écologique et enfin la composition chimique de la *Spiruline*). Cette description nous a permis de constater la grande plasticité morphologique et son adaptation exceptionnelle dans des milieux très variés et surtout hostiles (température, lumière, pH et salinité élevées).

Dans la deuxième partie nous avons étudié des molécules présentes dans le phycobilisome des microalgues, dont la PC, qui a suscité le plus d'intérêt, en raison de son caractère hydrophile, non-toxique, ainsi que son large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques. Bien que la PC ait, déjà, montré un grand potentiel d'utilisation, une partie de ce potentiel bioactif n'est, certainement, pas encore totalement exploité, en raison des limitations rencontrées lors de sa production et sa purification combinées aux limitations liées à son caractère thermosensible. Ce mémoire vise à discuter des propriétés et applications de base et modernes du PC. En outre, les méthodes d'extractions et la stabilité de la PC sont discutés, le but de ce travail était d'apporter l'état de l'art des méthodes d'extraction PC, aussi bien que paramètres physiques et chimiques (pH, température et lumière) susceptibles d'influencer la stabilité du PC. La PC est plus stable au pH variant de 5 à 7,5 et à la température 40°C, en raison de la variété des méthodes de séparation de la PC, ceci être moins stable et pure, c'est pourquoi du la β -CD et la fibre ont été ajouté, c'est ce dont nous avons parlé dans la troisième partie, les résultats ont montré que l'ajout de la β -CD a amélioré la stabilité de la PC et d'une façon importante lors de l'ajout de la fibre. Par conséquent, une enquête plus approfondie peut se concentrer sur l'évaluation de nouvelles molécules, afin de mieux comprendre le comportement de PC sous différentes conditions de traitement et stratégies de conception pour augmenter les applications de PC dans les formulations alimentaires. Concernant les résultats de l'activité antioxydante ont montré des valeurs et une efficacité significatives de cet extrait et ses complexes et matrices ; d'après les résultats de l'activité antibactérienne nous concluons que la matrice (PC:HP- β -CD:fibre) (liquide) est la plus active et la plus efficace contre les trois souches (*E.coli*, *P. aerogenosa*, *S. aureus*). Et alors, d'après cette étude la PC et la matrice à base de fibre possède une activité biologique importante qui permet de lui conférer une valeur nutritionnelle et pharmacologique.

Conclusion générale

L'ouverture des perspectives pour être un médicament, un déjeuner et un traitement future réussis et répandus, pour prévenir l'apparition de maladies comme les maladies cardiovasculaires, les cancers ou les infections virales, mais aussi pour réduire les effets secondaires des traitements pharmacologiques lourds comme les antinéoplasiques. La *Spirulina platensis* apparaît comme l'aliment santé de demain. Au vu de tous ces éléments, l'algue bleue semble donner tout son sens au célèbre aphorisme d'Hippocrate : « *Que ta nourriture soit ton médicament* ».

Résumé

L'algue bleue vert *Arthrospira platensis* communément appelée spiruline est cultivée et commercialisée dans le monde sous différentes souches et formes, largement connue dans le domaine nutritionnel et thérapeutique en raison de sa richesse en éléments nutritifs principalement les protéines ainsi qu'une large gamme de composés bioactifs à propriétés fonctionnelles antioxydantes. Nos travaux ont porté principalement sur l'étude des propriétés distinctives de la phycocyanine (PC), (anti-oxydantes, anti antibactérienne). En raison de ses propriétés, la PC est considérée comme étant une biomolécule hautement exploitable en industrie et ses applications biotechnologiques. Ce travail vise à discuter les méthodes d'extractions, aussi bien que les paramètres physiques et chimiques (pH, température et lumière) susceptibles d'influencer la stabilité du PC (en présence de la β -CD et/ou β -CD et une fibre). Les résultats ont montré que l'ajout de la β -CD a amélioré la stabilité de la PC et d'une façon importante lors de l'ajout de la fibre. Les résultats de l'activité antioxydante ont montré des valeurs et une efficacité significatives de cet extrait et ses complexes et matrices ; d'après les résultats de l'activité antibactérienne nous concluons que la matrice (PC:HP- β -CD:fibre) (à l'état liquide) est la plus active et la plus efficace contre les trois souches (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus aureus*). Et alors, d'après cette étude la PC et la matrice à base de fibre possède une activité biologique importante qui permet de lui conférer une valeur nutritionnelle et pharmacologique. Ce qui ouvre des perspectives pour être un médicament, un déjeuner et un traitement futur réussis et répandus.

Mots clés: *Arthrospira platensis*, spiruline, phycocyanine, méthode d'extraction, culture, stabilité.

Abstract

The blue-green algae *Arthrospira platensis* commonly known as spirulina is cultivated and marketed worldwide in different strains and forms, widely known in the nutritional and therapeutic field due to its richness in nutrients mainly proteins as well as a wide range of compounds bioactives with antioxidant functional properties. Our work has mainly focused on the study of the distinctive properties of phycocyanin (anti-oxidant, anti-antibacterial). Because of its properties, PC is considered to be a highly exploitable biomolecule in industry and its biotechnological applications. This work aims to discuss the extraction methods, as well as the physical and chemical parameters (pH, temperature and light) likely to influence the stability of PC (in the presence of β -CD and/or β -CD and a fiber). The results showed that the addition of β -CD improved the stability of PC and significantly when adding fiber. Antioxidant activity results showed significant values and efficacy of this extract and its complexes and matrices; from the results of the antibacterial activity we conclude that the matrix (PC:HP- β -CD:fiber) (liquid) is the most active and the most effective against the three strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus aureus*). And then, according to this study, the phycocyanin and the fiber-based matrix have an important biological activity which makes it possible to confer on it a nutritional and pharmacological value. This opens prospects to be a successful and widespread medicine, lunch and future treatment.

Keywords: *Arthrospira platensis*, spirulina, phycocyanin, extraction method, culture, stability

ملخص

يتم زراعة وتسويق الطحالب الزرقاء والخضراء *Arthrospira platensis* المعروفة باسم سبيرولينا في جميع أنحاء العالم في سلالات وأشكال مختلفة ، وهي معروفة على نطاق واسع في المجال الغذائي والعلاجي نظرًا لغناها بالعناصر الغذائية بشكل أساسي البروتينات بالإضافة إلى مجموعة واسعة من المركبات النشطة بيولوجيا مع مضادات الأكسدة الوظيفية. ركز عملنا بشكل أساسي على دراسة الخصائص المميزة للفيكوسيانين (مضاد للأكسدة ، مضاد للجراثيم). بسبب خصائصه، يعتبر جزيء حيوي قابلاً للاستغلال في الصناعة وتطبيقات التكنولوجيا الحيوية. يهدف هذا العمل إلى مناقشة طرق الاستخراج ، بالإضافة إلى الخصائص الفيزيائية والكيميائية (الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والضوء) التي من المحتمل أن تؤثر على استقرار الفيكوسيانين (في وجود β -CD و / أو β -CD والألياف). أظهرت النتائج أن إضافة β -CD حسنت من ثبات الفيكوسيانين وبشكل ملحوظ عند إضافة الألياف. أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة قيمًا وفعالية لهذا المستخلص ومركباته ومصفوفاته ؛ من نتائج النشاط المضاد للبكتيريا نستنتج أن المصفوفة (PC: HP- β -CD:Fiber) (الحالة السائلة) هي الأكثر نشاطًا والأكثر فاعلية ضد السلالات الثلاثة (*Escherichia coli*، *Pseudomonas aerogenosa*، *Staphylococcus aureus*). ثم ، وفقًا لهذه الدراسة ، يكون الفيكوسيانين والمصفوفة القائمة على الألياف نشطًا بيولوجيًا مهمًا يجعل من الممكن إضفاء قيمة غذائية ودوائية عليها. وهذا يفتح آفاق أن يكون الدواء والغذاء والعلاج المستقبلي ناجحًا وواسع الانتشار.

الكلمات المفتاحية: *Arthrospira platensis*؛ سبيرولينا ، فيكوسيانين ، طريقة الاستخلاص ، الزراعة ، الاستقرار.