

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM–**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de  
l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :  
synthèse et activités biologiques

**Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie**

Option : **Biochimie**

Thème :

***Composition chimique et recherche des activités  
biologiques de la spiruline (Spirulina platensis)***

**Présenté par : M<sup>elle</sup> MAHMOUDI Insaf Abir**

Soutenu le **13/06/2022** devant les membres de jury :

<b>Président :</b>	Mr. CHAUCHE Mohammed Tarik	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
<b>Encadreur :</b>	Mr. AZZI Rachid	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examinatrice:</b>	M <sup>elle</sup> MEZOUAR Dounia	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2021/2022**

## ملخص

منذ آلاف السنين، فرضت الطحالب الدقيقة نفسها على الكوكب من خلال مظهرها وحيويتها وغموضها.

سبيرولينا بلاتنسيس، طحالب دقيقة زرقاء وخضراء تم تحديدها على أنها لولبية، هي جزء من عائلة البكتيريا الزرقاء الخيطية. يمثل هذا الكائن الحي الصغير مصدرًا محتملاً غنيًا بالعناصر الغذائية بما في ذلك البروتينات والدهون والكربوهيدرات والمعادن (خاصة الحديد) والأحماض الدهنية الأساسية والفيتامينات والأصبغ: يبدو أن بروتين الفيكوسيانين والكاروتين والكلوروفيل يلعب دورًا مهمًا في تحسين الوظائف من جسم الإنسان.

يبدو أيضًا أن السبيرولينا هي الاستجابة المثالية "لأمراض القرن". أثارت النتائج المتسقة فيما يتعلق بالأنشطة الحيوية اهتمامًا متزايدًا بتقييم إمكانات السبيرولينا كغذاء علاجي.

في هذا الصدد، درس العديد من الباحثين الآثار المفيدة للسبيرولينا وأفادوا بإمكانية تحسين الإنتاج والأداء الإنجابي، والصحة العامة وتقليل المشاكل المتعلقة بأمراض مختلفة مثل التهاب المفاصل والسكري وفقر الدم وارتفاع ضغط الدم واضطرابات القلب والأوعية الدموية. أظهرت دراسات أخرى أن السبيرولينا لها أنشطة بيولوجية واعدة مثل مضادات الأورام ومضادات الميكروبات والفيروسات ومضادات الالتهابات ونقص الكوليسترول في الدم،

يمكن أن تُعزى هذه الخصائص الصيدلانية والطبية للسبيرولينا إلى بعض المكونات الطبيعية مثل الفيكوسيانين والكاروتين والتوكوفيرول وحمض اللينولينيك والمركبات الفينولية التي ثبت أن لها خصائص قوية مضادة للأكسدة والقدرة على البحث عن أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) مثل الأكسيد الفائق وجذور بيروكسيد الهيدروجين.

في هذا السياق، نحن مهتمون بتوصيف وتحديد الجزيئات النشطة بيولوجيًا الموجودة في هذه الطحالب الدقيقة.

في ضوء كل هذه العناصر، يبدو أن الطحالب الزرقاء تعطي المعنى الكامل للقول المأثور الشهير لأبقراط: "اجعل طعامك هو دوائك".

الكلمات المفتاحية: سبيرولينا بلاتنسيس، فيكوسيانين، مركبات فينولية، اختبارات كيميائية نباتية، نشاط مضاد للأكسدة.

# Résumé

Depuis des milliers d'années, les microalgues se sont imposées sur la planète par leur aspect, leur exubérance et leur mystère.

*Spirulina platensis*, une microalgue bleu-vert identifiée comme étant spirale, fait partie de la famille des cyanobactéries filamenteuses. Ce petit être vivant représente une source potentielle riche en nutriments notamment les protéines, les lipides, les glucides, des minéraux (notamment du fer), des acides gras essentiels, des vitamines et des pigments : la protéine phycocyanine, le carotène et la chlorophylle, semblent jouer un rôle important dans l'amélioration des fonctions du corps humain.

La spiruline apparaît d'autre part comme la réponse idéale aux "maladies du siècle". Des résultats cohérents concernant ses bioactivités ont suscité un intérêt croissant pour l'évaluation du potentiel de la spiruline en tant qu'aliment thérapeutique.

À cet égard, de nombreux chercheurs ont étudié les effets bénéfiques de la spiruline et ont signalé son potentiel d'amélioration des performances de production et de reproduction, de l'état de santé général et de la réduction des problèmes liés à différentes maladies comme l'arthrite, le diabète, l'anémie, l'hypertension et les troubles cardiovasculaires. D'autres études ont démontré que la spiruline possède des activités biologiques prometteuses telles que des effets antitumoraux, antimicrobiens, antiviraux, anti-inflammatoires, hypocholestérolémies. Ces propriétés pharmaceutiques et médicinales de la spiruline pourraient être attribuées à certains constituants naturels tels que la phycocyanine, le carotène, les tocophérols, l'acide linoléique et les composés phénoliques qui se sont avérés avoir de fortes propriétés antioxydantes et la capacité de piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme les radicaux superoxyde et peroxyde d'hydrogène.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la caractérisation et l'identification des molécules bioactives existantes dans cette microalgue.

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* ».

Mots clés : *Spirulina platensis*, phycocyanine, composés phénoliques, tests phytochimiques, activité antioxydante.

# Abstract

For thousands of years, microalgae have imposed themselves on the planet by their appearance, their exuberance and their mystery.

*Spirulina platensis*, a blue-green microalgae identified as spiral, is part of the filamentous cyanobacteria family. This small living being represents a potential rich source of nutrients including proteins, lipids, carbohydrates, minerals (notably iron), essential fatty acids, vitamins and pigments: the protein phycocyanin, carotene and chlorophyll, seem to play an important role in improving the functions of the human body.

*Spirulina* appears to be the ideal answer to the "diseases of the century". Consistent results regarding its bio-activities have led to a growing interest in evaluating the potential of spirulina as a therapeutic food.

In this regard, many researchers have investigated the beneficial effects of spirulina and reported its potential to improve production and reproductive performance, general health status and reduce problems related to various diseases such as arthritis, diabetes, anemia, hypertension and cardiovascular disorders. Other studies have shown that spirulina has promising biological activities such as anti-tumor, anti-microbial, anti-viral, anti-inflammatory, hypocholesterolemia effects.

These pharmaceutical and medicinal properties of spirulina could be attributed to some natural constituents such as phycocyanin, carotene, tocopherols and phenolic compounds which have been shown to have strong antioxidant properties and the capacity of scavenging reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radicals and hydrogen peroxide

It is in this context that we are interested in the characterization and identification of bioactive molecules existing in this microalgae.

In view of all these elements, blue-green algae seem to give full meaning to the famous aphorism of Hippocrates: "Let your food be your medicine".

Keywords: *Spirulina platensis*, phycocyanin, phenolic compounds, phytochemical tests, antioxidant activity.

# Liste des figures

Figure 1 : Observation microscopique des filaments de spiruline .....	5
Figure 2 : Structure chimique de la phycocyanine, comparée à celle de la bilirubine.....	19
Figure 3 : Forme réduite du radical DPPH• .....	34

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution géographique naturelle de <i>Spirulina platensis</i> .....	7
Tableau 2 : Teneur moyenne et principales fonctions des acides aminés de la spiruline .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Tableau 3 : Composition en acides gras de la spiruline .....	11
Tableau 4 : Teneur moyenne dans 10g de spiruline et les principales fonctions des vitamines hydrosolubles .....	13
Tableau 5 : Teneur moyenne et principales fonctions des minéraux et des oligoéléments de la spiruline.....	16

# Liste des Abréviations

- AA** : Acides Aminés
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- AGL** : Acide Gamma Linoléique
- AGPI** : Acide Gras Polyinsaturés
- AJR** : Apports Journaliers Recommandés
- ARN** : Acide Ribonucléique
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BHT** : Butylhydroxytoluène
- Ca-Sp** : Spiruline Calcique
- CAT** : Capacité Antioxydante Totale
- CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice de 50 % d'une activité
- COX** : Cyclooxygénase
- DGDG** : Digalactosyl Diacylglycérol
- DPPH•** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- EAG** : Equivalent acide gallique
- EAG/g MS** : Equivalent acide gallique par gramme de la matière sèche
- EOA** : Espèces activées de l'oxygène
- EPO** : Erythropoïétine
- ERN** : Espèces réactives du nitrogène
- ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- FAO** : Food and Agriculture Organization
- GPx** : Glutathion Peroxydase
- GR** : Globules Rouges
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- IL-4** : Interleukine 4
- INT** : Iodophenyl-3-(4-nitrophénol) -5-phenyl tétrazolium

**LDL** : Low Density Lipoprotein  
**MCV** : Maladies Cardiovasculaires  
**MGDG** : Monogalactosyl Diacylglycérol  
**MS** : Matière sèche  
**NAC** : N-acétylcystéine  
**NADPH** : Nictotinalide Adénosine Dinucléotide Phosphate  
**Na-Sp** :Spirulane Calcique  
**NO•** : Oxyde nitrique  
**NOS** : Nitrite Oxyde Synthase  
**OH•** : Radical hydroxyle  
**ONG** : Organisation Non Gouvernementale  
**ONOO<sup>-</sup>** : Anion peroxydenitrite  
**PI** : Pourcentage d'inhibition  
**SOD** :Super Oxyde Dismutase  
**SQDG** : Sulfoquinovosyl Diacylglycérol  
**TBHQ** : Tert-butylhydroquinone  
**TCA** : Temps de Céphaline Activée  
**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor - alpha  
**TP** : Temps de Prothrombine  
**tr** :Temps de rétention  
**UV** : Ultra Violet  
**X-XOD** : Xanthine/xanthine oxydase

# Table des matières

ملخص.....	
Résumé.....	
Abstract .....	
Liste des figures .....	
Liste des tableaux.....	
<i>Introduction</i> .....	12
<i>Partie bibliographique</i> .....	4
Chapitre I : Spirulina platensis.....	5
1. Présentation et description de la spiruline .....	5
2. Morphologie et caractéristiques structurales .....	5
3. Classification taxonomique .....	6
4. Répartition géographique .....	6
5. Composition biochimique.....	7
5.1. Protéines .....	8
5.2. Lipides .....	10
5.2.1. Fraction saponifiable .....	10
5.2.2. Fraction insaponifiable .....	11
5.3. Glucides .....	12
5.4. Acides nucléiques .....	13
5.5. Vitamines.....	13
5.5.1. Vitamines hydrosolubles .....	13
5.6. Minéraux et oligoéléments .....	15
5.7. Enzymes.....	17
5.8. Pigments .....	17
5.8.1. Les caroténoïdes .....	17
5.8.2. La chlorophylle.....	18
5.8.3. La phycocyanine.....	18
5.8.4. La porphyrine .....	20
6. Utilisation thérapeutique et traditionnelle de la microalgue.....	20
6.1. Histoire et utilisation traditionnelle de la spiruline .....	20
6.2. Utilisation thérapeutique.....	20
7. Production et commercialisation de la spiruline.....	22
Chapitre II : Radicaux libres et espèces réactives d'oxygène .....	23

1. Stress oxydant.....	24
2. Les dommages causés par le stress oxydant.....	24
2.1. Les principales cibles biologiques des EOA .....	24
2.1.1. L'ADN.....	24
2.1.2. Les protéines.....	25
2.1.3. Les lipides membranaires .....	25
2.1.4. Les lipoprotéines.....	25
3. Les maladies causées par le stress oxydant .....	26
4. Les antioxydants.....	26
4.1. Sources d'antioxydants.....	26
4.1.1. Source endogène.....	27
4.2.1. Source exogène (alimentaire) .....	27
5. Différents types d'antioxydants .....	28
5.1. Antioxydants synthétiques.....	28
5.2. Antioxydants naturels employés.....	29
<i>Méthodologie</i> .....	30
1. Méthode d'extraction de la phycocyanine .....	31
2. Le dosage des composés phénoliques .....	33
3. Capacité antioxydante totale (CAT).....	34
4. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	34
5. Pouvoir réducteur du fer (test de FRAP).....	35
6. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	34
7. Détermination de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) .....	36
<i>Résultats et discussions</i> .....	37
1. Extraction de phycocyanine .....	38
2. Etude phytochimique.....	39
2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	39
2.2. Identification des polyphénols par HPLC .....	39
3. Activités biologiques.....	41
3.1. Effet neuroprotecteur .....	41
3.2. Effet rénoprotecteur.....	41
3.3. Effet protecteur cardiovasculaire .....	42
4. Activité antioxydante .....	39
4.1. Piégeage du radical libre DPPH•.....	39
4.2. Pouvoir réducteur du fer .....	40

4.3. Détermination de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) .....	40
<i>Conclusion générale et perspectives</i> .....	43
<i>Références bibliographiques</i> .....	46

# **Introduction**

Lorsque l'on pense aux bactéries, on pense généralement aux germes - des agents pathogènes qui menacent la santé humaine. Mais en réalité, elles rendent la vie sur terre possible. Un groupe de bactéries très répandus – les cyanobactéries – également connues sous le nom d'algues bleu-vert, a complètement transformé l'environnement de la terre au cours de sa longue histoire (**Ehrenreich et al., 2005**). Il y a trois milliards d'années, les ancêtres des cyanobactéries ont injecté l'atmosphère de la terre avec le produit de leur photosynthèse - l'oxygène - modifiant ainsi la chimie de la planète et ouvrant la voie à l'évolution de formes de vie entièrement nouvelles qui respirent de l'oxygène (**Nakao et al., 2010**).

Depuis les temps les plus reculés, d'anciennes civilisations chinoise et, au nouveau monde, de celle des Aztèques du Mexique et des Incas du Pérou ont eu recours à l'usage des microalgues pour nombreux effets, spécialement leurs effets thérapeutiques et nutritionnelles. L'Homme s'est soigné avec ces algues qu'il avait à sa disposition, guidé certainement par le hasard, la superstition et surtout l'expérience et il a cherché des moyens d'assouvir sa faim (**Djimli 2013**).

C'est à travers les siècles, que les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation de ces molécules thérapeutiques. Elles ont toutes pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Larousse des plantes médicinales, 2002**).

Malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique, environ 80% de la population mondiale profite encore des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes et d'algues, reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres (**El Rhaffari et Zaid, 2004**). Une étude a montré qu'on y trouve plus de 25000 d'espèces de microalgues utilisées par la phytothérapie traditionnelle et moderne à travers le monde, dont 15 seulement sont exploitables (**Raja et al., 2008**).

D'autre part, les antioxydants jouent un rôle important dans la prévention des maladies et dans la conservation. Et parce que certains antioxydants synthétiques ont montré un risque potentiel pour la santé (**Safer et Al-Nughamish, 1999**), il est temps de trouver de nouvelles sources d'antioxydants peu dangereuses et peu coûteuses, naturelles, pour les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques et remplacer ainsi les antioxydants synthétiques.

Les membres de la famille d'*Oscillatoriaceae* représentés par le genre « *Spirulina* », sont connus pour leurs nombreux usages en thérapie dans le monde. La présente étude vise à contribuer à la valorisation de l'une de ces sous espèces, *Spirulina platensis*, qui est réputée

par sa teneur élevée en protéines, de lipides, de minéraux, d'oligoéléments, d'acides nucléiques, de glucides et de pigments à l'origine de plusieurs propriétés. Néanmoins ; elle reste peu étudiée dans la littérature sur le plan local. Et tout en sachant que le milieu désertique peut être un facteur favorable pour la production de métabolites secondaires dotés de nombreuses activités biologiques (**Timmermann et al., 1984**), notre choix s'est porté sur l'investigation de cette algue.

Notre étude est échelonnée à travers un mémoire de trois parties :

La première partie nous permettra de découvrir la spiruline, son histoire, sa classification, sa composition et ses principaux domaines d'application ainsi que sa commercialisation.

La deuxième partie sera consacrée à des généralités sur le stress oxydant et les antioxydants.

La troisième partie présente une bibliographie des études antérieures des différentes méthodes d'extraction des molécules bioactives pour en déduire leurs activités biologiques.

Enfin, le manuscrit est ponctué d'une conclusion et des perspectives.

## **Partie bibliographique**

## Chapitre I : *Spirulina platensis*

### 1. Présentation et description de la spiruline

*Spirulina platensis*, une microalgue bleu-vert autotrophe, classée parmi les cyanobactéries et appartient à la famille des *Oscillatoriaceae* (Fox, 1999).

Dotée d'un système énergétique photosynthétique, la spiruline est riche en deux pigments majoritaires : la phycocyanine (bleu) et la chlorophylle (vert) (Soni et al., 2019).

### 2. Morphologie et caractéristiques structurales

La souche *Spirulina platensis* est caractérisée par la présence des filaments pluricellulaires hélicoïdales appelés trichomes. Ces filaments sont mobiles, non ramifiés et enroulés en spirales de six à sept spires (Fox, 1999). Leur paroi est de type Gram-négatif (Girardin-Andréani, 2005).

Sa taille à l'échelle microscopique est de 250  $\mu\text{m}$  et le diamètre du trichome formé est d'environ 10 à 12  $\mu\text{m}$  (Sall et al., 1999). L'enroulement des trichomes forme une spirale d'où le nom 'Spiruline' (Charpy et al., 2008)(Figure 1).



**Figure 1** : Observation microscopique des filaments de spiruline(Jourdan, 1999)

### 3. Classification taxonomique

Les algues et précisément la spiruline, est répartie dans l'embranchement des cyanobactéries et distribuée dans le sous règne des procaryotes (**Stanier et Van Niel, 1962**). Ses pigments ne sont pas portés par des plastes mais sont diffusés dans le cytoplasme et donnent aux cellules une coloration homogène bleu-vert (**Groga, 2012**).

Selon **Ripley Fox (1999)**, la position systématique est placée comme suit :

<b>Règne</b>	Monera
<b>Sous règne</b>	Procaryote
<b>Embranchement</b>	Cyanophyta
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordre</b>	Nostocales
<b>Famille</b>	Oscillatoriaceae
<b>Genre</b>	Oscillatoria
<b>Sous-genre</b>	<i>Spirulina platensis</i>

### 4. Répartition géographique

La spiruline pousse naturellement dans des eaux chaudes, alcalines et fortement minéralisées (riches en nutriments azotés et phosphorés). Elle est très fréquente dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins des régions tropicales et semi tropicales (**Goulambasse, 2018**).

Cette cyanobactérie est omniprésente car elle occupe une région très vaste qui s'étend d'Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie, Algérie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande) (**Charpy et al., 2008**). Sa nature thermophile et ses besoins importants en lumière laisse voir cet organisme pousser même dans des lacs volcaniques (lac Quiliotoa, en Equateur) et des endroits désertiques (région de Tamanrasset) (**Elyah, 2003**).

Le tableau suivant montre quelques sites où la spiruline a été découverte (Fox, 1999).

**Tableau 1:** Distribution géographique naturelle de *Spirulina platensis*(Fox, 1999)

<b>AFRIQUE</b>	
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du Kanem : lac Katam, Leyla, Liwa
Tunisie	Lac Tunis : Chott el Jerid
Soudan	Cratère de Djebel Marra
Kenya	Lac Nakuru
Tanzanie	Lac Natron
<b>ASIE</b>	
Inde	Lac Lonar
Pakistan	Mares près de Lahore
<b>AMERIQUE DU SUD</b>	
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas
Mexique	Près de l'île d'Amantani dans le lac Titicaca
Uruguay	Montevideo
Equateur	Lac Quilotoa : cratère de 1km de diamètre
<b>EUROPE</b>	
France	Camargue
Hongrie	
<b>AUTRES SITES POSSIBLES</b>	
Bolivie	Lac Colorado, Chalviri, Poopo
Chili	Aguas Calientes, Lagunas Brava, lac Vilama
Mauritanie	Côte sud

## 5. Composition biochimique

Il existe de fortes variations dans le milieu de culture et le mode de conditionnement concernant la spiruline tel que l'existence de différentes souches de spiruline, l'origine géographique et les éléments chimiques entrant dans la composition du milieu de culture (**Falquet et Hunri, 2006 ; Charpy et al., 2008**).

Par rapport à son poids sec, la spiruline disposerait d'un taux d'environ 65 à 70% de protéines, 15 à 25% de glucides et 6 à 8% de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux (principalement des oligoéléments) et des pigments (chlorophylle, caroténoïdes et phycobiliprotéines) (**Falquet, 1996 ; Cheong et al., 2010**).

### 5.1. Protéines

L'analyse des propriétés nutritionnelles de la cyanobactérie a d'abord révélé une teneur particulière en protéines. Elle peut osciller entre 50% et 70% du poids sec.

Un aspect qualitatif de la spiruline montre que les protéines sont complètes car tous les acides aminés nécessaires s'y trouvent (**Gutierrez-Salmeán et al., 2015**), représentent 47% du poids total des protéines. Les acides aminés soufrés, la méthionine et la cystéine, ainsi que la lysine, sont certes plus faiblement représentés (**Falquet et Hunri, 2006**). Sa richesse nutritionnelle est due à ces protéines quasiment bio-assimilables à 100 % dont le corps peut presque toutes les utiliser (**Barth et Léo, 2019**).

La paroi composée de muréine confère à la spiruline une très haute digestibilité, entre 75 et 90% (**Charpy et al., 2008 ; Falquet et Hunri, 2006**).

Excepté ces protéines, la spiruline contient une quantité exceptionnelle de phycobiliprotéines, des pigments colorés intervenant dans la photosynthèse, classées en trois groupes : la phycoérythrine, l'allophycocyanine et la phycocyanine (**Lupatini et al., 2017**).

Les principales fonctions des acides aminés de la spiruline et leurs teneur moyenne sont résumées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 2** : Teneur moyenne et principales fonctions des acides aminés de la spiruline  
(Vidal, 2008 ; Vasson, 2015 ; Manet et al., 2016)

Acides Aminés (AA)	Teneur moyenne dans 10g de spiruline	Principales fonctions
AA essentiels		
Isoleucine	350 mg (50% des AJR)	-Indispensable dans le processus de croissance
Leucine	540 mg (49% des AJR)	-Stimule les fonctions cérébrales
Lysine	290 mg (36% des AJR)	-Production d'Anti corps, d'enzymes, d'hormones
Méthionine	140 mg (23% des AJR)	-Antioxydant puissant
Phénylalanine	280 mg (140% des AJR)	-Indispensable à la thyroïde
Thréonine	320 mg (64% des AJR)	-Améliore la fonction digestive et intestinale
Tryptophane	100 mg (48% des AJR)	-Contribue à la synthèse de sérotonine
Valine	400 mg (44% des AJR)	-Stimule les capacités mentales et physiques
AA non essentiels		
Alanine	470 mg	-Participe au métabolisme du glucose
Arginine	430 mg	-Participe à la sécrétion de l'hormone de croissance
Acide aspartique	610 mg	-Participe à la synthèse de plusieurs acides aminés
Cystine	60 mg	-Indispensable pour l'utilisation de la

		vitamine B6
Acide glutamique	910 mg	-Indispensable dans le métabolisme azoté
Glycine	320 mg	-Intervient dans la production de l'ADN et l'ARN
Histidine	100 mg	-Indispensable dans le processus de croissance
Proline	270 mg	-Indispensable dans la production de collagène
Tyrosine	300 mg	-Précurseurs de la dopamine, production thyroxine
Sérine	320 mg	-Indispensable à la formation des membranes des cellules,

\*AA : Acides Aminés, AJR : Apports Journaliers Recommandés.

## 5.2.Lipides

Il convient de rappeler que les lipides fait partie de 6% à 8% du poids sec de la spiruline mais peuvent atteindre jusqu'à 11%. D'un point de vue qualitatif et quantitatif, cette divergence provient essentiellement de la méthode d'extraction et l'heure de la récolte de la spiruline (**Babadzhanov et al., 2004**).

Son exceptionnelle teneur en lipides totaux constitue un équilibre stable en acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. Parmi ces acides gras, ils figurent deux fractions qui se subdivisent en fraction saponifiable (83%) et fraction insaponifiable (17%) (**Goulambasse, 2018**).

### 5.2.1. Fraction saponifiable

Cette proportion d'acide gras représente 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la spiruline (**Fox, 1999**). Elle est principalement composée de monogalactosyl-diacylglycérol (MGDG) (12%), de digalactosyl diacylglycérol (DGDG) (8%), de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (5%) et de phosphatidylglycérol (26%) (**Xue et al., 2002**). A noter que les triglycérides, la

phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol sont présents qu'en très faible taux (**Charpy et al., 2008**).

La composition de la spiruline se caractérise par la présence d'une forte concentration combinée en acide alpha-linoléique (oméga 3) et l'acide linoléique (oméga 6). Ces substances essentielles jouent un rôle primordial dans le maintien du système nerveux, cardiovasculaire, immunitaire et les réactions allergiques (**Vidé, 2015**).

L'acide gamma-linoléique (AGL, oméga-6) constitue environ 20% des acides gras totaux. Cet acide gras est intéressant comme précurseur des prostaglandines, des thromboxanes, des leucotriènes et médiateurs des réactions inflammatoires et immunitaires. Ces caractéristiques remarquables font en sorte que la spiruline soit considérée comme la source idéale des oméga 3, oméga 6 et plus précisément l'acide gamma-linoléique (**Gutiérrez-Salmeán et al., 2015**)(Tableau 3).

**Tableau 3** : Composition en acides gras de la spiruline(**Vidé, 2015**)

Composition	% AJR pour 10g de spiruline
<b>Acide palmitique (C16 : 0)</b>	25,8
<b>Acide palmitoléique (C16 : 1)</b>	3,8
<b>Acide stéarique (C18 : 0)</b>	1,7
<b>Acide oléique (C18 : 1)</b>	16,6
<b>Acide linoléique (C18 :2)</b>	40,1
<b>Acide gamma-linoléique (C18 : 3)</b>	40,1

### 5.2.2. Fraction insaponifiable

Les lipides insaponifiables représentent 1,1 à 1,3 % de la matière sèche de la spiruline. Ils regroupent des stérols, des terpènes et des hydrocarbures saturés (paraffines). La présence de certains stérols peut expliquer en partie l'activité antimicrobienne de cette cyanobactérie. La propriété odoriférante de la microalgue est due aux terpènes. Quant aux paraffines, elles sont apportées par une source d'alimentation (**Fox, 1999**).

### 5.3. Glucides

Les glucides constituent 15% à 25% de la matière sèche de *Spirulina platensis*. Appelés aussi hydrates de carbone, ils composent la paroi cellulaire des spirulines en s'associant à celles des bactéries gram négatif (**Falquet et Hunri, 2006**).

Les polymères essentiels retrouvés au sein de la spiruline sont la glucosamine, le rhamnose et le glycogène. Ces derniers sont facilement absorbables au sein de l'organisme (**Babadzhanov, 2004**).

La spiruline est composée de polysaccharides complexes sulfatés et spécifiques qui possèdent des propriétés antivirales et anticoagulantes (**Furmaniak et al., 2017**). On cite :

- La spirulane calcique (Ca-Sp) : un polysaccharide composé de rhamnose, fructose et en quantité moindre de ribose, mannose, glucose, xylose, soufre et calcium. Il a un effet antiviral contre le virus de l'herpès de type 1, la rougeole, oreillons, grippe et VIH (**Lee et al., 2001 ; Yamamoto et al., 2003**).
- La spirulane sodique (Na-Sp) : présente un effet antithrombine sur le système de coagulation sanguine fibrinolytique par l'activation du facteur 2 de l'héparine (**Yamamoto et al., 2003**).

Une substance glucidique appartenant aux cyclitols, le méso-inositol phosphate est qualifié d'une source excellente de phosphore (**Falquet et Hunri, 2006**).

L'immulina® est un extrait commercial de spiruline. C'est un polysaccharide de haut poids moléculaire qui a été étudié pour ses propriétés immunomodulatrices et antimicrobiennes.

Cependant les glucides simples comme le glucose, le fructose, et le saccharose, en ajoutant les polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, ne sont présents qu'en très faibles quantités. C'est pour cette raison la spiruline est peu calorique (**Ahounou, 2018**).

## 5.4. Acides nucléiques

Les acides nucléiques présents dans la spiruline sont ADN (30%) et l'ARN (70%). Une source alimentaire riche en acides nucléiques induit la dégradation biochimique des purines pour produire l'acide urique (**Charpy et al., 2008**).

## 5.5. Vitamines

*Spirulina platensis* est riche en deux types de vitamines selon leurs propriétés de solubilité. Elle contient 4 vitamines liposolubles (A, D, E, K) et 9 hydrosolubles (B1, B2, B3, B5, B6, B12, C). Ce sont des substances nutritives vitales et sans valeur énergétique décrites dans la prévention contre des maladies telles que les pathologies osseuses, maladies cardiovasculaires, le cancer et les malformations fœtales (**Manet, 2016**).

Les AJR en provitamine A sont d'environ 15 à 24 milligrammes par jour : un apport quotidien de cinq grammes de spiruline répond à plus 1000% de l'AJR. Un apport quotidien de cinq grammes de spiruline répond à plus 300% de l'AJR équivalent à 0,2 milligrammes par jour (**Manet, 2016**)

### 5.5.1. Vitamines hydrosolubles

La plupart des vitamines hydrosolubles et spécialement les vitamines du groupe B sont transformées en co-enzymes et parfois en cofacteurs intervenant dans la synthèse des hormones et des enzymes, la production de l'énergie et la transmission d'influx nerveux (**Cnera-Afssa, 2001**). La teneur moyenne et les principales fonctions des vitamines hydrosolubles contenus dans la spiruline sont regroupés dans le **tableau 4** :

**Tableau 4** : Teneur moyenne dans 10g de spiruline et les principales fonctions des vitamines hydrosolubles (Manet,2016).

Vitamines hydrosolubles	Teneur moyenne dans 10gde spiruline	Principales fonctions
<b>B1 (thiamine)</b>	0,35 mg (30% des AJR)	-Transmission d'influx nerveux -Assimilation des glucides
<b>B2 (riboflavine)</b>	0,35 mg (21% des AJR)	-Production d'énergie par le métabolisme des glucides et lipides. -Croissance des tissus (peau et muqueuses) -Vision
<b>B3 (niacine, PP)</b>	1,46 mg (9% des AJR)	-Production d'énergie -Transmission de l'influx nerveux
<b>B5 (panthoténate)</b>	0,5-10mg (10% des AJR)	-Croissance des tissus (peau, cheveux, muqueuses) -Favorise la production d'énergie
<b>B6 (pyridoxine)</b>	0,08 mg (5% des AJR)	-Synthèse des neurotransmetteurs -Métabolisme des protéines
<b>B8 (biotine)</b>	0,5 µg (0.5% des AJR)	-Métabolisme : protéines, lipides, glucides -Synthèse des vitamines B9 et B12
<b>B9 (acide folique)</b>	0,01 mg (2.5 % des AJR)	-Renouvellement de toutes les cellules -Synthèse des neuromédiateurs -Indispensable à la synthèse des globules rouges et oxygénation cellulaire
<b>B12 (cobalamine) *</b>	0,015-0,032 (1000% des AJR)	-Formation des GR (anti anémique) -Renouvellement cellulaire

Il faut souligner la biodisponibilité réelle d'un complexe en vitamine B12 sous forme active dans la spiruline (Falquet et Hunri, 2006). En industrie pharmaceutique, les cyanobactéries utilisées en compléments alimentaires sont basées d'un analogue de B12 qui est inactive(Watanabe, 2007).

## 5.6. Minéraux et oligoéléments

La spiruline contient tous les minéraux essentiels environ 7% du poids sec. Une variation quantitative remarquable réside entre les oligoéléments et les éléments minéraux ; ceci conclue la haute disponibilité des minéraux vis-à-vis des oligoéléments qui sont présents à l'état trace (**Manet, 2016**).

Les macronutriments et micronutriments résidants dans *Spirulina platensis* sont respectivement:

- **Les sels minéraux** : le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore et le soufre.
- **Les oligoéléments** : le fer, le zinc, le chrome, le manganèse, le sélénium, le cobalt et le bore (**Manet, 2016**).

Les minéraux et les oligoéléments présents dans la spiruline sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 5** : Teneur moyenne et principales fonctions des minéraux et des oligoéléments de la spiruline (Manet, 2016).

Oligoéléments	Teneur moyenne dans 10g de spiruline	Principales fonctions
<b>Fer</b>	7-18 mg (50 à 100% des AJR)	-Fabrication et fonctionnement de l'hémoglobine -Constitution de myoglobine
<b>Sélénium</b>	0,1-2.55 mg (20-100% des AJR)	-Cofacteur des enzymes anti oxydantes -Stimulant de l'immunité
<b>Cuivre</b>	0,1mg (5% des AJR)	-Cofacteur de nombreuses enzymes -Anti-inflammatoire, antioxydant
<b>Manganèse</b>	0,4 mg (12% des AJR)	-Formations des os et des enzymes -Métabolisme protéines, lipides, glucides -Stabilise taux de glucose sanguin
<b>Chrome</b>	0,03-0,25 mg (16% des AJR)	-Métabolisme glucides, lipides, acides
<b>Zinc</b>	0,4 mg (4% des AJR)	-Activation de plus de 200 enzymes
<b>Potassium</b>	100-200 mg (5-10% des AJR)	-Perméabilité des membranes - Régulation du rythme cardiaque
<b>Sodium</b>	0.09 mg	-Régulation pression osmotique -Maintien de l'équilibre hydroélectrolytique et de la masse hydrique
<b>Magnésium</b>	25-50 mg (9 à 25% des AJR)	-Masse minérale du squelette osseux -Métabolisme glucidique et lipidique (muscle, cœur, axe nerveux)
<b>Calcium</b>	130 mg (10% des AJR)	-Édification et renouvellement du squelette -Rythme cardiaque, système nerveux

<b>Phosphore</b>	67 mg (8 % des AJR)	-Masse minérale du squelette osseux
------------------	---------------------	-------------------------------------

## 5.7. Enzymes

De nombreuses enzymes entrent dans la composition de la spiruline, il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD) qui est parfaitement assimilable par la spiruline dépourvue de paroi cellulosique. Elle représente une arme majeure contre le vieillissement et les lésions cellulaires comme elle est caractérisée par un pouvoir potentiel antioxydant dans la libération des anions superoxydes (Proy, 2019).

## 5.8. Pigments

*Spirulina platensis* est munie d'un système énergétique photosynthétique qui nécessite des pigments étroitement liés à l'intensité lumineuse reçue. Ainsi, la cyanobactérie fut nommée << aliment solaire naturel >> (Vidé, 2015).

Quatre pigments protéiques accessoires se révèlent d'une manière particulière et abondante dans la composition de la spiruline.

### 5.8.1. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes, précurseurs de la vitamine A, sont un groupe de pigments non azotés naturellement colorés qui varient d'un jaune clair et fonce vers le rouge (Vidal, 2008). Cette famille comprend deux subdivisions principales :

- **Les carotènes** : les carotènes (alpha et bêta), suivi par le lycopène et le phytoène qui ne contiennent pas d'atomes d'oxygène mais uniquement des atomes d'hydrogène.
- **Les xanthophylles** : comme la lutéine, la zeaxanthine ou l'astaxanthine et la capsanthine. Celle-ci sont pourvu d'atomes d'oxygène (Nutrixeal, 2020).

Elle retient les plus grands intérêts biologiques relatifs à l'activité antioxydante. Une étude clinique a permis de démontrer que la spiruline est une source nutritionnelle privilégiée de caroténoïdes identique à une alimentation avec légumes à feuilles et de carottes. De plus, elle participe à la stimulation du système immunitaire, le ralentissement du vieillissement et la protection contre les UV (Le Guehenec, 2009).

### 5.8.2. La chlorophylle

Dans tous les organismes photoautotrophes, la chlorophylle est un pigment photosynthétique connu pour sa couleur verte. Elle représente 1% de la matière sèche de la spiruline (**Proy, 2019**). Parmi les bienfaits qui lui sont attribués, on cite :

- Renforcement du système circulatoire ;
- Régulation du transit intestinal ;
- Stimulation de la production d'hémoglobine et les globules rouges chez les personnes anémiques (**Laurent, 2019**).

La classification de la chlorophylle dépend de la chaîne latérale du groupement X et du noyau chlorine. On retrouve cinq types de chlorophylle : chlorophylle a, chlorophylle b, chlorophylle c et chlorophylle d. La spiruline classée parmi les cyanobactéries renferme essentiellement la chlorophylle du type a (**Société Chimique de France, 2018**).

La structure molécule de la spiruline est très proche à celle de l'hémoglobine puisqu'elle est aussi constituée du noyau pyrrole. Il existe une seule différence au niveau d'un seul atome ; il s'agit du magnésium pour la chlorophylle et le fer pour l'hémoglobine. Le magnésium capté par la chlorophylle permet de maintenir l'équilibre acido-basique de notre organisme (**Le Guehenec, 2009**).

Une consommation quotidienne de 5 grammes de spiruline regorge une abondance de 40 milligrammes de chlorophylle (**Laurent, 2019**).

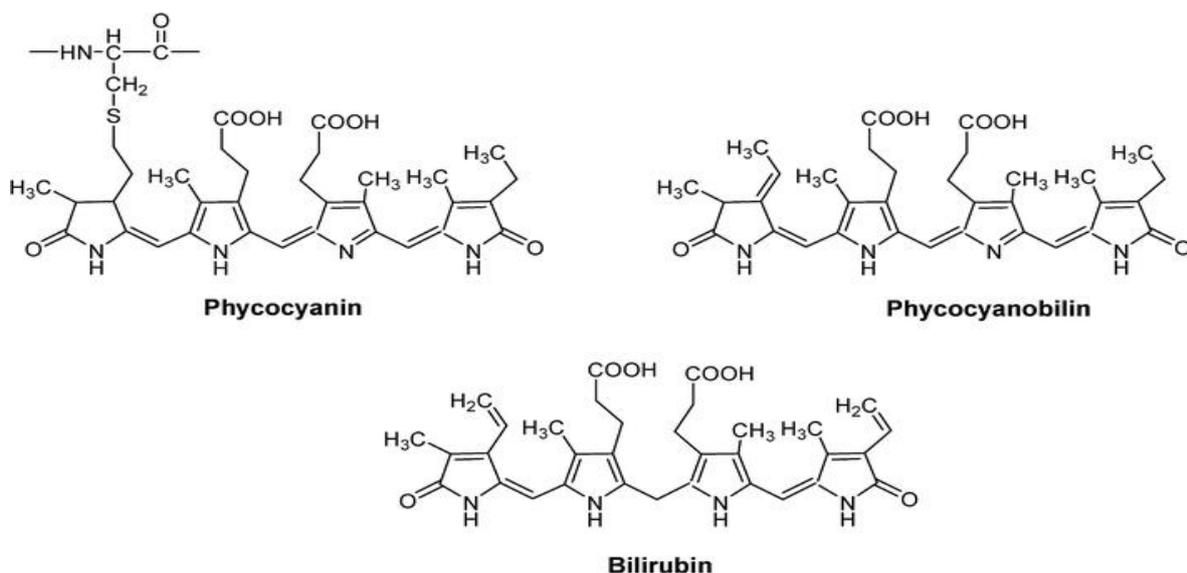
### 5.8.3. La phycocyanine

La phycocyanine fait partie des phycobiliprotéines, ce sont des chromoprotéines constituées d'une partie de protéines et d'un pigment. C'est le seul pigment bleu alimentaire naturel présent uniquement chez la spiruline (**Djimli, 2013**).

La structure de la phycocyanine se caractérise par la présence d'un cœur constitué d'allophycocyanine entourées de molécules de phycocyanine périphériques. En raison de sa similitude structurale, la phycocyanine peut être apparentée à celle de l'érythropoïétine (EPO) : l'EPO possède un atome de fer en son centre alors que la phycocyanine dispose d'un atome de fer et d'un atome de magnésium. Une équipe de scientifiques chinois a réussi à démontrer que la phycocyanine remplit un effet similaire à l'EPO en stimulant à la fois la production des globules rouges et des globules blancs, même si la moelle osseuse se trouve endommagée (**Kozlenkoet Henson, 1998**).

Les propriétés colorantes et fluorescentes de la phycocyanine sont exploitées pour le diagnostic médical. Elle semble disposer d'un atout fondamental : la prévention des maladies dégénératives comme l'Alzheimer ou de Parkinson grâce à son effet neuroprotecteur, antioxydant, hépato protecteur, détoxifiant et anti-inflammatoire.

La structure chimique de la phycocyanine est semblable à celle de la bilirubine et la biliverdine. Sa couleur intense bleue est due à la présence de la molécule chromophore : la phycocyanobiline (**Lakshmi et al., 2008**). La phycocyanine est une protéine complexe de deux sous unité  $\alpha$  et  $\beta$  composée de 162 et 172 acides aminés respectivement (**Figure 2**) (**Lui et al., 2016**).



**Figure 2** : Structure chimique de la phycocyanine, comparée à celle de la bilirubine

#### 5.8.4. La porphyrine

Une molécule absorbante de la lumière visible retrouvée chez les cellules animales, végétales et plus essentiellement dans la cyanobactérie *Spirulina* (Laurent, 2019).

La porphyrine dispose d'un noyau central <<porphyrine>> capable de chélater des ions métalliques comme le magnésium et le fer d'où le terme métalloporphyrine (forme biologiquement active)(Laval et Laval Legrain, 2013).

Elle constitue un élément particulier dans la composition de GR qui sont combinées au fer dans l'hémoglobine pour former l'hème et transporter l'oxygène. Et même sur le système cardio-vasculaire, la porphyrine contenue dans la spiruline permet de décomposer lentement la plaque d'athérome d'aspect graisseux qui se fixent sur les parois vasculaires, montrant alors toute son efficacité pour lutter contre les troubles de la circulation sanguine (Laurent, 2019).

### 6. Utilisation thérapeutique et traditionnelle de la microalgue

#### 6.1.Histoire et utilisation traditionnelle de la spiruline

Il y a cinq centaines de cela, pendant l'époque coloniale espagnole, la spiruline fut trouvée présente en premiers lieux en Mexique. Les Aztèques, peuple original du Mexique, utilisait une substance bleu-vert remarquable appelée <<Tecuitlatl>> qui était une sorte de terre traditionnelle séchée, broyée et consommée par la suite sous forme de purée pendant leurs repas pour assurer une alimentation correcte et équilibrée (Djimli, 2013).

Ce n'est que depuis quelques années après que la spiruline fut redécouverte en Afrique, plus précisément au nord-est du Tchad, dans la région du Kanem. De la même méthode, que les Aztèques, les kanembous récoltèrent la spiruline stagnante et la font ensuite sécher en galettes appelées <<dihé>>. A cette époque, la spiruline était réservée aux femmes enceintes qui en prenaient lors de leur grossesse et après l'accouchement pour diminuer leurs carences. En outre, elle avait apporté un résultat spectaculaire en Afrique pour lutter contre la malnutrition, la famille notamment celle des enfants (Fox, 1999 ; Girardin-Andréani, 2005).

#### 6.2.Utilisation thérapeutique

Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont montré une multitude d'applications possibles de la spiruline.

- **En agroalimentaire** : en Suisse et au Japon, la spiruline est incorporée dans le pain. La phycocyanine (colorant naturel de couleur bleue) est servie dans les chewing-gums, sucreries, produits laitiers et boissons gazeuses (**Charpy et al., 2008**).
- **En cosmétique** : la spiruline retarde le vieillissement de la peau et apporte une brillance au visage. Les soins réparateurs et enrichissants à base de spiruline assurent la longévité des ongles et la nutrition des cheveux (**Casal, 2019**).
- **En thérapie** : La spiruline s'avère être un trésor à vertus thérapeutiques du fait de sa composition potentiel en phycocyanine donnant à cette microalgue des effets dans la lutte contre le cancer, le sida, le diabète et des propriétés hépato-protectrices et anti-inflammatoires (**Khouas, 2013**).
- **En usage animale** : les pigments essentiels de la spiruline sont utilisés pour accentuer la coloration des poissons d'ornement. De plus, elle sert d'additif pour la performance des chevaux de course et à la nutrition des taureaux (**Doumandji et al., 2012**).

Les travaux antérieurs, réalisés à partir des années 90, sur des espèces du genre *Spirulina* montrent qu'elle dispose de diverses activités dont :

- **Effets antimicrobiens, antioxydants et anticancéreux** : **Kambou** en **2018** a observé un contenu phytochimique important à partir des extraits aqueux et méthanolique des échantillons de *Spirulina platensis*. En parallèle, il a mis en évidence des activités antioxydantes, antimicrobiennes et antiprolifératives significatives avec ces extraits. Les observations obtenues indiquent un potentiel prometteur pour ce genre de *Spirulina* grâce à la phycocyanine pour le traitement de maladies associées au stress oxydatif, à un mécanisme de défense pour lutter contre les bactéries pathogènes ou à une prolifération cellulaire non contrôlée (**Li et al., 2007**).
- **Effet hypoglycémiant et hépato-protecteur** : Une étude de **Aissaoui** et ses collaborateurs (**2017**) a montré l'effet de la spiruline chez des rats rendus diabétiques après l'injection des monohydrates d'Alloxane. Des analyses histopathologiques, biochimiques et antioxydantes ont été effectuées et ont signalé une diminution significative de la glycémie et la fonction hépatique. Cependant, les résultats obtenus prouvent que la spiruline permet de rétablir une histologie rénale normale et de diminuer à la fois l'hyperglycémie et le stress oxydatif induit par le diabète (**Aissaoui et al., 2017**).
- **Effet anti-inflammatoire et anti allergique** : Un essai clinique utilisant deux extraits polysaccharidiques de haut poids moléculaire issus de la spiruline, a eu comme objectif

d'étudier leurs potentiels effets inhibiteurs sur la réponse inflammatoire allergique et sur la libération d'histamine par les mastocytes. Les résultats ont montré que ces extraits inhibent la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-4, de leucotriènes et d'histamine ; éléments qui sont tous impliqués dans la réaction inflammatoire et allergique (**Appel, 2018**).

- **Activité anticoagulante** : Il a également été montré, selon une étude *in vitro*, que la spiruline inhibe la première phase de l'hémostase (agrégation plaquettaire) mais aussi la 2<sup>ème</sup> phase de coagulation. Il a été révélé qu'elle rallonge le TP (temps prothrombine) et le TCA (temps de céphaline activée). Le calcium-spirulan et la phycocyanine C sont les deux composants responsables de cet effet, plus la concentration en spiruline augmente et plus la coagulation est retardée (**Loke, 2007**).

## 7. Production et commercialisation de la spiruline

La première culture artisanale de spiruline a été établie selon des exigences qui nécessitent un équipement adapté. La spiruline est cultivée sous serres dans des bassins profonds pour que la population de la spiruline soit exposée équitablement aux rayons solaires. Elle est recueillie et filtrée, formant une purée de spiruline très épaisse compacte dont elle va prendre la forme de filaments par extrusion qui seront enfin séchés puis broyés. Une bonne spiruline est fine, présente une belle couleur vert foncé et intense, elle a peu d'odeur et de goût (**Jourdan, 1999**). La spiruline est plutôt commercialisée soit sous forme brute (brindilles, paillettes, poudre...), soit en comprimés granulés, gélules ou sur support liquide en guise de complément alimentaire comestible et facilement digestible (**Charpy et al., 2008**).

Désormais, la spiruline est cultivée de façon industrielle partout dans le monde. Rien qu'en France, 30 tonnes sont produites chaque année, selon la Fédération des Spirulines de France ; 50 % de la production mondiale étant faite en Chine. Elle est également produite aux Etats Unis (Californie et Hawaï), en Afrique, en Inde, au Pérou, en Grèce (**Cathala, 2018**).

La Chine l'a déclarée <<aliment d'intérêt national>> et, malgré l'absence d'étude clinique officielle. Les victoires obtenues par les ONG grâce à cette protéine végétale, dans la lutte contre la malnutrition des enfants des pays pauvres, ont convaincu l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) de recommander sa production et son utilisation (**Morin, 2014**).

## Chapitre II : Radicaux libres et espèces réactives d'oxygène

L'oxygène est une source hautement indispensable et enrichissante pour tout être vivant. Dans la chaîne mitochondriale, il est utilisé comme accepteur final d'électrons, dont l'énergie récupérée permet la synthèse d'ATP primordial à toutes les cellules et tissus de l'organisme (Leverve, 2009).

Un radical libre est défini comme étant une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés instables lui conférant une grande réactivité. En effet, les espèces radicalaires ont tendance à remplir leurs orbitales soit en acceptant un électron (Fontaine, 2002) soit en transférant leurs électrons célibataires à d'autres molécules pour devenir plus stables (Vergley et Rochette, 2002).

La classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants et produites par les mitochondries sont appelées espèces réactives d'oxygène (nommées aussi ERO). Les radicaux libres constituent une proportion importante des ERO. On y retrouve par exemple le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Le radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ) est un oxydant plus réactif que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'anion superoxyde ( $\text{O}_2\cdot^-$ ). Cependant, ces deux derniers ont une durée de vie plus longue, ce qui leur permet de se déplacer à partir du site de génération et de réagir avec des molécules dans divers tissus (Martínez-Cayuela, 1995 ; Valko et al., 2007).

Il existe aussi des espèces réactives du nitrogène (ou ERN) dont le représentant majeur est l'oxyde nitrique  $\text{NO}\cdot$ . C'est un radical peu réactif impliqué dans la neurotransmission. Il est produit lors de métabolisme de l'arginine en citrulline par les oxyde nitrique synthases (appelé aussi NOS).

En liant des radicaux libres oxygénés à l'oxyde nitrique, on forme des molécules plus toxiques comme l'anion peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). C'est un puissant oxydant qui peut provoquer la fragmentation de l'ADN et l'oxydation des lipides (Valko et al., 2007).

Selon **Harman (1956)**, la surproduction d'espèces réactives d'oxygène induits des effets dommageables menant vers un stress oxydatif considéré comme source de physiopathologies et de vieillissement avancé.

## 1. Stress oxydant

Par définition, le stress oxydant correspond à un état de déséquilibre de la balance entre la formation des espèces réactives de l'oxygène à caractère pro-oxydant et les défenses antioxydantes qui régulent leurs productions, en faveur des premières (**Halliwell et Aruoma, 1993 ; Azzi et al., 2004 ; Soares, 2005 ; Valavanidis et al., 2006**).

Il s'agit d'un mécanisme physiopathologique et non pas une maladie. Toutefois, un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera la manifestation d'une maladie ou un vieillissement accéléré (**Mercan, 2010**).

Les causes essentielles de ce stress oxydant sont soit d'origine :

- Accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques peroxydant...)
- Nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs pro oxydants (fer, acides gras) ;
- Génétique.

## 2. Les dommages causés par le stress oxydant

### 2.1. Les principales cibles biologiques des EOA

#### 2.1.1. L'ADN

Le radical hydroxyle réagit avec tous les composants de l'ADN. Il endommage à la fois le squelette désoxyribose ainsi que les bases puriques et pyrimidiques. Le résultat de ces effets dommageables oxydatifs entrainera des modifications permanentes du matériel génétique. Elles représentent la première étape dans la mutagenèse et la cancérogenèse (**Martínez-Cayuela, 1995 ; Valko et al., 2007**).

La cible privilégiée des oxydations par les ERO est l'ADN mitochondrial. Ceci est dû au fait qu'il soit dépourvu d'histones. De plus, l'ADN mitochondrial ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficace que celui de l'ADN nucléaire. Enfin, il a aussi une

proximité directe avec l'une des principales sources d'ERO cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale (Servais, 2004).

### 2.1.2. Les protéines

Les acides aminés ont des sensibilités différentes par rapport aux EOA. Les plus réactifs sont : l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. L'oxydation de quelques résidus sera provoquée par toute attaque radicalaire.

La majorité des dommages sont irrémédiables et peuvent causer des modifications fonctionnelles importantes : (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte de l'activité enzymatique).

Des agrégats seront formés par quelques protéines oxydés très faiblement dégradés et qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng et al., 2007).

### 2.1.3. Les lipides membranaires

Le radical hydroxyle a le pouvoir de détacher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est ce qu'on appelle la phase d'initiation.

Un radical peroxy (ROO-) est composé, suite à une réaction entre le radical lipidique et la molécule d'oxygène. Il s'avère assez réactif pour arracher un H<sup>+</sup> à un AGPI voisin. Une détérioration de la fluidité membranaire en résulte, qui mène inéluctablement à la mort cellulaire (Haleng et al., 2007).

### 2.1.4. Les lipoprotéines

La formation des LDL oxydées sera engendrée par l'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes. Ainsi des récepteurs spécifiques des macrophages vont capter ces LDL oxydées.

Autrement, les LDL oxydées sont immunogènes (capable de provoquer la formation d'anticorps) et les complexes immuns formés peuvent activer la voie classique du complément. Ces derniers peuvent aussi générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Haleng et al., 2007).

### 3. Les maladies causées par le stress oxydant

Le stress oxydant met en jeu des espèces radicalaires différentes. Il est considéré comme un facteur délétère dans la survenue de plusieurs pathologies (cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aiguë, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré) et ceux en faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes. Ces maladies apparaissent, dans leur majorité, avec l'âge parce que les défenses oxydantes sont diminuées par le vieillissement. Ce dernier augmente également la production mitochondriale de radicaux.

La responsabilité la plus nette des radicaux libres est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant(**Favier, 2003**).

Les relations entre stress oxydant et athérosclérose s'avèrent très étroites. Ce stress oxydatif a été identifié au niveau de l'oxydation qui sont capables de capter les macrophages pour former les cellules spumeuses et initier la formation de la plaque d'athérome (**Duriez, 2000**).

Le stress oxydant est aussi un des facteurs déclenchant l'apparition de maladies plurifactorielles tels que le diabète sucré, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Il joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes : augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs pro-oxydants (prostacycline, cytokine et facteur de fibrinolyse) et augmentation de la prolifération des fibres lisses(**Favier, 2003**).

### 4. Les antioxydants

Le terme « antioxydants » signifie l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire des espèces réactives de l'oxygène(**Noori, 2012**).

#### 4.1. Sources d'antioxydants

Il existe deux sources principales d'antioxydants : la source endogène et la source alimentaire.

#### 4.1.1. Source endogène

Elle se compose d'enzymes, de protéines et d'oligoéléments. Elle participe à la neutralisation excédentaire en radicaux libre en constituant la première ligne de défense (Traoré, 2005) :

- La ferritine, l'albumine ainsi que la transferrine perdent partiellement ou totalement leur activité de stimulation des réactions radicalaires lorsqu'ils sont en liaison avec des métaux.
- La SOD (ou superoxydedismutase) cytoplasmique extracellulaire et mitochondriale contient du cuivre, du zinc et du manganèse. Elle permet la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui par catalase se transforme en dioxygène et en eau.
- La catalase qui est présente dans les hématies, détruit l'eau oxygénée. Grâce à cette réaction, elle permet d'éviter la formation de radicaux OH.
- La glutathion-peroxydase (ou GPx) contient du sélénium et est présent dans les mitochondries. Elle détruit les peroxydases lipidiques.
- Les protéines qui fixent les métaux, appelés métallothionéines, jouent un rôle protecteur contre la toxicité des radicaux libres.

#### 4.2.1. Source exogène (alimentaire)

La deuxième source d'antioxydants est notre alimentation. Nous retrouvons dans ce groupe les aliments classiques (tel que les acides aminés, vitamines E et C et les peptides) ainsi que les composants bioactifs (caroténoïdes et flavonoïdes) (Rolland, 2004) :

- **La vitamine E (ou alpha tocophérol) :** Elle agit en limitant les effets néfastes du cholestérol et donc préviendrait de l'athérosclérose. De plus, elle a un rôle préventif dans le développement des cancers et sur le vieillissement ; elle a pour but de protéger les acides gras insaturés au niveau des membranes cellulaires. Elle déclenche une réaction en chaîne oxydante en réagissant avec un radical d'acide gras auquel ce dernier réagisse avec un nouvel acide gras et ainsi de suite. On trouve principalement la vitamine E dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines (Gauche et Hausswirth, 2006 ; Khalil, 2002).

- **La vitamine C** : C'est un puissant antioxydant qui est instable à la chaleur et à la lumière UV. Avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase, elles inhibent des radicaux. On retrouve la vitamine C dans les fruits et légumes frais (orange, citron, légumes à feuilles vertes). Un surdosage de vitamine C peut être dangereux et provoquer un risque d'hémolyses des globules rouges et la formation de calculs rénaux (**Dori et al., 2014**).
- **Les caroténoïdes** : On les trouve essentiellement dans les fruits et légumes (carotte, poivrons) et a comme capacité de capter l'oxygène singulet. Le bêta-carotène est un précurseur de la vitamine A (**Fiedor et Burda, 2014**).
- **Les polyphénols** : Ils permettent de lutter contre les radicaux libres et de stopper la réaction en chaîne. Elles doivent cette activité à un nombre important de résidus hydroxyles (**Rolland, 2004**).

## 5. Différents types d'antioxydants

### 5.1. Antioxydants synthétiques

Le butylhydroxyanisole (BHA) (E320) et le butylhydroxytoluène (BHT) (E321) sont les antioxydants synthétiques les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme inhibiteurs potentiels de l'oxydation des lipides (**Sajon et al., 2018**). Ces deux additifs antioxygènes sont résistants à la chaleur, volatils et toxiques non négligeables. Ils influencent sur le métabolisme : hépatique, pulmonaire et des cancérogènes. En outre, le BHA et le BHT ont la capacité d'accélérer l'élimination des molécules toxiques mais aussi d'atténuer leurs effets néfastes. Des manifestations allergiques peuvent être engendrées (**Clémens, 1995**).

A cela s'ajoute le butylhydroquinone tertiaire (TBHQ) qui appartient à un groupe de substances appelées antioxydants phénoliques. Il est fréquemment utilisé avec le BHA comme antioxydant dans une large gamme de produits pour les protéger des effets de l'oxydation pendant leur stockage (**Draft, 2021**). Il est stable à hautes températures et légèrement volatils.

L'acide gallique appelée aussi gallate (E310-213), un antioxydant hydrophile abondant dans le règne végétal. Par estérification de ce dernier, des composés de synthèse lipophiles sont formés : Les gallates de propyle (E310), d'octyle (E311) et de dodécyle (E312). En toxicologie, les gallates sont capables de découpler, *in vitro*, les oxydations des phosphorylations (**Clémens, 1995**).

Le gallate de propyle stimule la dégradation des glucides et de l'ADN par les radicaux libres. Il est utilisé pour protéger contre l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène et radicaux libres d'oxygène. En microscopie à fluorescence, le gallate de propyle est utilisé comme antioxydant pour réduire le photoblanchiment des sondes fluorescentes (**Widengren et al., 2007**).

Une étude réalisée par **Hirose et al., (1993)** sur des rongeurs gras a trouvé peu ou pas d'effet sur la cancérogenèse par le gallate de propyle. Une étude de **Amadasiet al., (2009)**, a révélé que le gallate de propyle agit comme un antagoniste des œstrogènes.

Lors d'une étude de toxicité des gallates de dodécyle et d'octyle chez les rats, des observations ont été attribuées aux gallates de dodécyle dans la modification de paramètres hématologiques et de changements morphologiques. Pour ce qui est du gallate d'octyle, une légère anémie hypochrome a été observée (**Organisation Mondiale de la Santé, 1993**).

## 5.2. Antioxydants naturels employés

Parmi les antioxydants naturels, paraissent les tocophérols et les tocotriénols qui sont deux sous-ensembles constituant la vitamine E. Ils sont autorisés en alimentation humaine sous forme d'extraits naturels ou sous forme d'isomère de synthèse. Leur grande solubilité dans les huiles et les graisses leur confère un intérêt particulier. Grâce à leur incorporation dans les membranes cellulaires, ils sont capables de protéger contre la peroxydase lipidique en neutralisant les radicaux peroxy (**Démarchez, 2012**). L'acide ascorbique, un autre antioxydant naturel intéressant, est capable de réagir directement sur les dérivés réactifs de l'oxygène et en particulier avec les ions superoxydes  $O_2^{\cdot-}$ . Comme la vitamine E, elle limite la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxy (**Démarchez 2012**). Enfin, son intérêt majeur en termes de pouvoir antioxydant réside en sa capacité à régénérer la vitamine E au sein de la membrane (**Fabre et al., 2015**). Les molécules actives présentes dans ces sources naturelles d'antioxydants sont soit des flavonoïdes, soit des dérivés d'acide benzoïque, soit des dérivés de l'acide cinnamique (**Fleuriet et al., 1996**).

# **Méthodologie**

*Spirulina platensis* est une microalgue bleu-vert appartenant aux cyanobactéries, du genre *Spirulina*. La cyanobactérie a démontré une série d'activités biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols et au pigment bleu <<la phycocyanine>>(Liu et al., 2016).

Pour déterminer la richesse de cette espèce en métabolites secondaires, nous avons sélectionnés et regroupés quelques articles scientifiques portant sur ce thème, afin de pouvoir prouver et confirmer l'intérêt potentiel que présente *Spirulina platensis*.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la caractérisation et l'identification des molécules bioactives existantes dans cette microalgue en utilisant des méthodes d'extraction, de purification, de dosage de polyphénols et identification par chromatographie liquide haute performance.

La phycocyanine (PC) est une protéine pigmentaire qui fait partie des phycobiliprotéines. Les phycocyanines isolées des algues bleu-vert sont classées en phycocyanine C (C-PC) (Hilditch, 1991).

Des études récentes ont montré que la C-PC disposait des propriétés hépato-protectrices (Romay et al., 2003), anti-inflammatoires (Reddy et al., 2003), antitumorale (Eriksen, 2008) et antioxydantes (Hussein et al., 2015). De plus, Elle peut être transformée en un traceur fluorescent qui est utilisés dans le diagnostic médical, l'immunologie et la génie biologique (Liu et al., 2010).

## **1. Méthode d'extraction de la phycocyanine**

La méthode d'extraction de la phycocyanine C et des polyphénols totaux à l'état naturel est la clé pour une récupération maximale et une forte teneur à partir de la biomasse de la spiruline complète, séchée ou fraîche (Niu et al., 2006). Selon la polarité, le degré de pureté et la résistance de la paroi cellulaire des cyanobactéries, dix méthodes d'extractions ont été adoptées, y compris :

- **Méthode d'extraction par l'eau** : la phycocyanine est soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool et les esters (Liu et al., 2016).
- **Méthode d'homogénéisation des cellules dans un mortier et un pilon** : la biomasse congelée a été homogénéisée dans un mortier et un pilon en présence de terre diatomées (Moraes et al., 2011).

- **Méthode de congélation et de décongélation répétée** : La poudre de *S. platensis* est dissoute dans une proportion d'eau, rapidement congelée à -20°C et décongelée -5°C trois fois pendant 24 heures et 48 heures pour la décongélation. Cette méthode est simple mais prend beaucoup de temps et gaspille la poudre. Cette extraction implique la rupture de la paroi cellulaire de la cyanobactérie qui peut atteindre 90% (**Zhang et al., 2015**).
- **Osmose directe** : La poudre de *S. platensis* est immergée dans de l'eau distillée puis dans une solution tampon à faible concentration ce qui provoque le rompt automatique de la paroi cellulaire. Cette méthode est simple mais prend beaucoup plus de temps (**Herrera, 1989**).
- **Méthode ultrason** : La solution de *S. platensis* traitée par osmose directe est traitée par ultrason pour accélérer la rupture cellulaire et raccourcir le temps de traitement précédent (**Li et al., 2007**).
- **Extraction par acide inorganique** : la biomasse humide de *S. platensis* a été traité avec différentes concentrations chlorhydriques (2, 4, 6, 8 et 12M) pendant 24 heures à température ambiante (**Moraes, 2011**).
- **Extraction par acide organique** : la procédure a été réalisé de la même manière utilisée dans l'extraction d'acide inorganique ; dans ce cas, la biomasse humide a été traitée avec 1 M d'acide acétique (**Moraes, 2011**).
- **Digestion enzymatique** : chlorure de potassium lysozyme est utilisé pour briser la paroi cellulaire de *S. platensis* en améliorant ainsi le rendement d'extraction. Cette technique ne nécessite que peu de temps mais elle conditionne une température et un pH bien précis (**Li et al., 1999**).
- **Extraction aqueuse biphasée** : Elle a été développée dans la séparation des polysaccharides et des protéines. **Chethana et al., 2015** ont atteint un taux d'extraction de 79% et une pureté de 4,32 en utilisant cette méthode. Cette approche est devenue plus courante car elle raccourcit le temps de traitement, diminue le coût de traitement et permet d'obtenir une activité biologique stable (**Babu, 2008 ; Porto, 2008**).
- **Extraction par macération dans le glycérol** : Selon les travaux de **Pottecher (2014)**, une quantité de 800g de la spiruline a été mélangé avec un volume de 60/40 d'eau/glycérol. La solution doit macérer dans l'obscurité à température ambiante. Après 15 jours, on obtient un filtrat à l'aide d'un filtre en nylon compatible. Cette méthode est fréquemment utilisée pour l'extraction des polyphénols totaux (**Lafri, 2017**).

L'extrait aqueux brut de la C-PC est purifié par le biais de trois méthodes :

- **Méthode de relargage** : les protéines sont séparées à partir de différentes concentrations de solution saline (**Wang et al., 2003**).
- **Précipitation au point isoélectrique** : Les protéines cibles sont séparées.
- **Méthodes chromatographiques** : La C-PC est une protéine pigmentaire qui absorbe dans l'ultraviolet (UV) et on peut l'identifier de manière simple et efficace.
  - Chromatographie hydroxyapatite (**Benedetti, 2006**).
  - Chromatographie Sephadex : Un taux de pureté accru en C-PC (**Kumar et al., 2014**).
  - Chromatographie par échange d'ions (**Ramos, 2011**).

Après extraction, les échantillons ont été centrifugés et le surnageant est utilisé pour vérifier le rendement.

## 2. Le dosage des composés phénoliques

L'étude phytochimique met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits (**Dohou et al., 2003, Kumar et al., 2014**).

Pour la caractérisation des extraits de la phycocyanine, des tests phytochimiques et colorimétriques ont été mis en place pour identifier et quantifier les composés phénoliques et déduire leur activité antioxydante.

Le dosage des composés phénoliques a été déterminé par la méthode colorimétrique par le réactif de Folin. C'est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 750nm. Ce dosage est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (**Boizot et al., 2006**).

Une prise de 200 µl d'extrait aqueux de la spiruline est combinée dans un tube avec 1ml de réactif de Folin-ciocalteu. Un volume de 800 µl d'une solution de carbonates de sodium ( $Na_2CO_3$ ) (75mg/ml) est additionné au milieu réactionnel. Les tubes sont incubés à 95°C pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

UV-visible contre un blanc. L'acide gallique est utilisé comme standard à la place de l'extrait. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/gMS) (Talbi et al., 2015).

### 3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La réalisation d'une analyse de séparation, par la chromatographie liquide haute performance complétant la caractérisation par criblage phytochimique. La phase mobile est de composition gradiente. Elle est composée de deux solvants : solvant A (acétonitrile) et solvant B (H<sub>2</sub>O à pH 5) ajoutée dans des temps d'opération précis. Les composés phénoliques contenues dans *Spirulina platensis* sont détectés via un spectrophotomètre UV-visible selon le temps de rétention (5,15, 17 et 25 minutes) de plusieurs extraits (Moukette, 2015).

### 4. Capacité antioxydante totale (CAT)

La détermination de l'activité antioxydante, *in vitro*, se base sur la capacité antioxydante totale des composés phénoliques (CAT). Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de *S. platensis*. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte.

### 5. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH• est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Gouveia et Castilho, 2012). La méthode de DPPH• présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH• (de couleur violette), en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (figure 3). La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

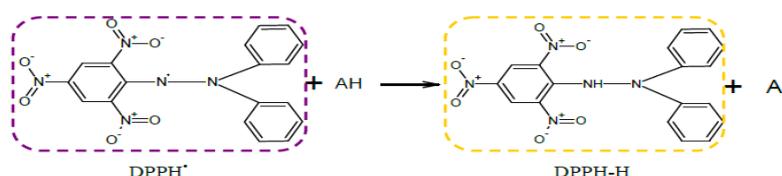


Figure 3: Forme réduite du radical DPPH•

Le protocole expérimental suivi est celui de **Mansouri et al., 2005** : À différentes concentrations, 100 µl de plusieurs extraits, sont ajoutés à 1300 µl d'une solution méthanolique de DPPH•. Pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le témoin négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 100 µl du méthanol avec 1300µl d'une solution méthanolique de DPPH•.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la réduction du DPPH• est traduite par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution. La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif utilisé est l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI = (D.O_{\text{témoin}} - D.O_{\text{extrait}} / D.O_{\text{témoin}}) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

D.O témoin : absorbance du témoin négatif.

D.O extrait : absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI<sub>50</sub>). Une valeur de CI<sub>50</sub> faible correspond à une grande efficacité de l'extrait.

## 6. Pouvoir réducteur du fer (test de FRAP)

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer (**Huang et al., 2005**). Le ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] fournit des ions Fe<sup>3+</sup> qui seront réduits en Fe<sup>2+</sup> par les antioxydants présents dans l'extrait. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. Cette méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 2,5 ml de tampon phosphate 0,2 M à pH 6,6 et 2,5 ml d'une solution de K<sub>3</sub>[Fe (CN)<sub>6</sub>] à 1%. Le mélange obtenu est incubé pendant 30 mn à 50°C, puis 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 650 g pendant 10 mn à température ambiante et 2,5 ml du surnageant sont additionnés de 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl<sub>3</sub> à 0,1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm (**Lafri et al., 2017**).

## 7. Détermination de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité du superoxyde dismutase (SOD) de *S. platensis* a été déterminée par la méthode xanthine/xanthine oxydase (X-XOD) en utilisant le kit enzymatique RANSODVR. Cette méthode utilise la réaction de la xanthine avec la xanthine oxydase (XOD) pour générer des radicaux superoxydes qui réagissent avec le chlorure de 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phényltétrazolium (INT), pour former un colorant rouge formazan. L'inhibition de la vitesse de réduction de l'INT dans les conditions de l'essai se réfère à des valeurs de % d'inhibition. L'essai a été réalisé à 37°C en utilisant un spectrophotomètre à 505 nm (**Gunes et al., 2017**).

## **Résultats et discussions**

## 1. Extraction de phycocyanine

Les diverses méthodes d'extraction et de purification utilisées pour extraire la phycocyanine C de la biomasse humide ont montré la présence de cette molécule dans le surnageant.

Les microalgues telles que la spiruline a des parois en multicouches résistantes, ce qui rend la procédure d'extraction difficile (**Stewart et Farmer, 1984**). Ainsi, une optimisation des étapes d'extraction et de purification sont exigées pour la libération de la phycocyanine à l'intérieur de la cellule.

La C-PC traitée avec sonication sans billes de verre, lysozyme, 1 M d'acide acétique, HCl 2 M et HCl 4M a donné un rendement d'extraction très faible étant donné que le surnageant était incolore. D'autre part, le traitement utilisant la sonication avec billes de verre et du HCl 12 M a atteint un rendement d'extraction plus élevé de 57% (**Moraes, 2011**). Ceci s'explique que lorsque les cellules de *S. platensis* sont traitées avec des concentrations de HCl supérieures à 8 M. Les méthodes de désintégration mécaniques des cellules sont préférées pour une désintégration complète de la biomasse souhaitées avec des rendements élevées en produit et en activité (**Gacesa et Hubble, 1990**). Des études antérieures rapportent que la C-PC est sensible au pH et à la température mais pas à la lumière. Elle est stable sous 40°C, avec une couleur et une absorbance constante entre pH4 et pH 8,5. A des températures supérieures à 40° c, Le pigment commence à se décomposer et l'absorbance diminue progressivement (**Li et al., 1999**).

D'autres études sur l'extraction de la phycocyanine C ont reporté que la méthode de la congélation et de la décongélation a été considérée comme la meilleure (**Bermejo et al., 2006**). Elle présente plusieurs avantages tels que d'être simple, rapide (10-12 heures), reproductible, indépendante de la matière de la biomasse et conserve l'activité biologique de la protéine. Lorsque la biomasse est congelée, il n'y pas formation de glace intracellulaire et l'extraction des substances intracellulaires est efficace (**Acker et McGann, 2003**).

En récapitulatif, les meilleures procédures utilisées pour extraire la C-PC à partir de la biomasse de *S. platensis* ne considèrent que l'homogénéisation en mortier et pilon, la congélation et la décongélation pendant 24 heures puis 48heures et sonication en présence de billes de verre, HCl 6 M, HCl 8 et HCl 12 M.

## 2. Etude phytochimique

### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

Selon les méthodes d'extraction citées auparavant, les résultats obtenus ont montré que l'extraction par glycérol a donné une concentration des polyphénols totaux très élevée qui varie entre 4 et 22 mg/g de matière sèche de *S. platensis*. Par contre, les concentrations les plus faibles sont obtenues par les méthodes d'extraction par la sonication et par l'eau (Lafri et al., 2017).

Une teneur en polyphénols totaux de l'ordre de  $64,28 \pm 0,47$  µg/mg, soit une teneur de 1,6 mg EAG/g MS a été déterminée dans l'extrait de spiruline (Shalaby et al., 2013).

### 2.2. Identification des polyphénols par HPLC

Dans des travaux entrepris par Lafri et ses collaborateurs (2017), la macération avec le glycérol est la méthode optimale d'extraction de la phycocyanine. Sa particularisation a permis de déterminer en termes de rendement les composés phénoliques, les flavonoïdes qui disposent d'un pouvoir antiradicalaire important.

Les composés phénoliques et les flavonoïdes sont détectés dans l'extrait selon une rétention et ils sont identifiés par des pics du chromatogramme. Parmi ceux qui ont été visibles, on note ; l'acide gallique (tr = 4,9), l'acide vanilline (tr = 19,0), le rutin (tr = 18,53), le pyrogallol (tr = 18,17) et la quercitine (tr = 18,99) (Lafri et al., 2017).

## 3. Activité antioxydante

### 3.1. Piégeage du radical libre DPPH•

Les résultats de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique de spiruline a montré une proportionnalité entre le pourcentage d'inhibition et l'augmentation de la concentration. L'IC<sub>50</sub> est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de l'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny et al., 2001). La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH• radicalaire a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations d'extraits préparés.

**Prieto et al., (1999)** ont enregistré une valeur de l'IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0,160 mg/ml. Ils ont montré que la microalgue a une capacité antioxydante légèrement supérieure par rapport à celle de l'acide ascorbique (0,156 mg/ml). Son activité antioxydante est due principalement à sa composition en polyphénols ainsi qu'aux pigments, qui semblent être liés à cette activité.

### 3.2. Pouvoir réducteur du fer

La quantification de l'activité antioxydante de l'extrait de *S. platensis* par le test de FRAP implique la capacité des antioxydants analysés à transformer le Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> grâce à la propriété donatrice d'électrons. En effet, pour les résultats trouvés dans l'étude de **Lafri (2017)**, la phycocyanine extraite par macération avec le glycérol possède une meilleure activité antioxydante grâce à son pouvoir réducteur (EC<sub>50</sub> de l'ordre de 1,749 ± 0,052).

**Patil et al., (2007)**, ont obtenu une activité antioxydante variant de 0,17 à 51,94% pour des concentrations de spiruline qui varient entre 0,3 à 15 mg/ml.

### 3.3. Détermination de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

*Spirulina platensis* est bien connue pour sa haute teneur en protéines et présente de fortes propriétés antioxydantes grâce à son activité SOD. L'analyse biochimique a indiqué que l'extrait de *Spirulina* contenait 0,27 mg/ml de protéines et 0,28 mg/ml de phycocyanine. En accord avec la teneur en protéines de 40 – 60% trouvée dans l'étude réalisée par **Oliveira et al. (2009)**, *S. platensis* a également montré une forte propriété antioxydante en raison de son activité SOD trouvée à 8,0 U/ml. L'extrait brut de *S. platensis* s'est avéré avoir une teneur élevée en protéines et en phycocyanine. En outre, une activité SOD élevée, qui est responsable du piégeage des ROS, a été obtenue (**Gunes et al., 2017**).

L'effet antioxydant de la spiruline est lié à plusieurs ingrédients actifs, notamment la phycocyanine, les polysaccharides, l'α-tocophérol et le β-carotène qui ont de puissantes activités antioxydantes, agissant individuellement ou en synergie, directement sur les radicaux libres (**Riss et al., 2007**). L'activité antioxydante de la phycocyanine est environ 20 fois plus efficace que celle de la vitamine C. En outre, la spiruline contient de la superoxyde dismutase qui agit indirectement en ralentissant le taux de réactions générant des radicaux d'oxygène (**Gershwin et Belay, 2008**).

## **4. Activités biologiques**

**Romay (1998)**, a signalé les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires du C-PC et il a montré que la phycocyanine peut éliminer efficacement les radicaux libres hydroxyles et les radicaux libres d'oxygène. Les radicaux libres sont impliqués dans l'apparition de nombreuses maladies notamment ; l'athérosclérose, les lésions de perfusion, la cataracte et les troubles liés au stress oxydatif (**Gupta, 2012**).

### **4.1. Effet neuroprotecteur :**

La C-PC peut diminuer la taille de l'infarctus et augmenter les troubles du comportement chez les rats dont l'artère cérébrale est obstruée (**Min, 2015**). Cette étude a établi des modèles de tissus d'astrocytes en 2 dimensions et 3 dimensions pour déterminer l'effet du C-PC sur la régulation positive des enzymes antioxydantes (par exemple, SOD, catalase et facteur neurotrophique dérivé du cerveau, le soulagement des facteurs d'inflammation (par exemple, IL-6, IL-1 $\beta$ , et cicatrice gliale), et amélioration de l'activité des neurones. De plus, la C-PC peut améliorer la capacité de survie de prolifération, d'affaiblir l'apoptose des astrocytes oxydés et la capacité de piégeage des radicaux libres. Une comparaison a été effectuée sur les effets protecteurs du C-PC et de la N-acétylcystéine (NAC, un médicament neuroprotecteur) induite par le chlorure de tributylétain (**Mitra, 2015**). Ils ont constaté que les deux molécules peuvent réduire le stress oxydatif et l'inflammation, bien que leurs mécanismes varient ; la NAC peut réguler efficacement les enzymes liées à la voie de l'oxydation, tandis que la C-PC résiste aux ROS. Par conséquent, c'est un agent neuroprotecteur potentiel qui peut être appliqué pour traiter les lésions neuronales induites par le stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives, telles que l'accident vasculaire cérébral ischémique, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Pentón-Rol et al., 2011**).

### **4.2. Effet néroprotecteur :**

La C-PC peut inhiber la toxicité rénale et le stress oxydatif induits par le cisplatine de manière dose-dépendante et son effet protecteur est associé à la l'atténuation du stress oxydatif et la préservation de l'activité. De plus, elle peut inhiber l'activité antioxydante des enzymes antioxydantes, glutathion peroxydase (GPx), glutathion réductase, glutathion-S-transférase, et catalase dans le rein. La C-PC est un agent de piégeage d'une série de substances actives (**Fernandez-Rojas, 2014**). Une autre étude a rapporté les mêmes résultats

et a également révélé que le mécanisme implique, au moins en partie, la suppression de la kinase phosphorylée régulée par le signal extracellulaire kinase phosphorylée, de Bax, de la caspase-9 et de la caspase-3 (**Lim, 2012**). Enfin, la C-PC peut prévenir l'apparition de la néphropathie diabétique en inhibant la production de superoxyde dépendant du NADPH dans les cellules mésangiales rénales en culture (**Zheng et al., 2013**).

#### **4.3.Effet protecteur cardiovasculaire :**

Le métabolisme des lipides, le stress oxydatif et les dommages mitochondriaux jouent un rôle important dans les maladies cardiovasculaires (MCV). La C-PC améliore efficacement les dommages inflammatoires causés par le stress oxydatif chez les animaux atteints d'athérosclérose en inhibant l'activité des radicaux libres et la formation de la COX-2 en augmentant les niveaux d'enzymes antioxydantes dans l'organisme et en régulant les lipides sanguins (**Riss et al., 2007**). Selon des études sur l'effet antioxydant et le métabolisme des lipides, la C-PC réduit efficacement le cholestérol sérique, le cholestérol total, les triglycérides, les lipoprotéines, la glutamate-oxaloacétate transaminase, et la glutamate-pyruvate transaminase. Les effets hypolipidémiques et antioxydants du C-PC confirment son rôle dans la prévention des MCV et la formation de l'athérosclérose (**Sheu et al., 2013**).

# **Conclusion générale et perspectives**

Ce travail a pour objectif d'étudier les activités biologiques de l'une des espèces de cyanobactéries, *Spirulina platensis*, ainsi que sa composition chimique.

Les cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques dégageant de l'oxygène qui produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Elles possèdent un large éventail de composants colorés, notamment des caroténoïdes, de la chlorophylle et des phycobiliprotéines principalement la phycocyanine.

Autant que source de phycocyanine exploitées depuis longtemps, l'usage de la spiruline est lié certainement aux effets thérapeutiques attirés aux molécules bioactives synthétisées, non seulement comme des agents chimiques contre les pathologies, mais aussi comme des agents médicaux tels que les antioxydants. Pour cela la phytochimie et la phytothérapie font l'objet de plusieurs études aujourd'hui.

Suite à nos recherches bibliographiques, la plupart des études se sont concentrées sur la production et la purification de la phycocyanine à partir de *Spirulina platensis*. L'extraction des phycocyanines présente quelques difficultés en raison des parois cellulaires multicouches résistantes et aux grandes quantités de contaminants. Plusieurs méthodes ont été rapportées pour une purification réussie de la C-PC, mais ces méthodes comprennent de multiples étapes et prennent du temps, ce qui peut conduire à une augmentation des coûts de production et limiter leur application à grande échelle.

Il a été trouvé, par des tests phytochimiques, que cette espèce est riche en composés phénoliques, flavonoïdes et c'est le glycérol qui est le solvant le plus révélateur.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de la capacité antioxydante totale, la méthode du piégeage de radical libre DPPH• et celle de la réduction de fer des extraits de *S. platensis* a montré que la phycocyanine extraite par macération avec le glycérol possède une meilleure activité antioxydante grâce à son pouvoir réducteur. De plus, la SOD est responsable du piégeage des ROS.

Compte tenu des multiples vertus attribuées à la spiruline, le travail devrait être complété et poursuivi. En plus de l'activité antioxydante et antibactérienne de la spiruline, plusieurs autres activités biologiques restent à confirmer tels que : l'activité anticoagulante. Nous envisageons dans le futur de tester la toxicité de la spiruline pour pouvoir l'incorporer dans notre alimentation quotidienne.

Vers des idées innovantes pour une planète terre verte, La production de la spiruline est primordiale pour l'équilibre de l'environnement. Elle est connue pour ses nombreuses vertus médicinales et nutritionnelles et doit être cultivée localement pour permettre une meilleure accessibilité aux citoyens algériens.

# **Références bibliographiques**

1. Acker, J. P. & McGann, L. E. (2003). Protective Effect of Intracellular Ice During Freezing. *Cryobiology*, 46(2), 197.
2. Ahounou, M. N., (2018). *La spiruline : un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation.* (Thèse de doctorat). Université de Rouen.
3. Aissaoui, O. (2017). *Effet De La Spiruline Sur Le Métabolisme Glucido-Lipidique.* (Thèse de doctorat). Ecole Nationale Supérieure Agronomique – Alger.
4. Amadasi, A., Mozzarelli, A., Meda, C., Maggi, A. & Cozzini, P. (2009). Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), 52 – 63.
5. Appel, K, Munoz, E., Navarrete, C., Cruz-Teno, C., Biller, A. & Thiemann, E. (2018). Immunomodulatory and Inhibitory Effect of Immulina®, and Immunloges® in the Ig-E Mediated Activation of RBL-2H3 Cells. A New Role in Allergic Inflammatory Responses. *Plants*, 7(1), 13.
6. Azzi, A., Davies, K. J. & Kelly, F. (2004). Free radical biology – terminology and critical thinking. *Febs letters*, 558(1-3), 3 - 6.
7. Babadzhanov, A. S., Abdusamatova, N., Yusupova, F. M., Mezhlumyan, L. G. & Malikova, M. Kh. (2004). Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* , 40, 276 – 279.
8. Babu, B. R., Rastogi, N. K. & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, 47(1), 83 – 89.
9. Barth & Léo (2019). Le Guide Complet de la Spiruline, Article scientifique. Repéré à <https://naturalathleteclub.com/spiruline/>
10. Benedetti, S., Rinalducci, S. & Benvenuti, F. (2006). Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B*, 833(1), 12 – 18.
11. Bermejo, R., Felipe, M. A., Talavera, E. M. & Alvarez-Pez, J. M. (2006). Expanded Bed Adsorption Chromatography for Recovery of Phycocyanins from the Microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia*, 63(1-2), 59.
12. Boizot, N. & Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79 - 82.
13. Casal, A. (2019). Spirulinefrance.fr Repéré à <https://www.spirulinefrance.fr/bienfaits-spiruline/la-spirulinecancer>
14. Cathala, A. (2018). Spiruline : une filière paysanne française en développement. *Travaux & innovations*, 249. Repéré à <https://www.terre-net.fr/observatoire-technique-culturelle/strategie-technique-culturelle/article/spiruline-une-filiere-paysanne-francaise-en-developpement-217-141333.html>
15. Charpy, L., José, Langlade, M. J. & Alliod, A. (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Repéré à [http://www.plancton-du-monde.org/fileadmin/documents/IRD\\_spiruline\\_atout\\_developpement\\_afrique.pdf](http://www.plancton-du-monde.org/fileadmin/documents/IRD_spiruline_atout_developpement_afrique.pdf)
16. Cheong, S. H., Kim, M. Y., Sok, D. E., Hwang, S. Y., Kim, J. H., Kim, H. Y., ... Kim, M. R. (2010). *Spirulina prevents atherosclerosis by reducing*

- hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 56(1), 34 – 40. doi: 10.3177/jnsv.56.34.
17. Chethana, S., Madhusudhan, M. C. & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2415 – 242.
  18. Clémens, S. (1995). *Les additifs alimentaires : législation et problèmes liés à leur utilisation*. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, Grenoble 1.
  19. Cnera-Afssa, coordinateur Martin, A. (2001). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. Paris : Lavoisier.
  20. Démarchez, M. (2012). Le stress oxydant cutané. Repéré à <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article64>
  21. Djimli N. (2013). *Etude biochimique de la spiruline Arthrospira platensis de la région de Tamanrasset et incorporation dans le pain traditionnel*. (Mémoire de master). Université Saad Dahlab- Blida 1.
  22. Dohou, N., Yani, K., Thahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A. & Gmira N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine, *Thynelaealythroïdes*. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 142, 61 - 78.
  23. Dori, O., Humbert, A., Burnier, M. & Teta, D. (2014). Risques rénaux des compléments alimentaires : une cause ignorée. *Revue Médicale Suisse*, 10, 498 – 503. Repéré à [https://www.revmed.ch/view/519074/4234011/RMS\\_419\\_498.pdf](https://www.revmed.ch/view/519074/4234011/RMS_419_498.pdf)
  24. Doumandji, A., Boutekrabet, L., Saidi, N. A., Doumandji, S., Hamerouch, D. & Haouari S. (2012). Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal. *Nature & Technologie*, 6, 40 – 50.
  25. Draft. (2021). Butylated hydroxyanisole and related antioxidants. (Evaluation statement). Australian Government. Repéré à <https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/2021-10/EVA00029%20-%20Draft%20evaluation%20statement%20-%202018%20October%202021%20%5B875%20KB%5D.pdf>
  26. Duriez, P. (2000). Aspects physiopathologiques du lien entre antioxydants et athérosclérose. *Le Courrier de L'Arcole de la SFA*, 2(4), 160 - 165.
  27. El Rhaffari, L. & Zaid, A. (2004). *Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet) : Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée*. France : Edition de l'Institut de Recherche pour le Développement.
  28. Ehrenreich, I. M., Waterbury, J. B. & Webb, E. A. (2005). Distribution and Diversity of Natural Product Genes in Marine and Freshwater Cyanobacterial Cultures and Genomes. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 71, 7401 - 7413.
  29. Elyah, A. (2003). *Quel avenir pour la spiruline ?* (Mémoire de master). Université de Montpellier II, Institut National des Sciences et Techniques de la Mer.
  30. Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 1 – 14.
  31. Fabre, G., Bayach, I., Berka, K., Palonciová, M., Starok, M. & Rossi, C. (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation

- of molecular associations in biomembranes. *Chemical Communications*, 51(36), 7713 - 7716.
32. Falquet, J. (1996). Spiruline, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies, 22.
  33. Falquet, J. & Hurni, J. P. (2006). Spiruline, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies, 41.
  34. Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 270, 108 - 115.
  35. Fiedor J. & Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease, *Nutrients*, 6(2), 466 – 488.
  36. Fleuriet, A., Uhel, C. & Dédaldéchamp, F. (1996). Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme. *Acta Botanica Gallica*, 143(6), 493 - 500.
  37. Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., & Lerverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique, *Réanimation*, 11(6), 411 – 420.
  38. Fox, R. D. (1999). La spiruline, technique, pratique et promesse. Aix-en-Provence, France : Édisud.
  39. Furmaniak, M. A., Misztak, A. E., Franczuk, M. D., Wilmotte, A., Waleron, M. & Waleron, K. F. (2017). Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. *Front Microbiol*, 8, 2541.10.3389/fmicb.2017.02541
  40. Gauche, E., Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58, 43 - 66.
  41. Gacesa, P. & Hubble, J. (1990). *Tecnología de las Enzimas*. Editorial Acribia, Zaragoza. Espagne: Editorial Acribia, S.A.
  42. Gershwin, M. & Belay, A. (2008). *Spirulina in Human Nutrition and Health*. London: Taylor & Francis Group.
  43. Gunes, S., Tamburaci, S., Dalay, M. C. & Gurhan, I. D. (2017). In vitro evaluation of *Spirulina platensis* extracts incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1824 – 1832.
  44. Gupta N. K. & Gupta K. P. (2012). Effects of C-Phycocyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 941 – 948.
  45. Girardin-Andréani, C. (2005). Spirulina: Blood supply, immune system and cancer. *Phytotherapie*, 4, 158 – 161.
  46. Goulambasse, T. R. (2018). *La spiruline : Activités Thérapeutiques et son Intérêt dans la Lutte contre la Malnutrition à Madagascar*. (Thèse de doctorat). Université de Lille.
  47. Gouveia, S. C. & Castilho, P. C. (2012). *Helichrysum monizii* Lowe: Phenolic Composition and Antioxidant Potential. *Phytochemical Analysis*, 23(1), 72 - 83.
  48. Grogan, N. (2012). *Structure, fonctionnement et dynamique du phytoplancton dans le lac de Taabo (Côte d'Ivoire)*. (Thèse de doctorat). Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse.

49. Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo L. & Chamorro-Cevallos. G. (2015). Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira). *Nutrición Hospitalaria*, 32(1), 34 – 40. doi: 10.3305/nh.2015.32.1.9001.
50. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne. J. O., Charlier, C. & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant, *Revue Médicale de Liège*, 62(2), 628 - 638.
51. Halliwell, B., Aruoma, O. I. & Gutteridge, J. M. C. (1993). The deoxyribose method: a simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215 - 219.
52. Harman, D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journal of Gerontology*, 11(3), 298 – 300.
53. Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V. & Hohlberg, A. (1989). Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Journal of Applied Phycology*, 1(4), 325 – 331.
54. Hilditch, C. M., Smith, A. G., Balding, P. & Rogers, L. G. (1991). C-Phycocyanin from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Phytochemistry*, 30(11), 3515 – 3517.
55. Hirose, M., Yada, H., Hakoi, K., Takahashi, S. & Ito, N. (1993). Modification of carcinogenesis by  $\alpha$ -tocopherol, *t*-butylhydro-quinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model, 14(11), 2359-2364.
56. Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841 - 1856.
57. Hussein, M. M. A., Ali, H. A. & Ahmed, M. M. (2015). Ameliorative effects of phycocyanin against gibberellic acid induced hepatotoxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 119(1), 28 – 32.
58. Jourdan, J. P. (1999). *Cultivez votre spiruline : manuel de culture artisanal*. Suisse : Antenna Technologies.
59. Kambou, S. P. Camara-Cisse, M., Kolia, K., Adeoti, M. F. & Koffi, K. G. (2018). Paramètres physico-chimiques et métabolites secondaires de *Spirulina platensis* (Oscillatoriaceae), une algue produite et consommée en Côte d'Ivoire. *Revue Bio-Africa*, 17, 25 – 33.
60. Khalil, A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin e against atherosclerosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(7), 662 – 669.
61. Khouas, H. (2013) *Effet Antioxydant De La Spiruline En Association Avec Les Bifidobacteriums Sur Le Diabete*. (Mémoire de master). Université Saad Dahlab – Blida.
62. Kozlenko, R. & Henson, R. H. (1998). Latest Scientific Research on Spirulina: Effects on the AIDS Virus, Cancer and the Immune System. Repéré à <https://inspiredliving.com/greenfoods/a~spirulina-immunesystem.htm>
63. Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N. & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540), *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184 – 188.
64. Lafri, I, Jemni, M., Bensehaila, S. & Boutekrabt, L. (2017). Évaluation des méthodes d'extraction de la phycocyanine et son rendement à partir de *Spirulina platensis*. *Revue Agrobiologia*, 7(2), 623 – 634.

65. Lakshmi, P. T. V., Uma, M., S., Karthikeyan, P. P. & Annamalai, A. (2008). Sequence and Structure Comparison Studies of Phycocyanin in *Spirulina Platensis*. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 1, 63 – 72.
66. Laurent, I. (2019). *La spiruline (Spirulina platensis), de l'aliment au médicament : utilisations et conseils à l'officine*. (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.
67. Encyclopédie des plantes médicinales ; Identification, Préparation, Soins. (2001).
68. Lee, J. B., Srisomporn, P., Hayashi, K., Tanaka, T., Sankawa, U. & Hayashi, T. (2001). Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. *Chemical And Pharmaceutical Bulletin*, 49, 108 – 110.
69. Legrain, B. & Laval Legrain. G. (2013). *Les incroyables vertus de la spiruline*. Science & Techniques. Genève: Jouvence Editions.
70. Leverve, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219 - 224. doi: 10.1016/j.cnd.2009.09.001
71. Le Guehennec, J. (2009). *La spiruline*. Terre d'hommes, 180.
72. Li, Q. H., Zhang, Y. F. Liu, X. C. (1999). Study on characteristic and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences)*, 3, 66 – 68.
73. Li, Z. Y., Guo, S. Y., Li, L. & Cai, M. Y. (2007). Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 98, 700 - 705.
74. Lim, B. J., Jeong, J. Y. & Chang, Y. K. (2012). C-phycocyanin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Renal Failure*, 34(7). 892 – 900.
75. Liu P, Piao X, Thacker P, Zeng Z, Li P, Wang D et Kim S. (2010). Chitooligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science*, 88, 3871 - 3879.
76. Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T., Cai, Y. (2016). Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1155/2016/7803846.
77. Loke, M. F., Lui, S. Y., Ng, B. L., Gong, M. & Ho, B. (2007). Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50, 231 - 238.
78. Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C. Colla. E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724 – 732. doi: 10.1002/jsfa.7987
79. Manet, A. (2016). *La spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine*. (Thèse de doctorat). Université de Grenoble Alpes.
80. Mansouri, A., Atoui, A. K., Boskou, G. & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27 - 36.
81. Martínez-Cayuella, M. (1995). Oxygen free radical and human disease. *Biochimie*, 77(3), 147 - 161.
82. Mercan, D. (2010). *Le stress oxydatif*, Repéré à <https://dokumen.tips/documents/le-stress-oxydatif.html>

83. Min, S. K., Park, J. S., Luo, L., Kwon, Y. S., Lee, H. C., Shim, H. Y., ... Shin, H.S. (2015). Assessment of C-phycocyanin effect on astrocytes-mediated neuroprotection against oxidative brain injury using 2D and 3D astrocyte tissue model. *Scientific Reports*, 5(14418).
84. Mitra, S., Siddiqui, W. A. & Khandelwal, S. (2015). C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its anti-oxidant and anti-inflammatory property: a comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. *Chemico-Biological Interactions*, 238, 138 – 150.
85. Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P. & Khalil, S. J. (2011). C-Phycocyanin Extraction From *Spirulina platensis* Wet Biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45 – 49.
86. Morin, L. (2014). Microalgue : La spirale vertueuse. Repéré à [http://www.liberation.fr/futurs/2014/09/14/microalgue-la-spirale-vertueuse\\_1100314](http://www.liberation.fr/futurs/2014/09/14/microalgue-la-spirale-vertueuse_1100314)
87. Moukette, B. M., Ngo-Matip, M. E., Pieme, C. A., Azabji-Kenfack, M. Korosky, E. & Stefanini, P. (2015). Impact of daily supplementation of *Spirulina platensis* on the immune system of naïve HIV-1 patients in Cameroon: a 12-months single blind, randomized, multicenter trial. *Nutritional Journal*, 14(70).
88. Nakao, M., Okamoto, S., Kohara, M., Fujishiro, T., Fujisawa, T., Sato, S., Tabata, S., Kaneko, T. & Nakamura, Y. (2010). *CyanoBase: the cyanobacteria genome database update*. *Nucleic Acids Research*, 38. doi: 10.1093/nar/gkp915.
89. Niu, J. F., Wang, G. C., Lin, X. Z. & Zhou, B. C. (2007). Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 850(1-2), 267-276.
90. Noori, S. (2012). *An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System*. *Open Access Scientific Reports*, 1(8), 413-422.
91. Nutrixeal info. (2020). Xanthophylles. Repéré à <https://nutrixeal-info.fr/index/xanthophylles-carotenoides/>
92. Oliveira, E. G., Rosa, G. S., Moraes, M. A. & Pinto, L. A. A. (2009). Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. *Bioresource Technology*, 100(3), 1297 – 1303.
93. Organisation Mondiale de la Santé. (1993). Evaluation de certains additifs alimentaires. Repéré à [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37087/WHO\\_TRS\\_837\\_fre.pdf;jsessionid=631C7C6F5BDBC7CE8877FEC07EA0D3C9?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37087/WHO_TRS_837_fre.pdf;jsessionid=631C7C6F5BDBC7CE8877FEC07EA0D3C9?sequence=1)
94. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of the browning reaction: antioxidative activities of browning reaction. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(66), 307 - 315.
95. Patil, G. K. S. & Raghavarao M. S. (2007). Aqueous two-phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 156 – 164.
96. Pentón-Rol, G., Marín-Prida, J. & Pardo-Andreu, G. (2011). C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Research Bulletin*, 86(1-2), 42 – 52.
97. Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2001). *Antioxidants in Food. Practical Applications*. Cambridge, England: Woodhead Published Limited.

98. Porto T. S., Medeiros e Silva, G. M. & Porto, C. S. (2008). Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, 47(4), 716 – 721.
99. Pottecher F. (2014). *Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications*. Genève, Suisse : Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. Repéré à <https://patentimages.storage.googleapis.com/89/6b/30/8533981ebf1af4/WO2014045177A1.pdf>
100. Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337 - 341.
101. Proy, M. (2019). *La spiruline et son utilisation à l'officine*. (Thèse de doctorat). Université de Picardie Jules Verne.
102. Raja, R. & Hemaiswarya, S. (2008). A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2), 77 – 88.
103. Ramos, A., Acién, F., Fernández-Sevilla, J. M., González, C. V. & Bermejo, R. (2011). Development of a process for large-scale purification of C-phycocyanin from *Synechocystis aquatilis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(7-8), 511 – 519.
104. Reddy, M. C., Subhashini, J. & Mahipal, S. V. K. (2003). C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 385 – 392.
105. Riss, J. Décordé, K. & Sutra, T. (2007). Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7962 – 7967.
106. Rolland, Y. (2004). Actualités Des Lipides En Cosmétique : Antioxydants Naturels Végétaux. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 11(6), 419-424.
107. Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N. & García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-Phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, 47(1), 36 – 41.
108. Romay, C., González, R., Lédon, N., Ramirez, D. Rimbau, V. (2003). C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4(3), 207 – 216.
109. Safer, A. M. & Al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive butylated hydroxyl toluen (BHT) in rats; An electron microscopical study. *Histology and Histopathology*, 14, 391 - 406.
110. Sajon, S. R., Sana, S., Rana, S., Rahman, S. M., Nishi, Z. M., (2018). Mushrooms: Natural factory of antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 464 – 475.

111. Sall, M. G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehua, E. & Kuakuwin, N. (1999). Résultats d'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline à Dakar. *Médecine d'Afrique Noire*, 46(3), 143 - 146.
112. Sarada, R., 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.
113. Servais, S. (2004). *Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3*. (Thèse de doctorat). Université de Claude Bernard, Lyon 1.
114. Shalaby, E. A. & Shanab S. M. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 528 - 539.
115. Sheu, M. J., Hsieh, Y. Y., Lai, C. H., Chang, C. C. & Wu, C. H. (2013). Antihyperlipidemic and antioxidant effects of C-phycocyanin in golden syrian hamsters fed with a hypercholesterolemic diet. *Journal of Traditional Complementary Medicine*, 3(1), 41 - 47. doi: 10.4103/2225-4110.106545.
116. Soares, A. F. (2005). *Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines* (Thèse de doctorat). Institut national des sciences appliquées, Lyon.
117. Société Chimique de France. (2018). Chlorophylles. Repéré à <http://www.societechimiquedefrance.fr/chlorophylles.html>
118. Soni, R. A., Sudhakar, K. & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*, 5, 327 – 336.
119. Stanier, R. Y. & Van Niel, Y. (1962). The concept of a bacterium. *Arch Mikrobiol*, 42, 17 – 35.
120. Stewart, D. E. & Farmer, F. H. (1984). Extraction, identification and quantitation of phycobiliproteins pigments from phototrophic plankton. *Limnology and Oceanography*, 29(2), 392 p.
121. Talbi, H., Boumaza, A., El Mostafa, K., Talbi, J. & Hilali, A. (2015). Evaluation de l'Activité Antioxydante et la Composition Physico-chimique des Extraits Méthanolique et Aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(4), 1111 – 1117.
122. Timmermann, B. N., Steelink, C. & Loewus, F. A. (1984). *Phytochemical Adaptations to Stress. Recent Advances in Phytochemistry*, 18. New York: Springer Science + Business Media.
123. Traoré, M. C. (2005). *Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali*. Thèse De Doctorat. Université De Bamako, Mali.
124. Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Exotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178 - 189.

125. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. & Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44 - 84.
126. Vasson, M. P. (2015). *Compléments alimentaires : les clés pour les conseiller à l'officine*. Paris-La Défense : Le Moniteur des pharmacies.
127. Vergley, C. & Rochette, L. (2002). Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire périphérique. *Annales de Cardiologie et d'Angiologie*, 51(2), 109 - 116.
128. Vidalo, J. L. (2008). *Spiruline : l'algue bleue de santé et de prévention*. Paris : Edition du Dauphin.
129. Vidé, J. (2015). *Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium*. (Thèse de doctorat). Université de Montpellier.
130. Wang, J. F., Liu, L., Zheng, Y. C. & He, P. (2003). Technology for plant leaf protein extraction and utilization. *Pratacultural Science*, 20(1), 7 – 11.
131. Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), 1266 – 1274.
132. Widengren, J., Chmyrov, A., Eggeling, A., Löfdahl, P. A. & Seidel, C. A. M. (2007). Stratégies pour améliorer les photostabilités dans la spectroscopie de fluorescence ultrasensible. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(3). 429 – 440. doi : 10.1021 / jp0646325.
133. Xue, C. H., Hu, Y. Q., Saito, H., Zhang, Z. H., Li, Z. J., Cai, Y. P., ... Imbs, A. B. (2002). Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9 – 13.
134. Yamamoto, C., Nakamura, A., Shimada, S., Kaji, T., Lee, J. B. & Hayashi, T. (2003). Differential effects of sodium spirulan on the secretion of fibrinolytic proteins from vascular endothelial 49 cells: Enhancement of plasminogen activator activity. *Journal of Health Science*, 49, 405 – 409.
135. Zhang, D., Huang, J., Xie, F. & Lin, D. (2015). The potential role of COX-2 in cancer stem cell-mediated canine mammary tumor initiation: an immunohistochemical study. *Journal of Veterinary Science*, 16(2). 225 – 231.
136. Zheng, J., Inoguchi, T. Sasaki, S. (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology — Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 304(2), 110 – 120.