



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Abbas Djibrine Naima

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie appliquée

THÈME

L'activité antibactérienne et antifongique de *Spirulina platensis*

JURY

Président :	Djamel Ait Saada	MCA	U. Mostaganem
Encadreur :	Djibaoui Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examineur:	Sidhoum Warda	MCA	U. Mostaganem

Remerciement

Avant toute chose je tiens à remercier Dieu le tout puissant qui ma donner la force et le courage et m'a permis de réaliser ce travail.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance au Pr. **DJIBAOUI Rachid** pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

J'exprime également ma gratitude aux membres de jury, le président **Dr. Djamel Ait Saada** et l'examineur **Mme SIDHOUM Warda**.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.

A l'ingénieur du laboratoire de biologie animale **MmeAMIR Fadila**

Je remerciemes collègues et mes amies et tous ce qui m'ontaidé pendant mon travail, Précisément Moumene Nadjat de m'avoiraccompagné et supporté durantmon stage.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma mère, **Hassaballah Matara**

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Que Dieu te donne santé et bonheur.

A mon très cher père **Abbas Djibrine**

L'homme qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde

A mes chères sœurs : **Aicha, Basma et Oumkalsoum**

Qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mes grands-mères

Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A mon amie **Maimouna famolo**

Pour ton aide et support dans les moments difficiles.

Résumé

Arthrospira platensis ou *Spirulina platensis* tout comme autres espèces des cyanobactéries constituent un groupe incroyablement ancien d'organismes procaryotes riches en acides aminés, en vitamines et en oligoéléments. Elles produisent une variété de métabolites secondaires importants sur le plan industriel, tels que les antibiotiques, les algicides, les antioxydants et les stimulant du système immunitaire.

La présente étude s'est basée sur une caractérisation phénotypique de cinq souches cibles : *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Proteus* sp et *C. albicans* et sur la détermination de l'activité antimicrobienne de deux extraits de *Spirulina plantensis* sur ces cinq souches caractérisées.

L'extraction a été effectuée par deux méthodes : par macération et par soxhlet, en utilisant deux solvants : l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

Selon les résultats obtenus, les deux extraits de *Spirulina platensis* ont montré différents degrés d'activité antimicrobienne. Les diamètres de la zone d'inhibition des varient de 8mm à 17mm. Cette variation est dépendante de la méthode d'extraction et de la souche cible testée.

Mots clés : *Spirulina plantensis*, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

Arthrospira platensis or *Spirulina platensis*, like other species of cyanobacteria, are an incredibly ancient group of prokaryotic organisms rich in amino acids, vitamins and trace elements. They produce a variety of industrial-important secondary metabolites, such as antibiotics, algicides, antioxidants and immune system stimulants.

This study was based on a phenotypic characterization of five target strains : *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Proteus sp*, and *C. albicans* and the determination of antimicrobial activity of two extracts of *Spirulina plantensis* on these five characterized strains.

Extraction was carried out by two methods : maceration and soxhlet, using two solvents : ethanol and ethyl acetate.

Based on the results obtained, the two extracts of *Spirulina platensis* showed different degrees of antimicrobial activity. The diameters of the inhibition zone range from 8mm to 17mm. This variation is dependent on the extraction method and the target strain tested.

Keywords : *Spirulina plantensis*, antibacterial activity, antifungal activity.

ملخص

كالأنواع الأخرى من البكتيريا الزرقاء ، *Arthrospira platensis* أو *Spirulina platensis* هي تشكّل مجموعة قديمة من الكائنات البدائية النواة الغنية بالأحماض الأمينية، الفيتامينات و العناصر القليلة فهي تقوم بتركيب تشكيلة من المستقلبات الثانوية ذات أهمية بارزة على المستوى الصناعي، كالمضادات الحيوية، مبيدات الطحالب، مضادات الأكسدة و منشطات الجهاز المناعي.

الدراسة الحالية تعتمد على تحديد الصفات الظاهرية لخمسة سلالات مستهدفة *E.coli*، *B.cereus*، *S.aureus*، *Proteus sp* و *Spirulina platensis*، كما تعتمد أيضا على تحديد النشاط المضاد للميكروبيلمستخلصين من *Candida albicans* و على السلالات الخمسة المحددة.

acétate d'éthyle الإيثانول و باستعمال مذيبين Soxhlet طريقة النقع و طريقة: أجري الإستخلاص وفق طريقتين نشاط ضد الميكروبيات بدرجات مختلفة *Spirulina platensis* حسب النتائج المتحصل عليها، أظهر مستخلصا هذا الاختلاف مرتبطة بطريقة الإستخلاص و السلالة الميكروبية المستهدفة. مليمتر 17 إلى 8 تراوح قطر مناطق التثبيط من نشاط مضاد للفطريات -نشاط مضاد للجراثيم - *Spirulina platensis*: الكلمات المفتاحية

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations.....	13
Introduction	1
I. Les cyanobactéries	5
1. Définition	5
2. Description.....	5
3. Diversité morphologique	6
4. Multiplication	7
II. Spirulina	9
1. Définition et habitat	9
2. Morphologie et caractères généraux	11
3. Classification	12
4. Reproduction	14
5. Description.....	14
5.1. Découverte et historique.....	14
5.2. Composition de la spiruline.....	17
5.3. Conditions physiques et chimiques de croissance	18
6. Intérêts de la spiruline	19
6.1. Intérêts nutritionnels	19
6.1.1. Protéine et en acides aminés	19
6.1.2. Lipides.....	21
6.1.2.1. Fractions saponifiables (acides gras).....	21
6.1.2.2. La fraction insaponifiable	22
6.1.3. Glucides	22
6.1.4. Vitamines.....	23
6.1.4.1. Les vitamines liposolubles	24
6.1.4.2. Vitamines hydrosolubles	24

6.1.5.	Acides nucléiques (ADN et ARN).....	25
6.1.6.	Enzymes.....	25
6.1.7.	Pigments	25
6.1.8.	Minéraux et oligo-éléments.....	25
6.2.	Intérêts thérapeutiques.....	25
6.2.1.	Effets de la spiruline sur des paramètres biochimiques chez l'homme :.	26
6.2.2.	Effet anti-anémie ferriprive	26
6.2.3.	L'effet du Phycocyanine dans le système sanguin	26
6.2.4.	Effets immunomodulateurs de la spiruline	27
6.2.5.	Activités anti-inflammatoires et essais sur des modèles animaux.....	27
6.2.6.	Activité antivirale	27
6.2.7.	Effets antitumorales	27
6.2.8.	Effets contre le diabète, l'obésité et la circulation sanguine	28
6.3.	Aspects industriels	28
6.3.1.	Spirulina et l'industrie pharmaceutique.....	28
6.3.2.	Spirulina platensis et l'industrie alimentaire	28
6.4.	Aspects économiques	29
7.	Activité antioxydante	29
7.1.	Etude chez l'animal.....	31
III.	Matériels et méthodes	33
1.	Obtention des souches tests	33
2.	Identification phénotypique des souches tests ;.....	33
2.1.	Etude microscopique :	33
2.2.	Etude biochimique	33
2.2.1.	Test d'utilisation du citrate.....	33
2.2.2.	Recherche de l'oxydase	33
2.2.3.	Test mannitol-mobilité	34
2.2.4.	Recherche de la catalase.....	34
2.2.5.	Recherche de la nitrate-réductase.....	34

2.2.6.	Test de fermentation des sucres et de la production de gaz sur milieu TSI 35	
2.2.7.	Test d'indole-uréase	35
2.2.8.	Recherche de la Coagulase.....	35
2.2.9.	Ensemencement en milieu BCPL	35
2.2.10.	Bouillon Clark et Lubs (Test VP-RM).....	36
3.	Etude de l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits de la cyanobactérie <i>Spirulina sp</i>	36
3.1.	Obtention de l'échantillon de la Spiruline	36
3.2.	Extraction des métabolites de la Spiruline	36
3.2.1.	Extraction Par Macération	36
3.2.2.	Extraction par soxhlet	37
3.2.2.1.	Principe	38
3.3.	Calcul de rendements d'extraction.....	40
3.4.	Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de la spiruline	40
3.4.1.	Préparation des cultures bactériennes.....	40
3.4.2.	Préparation des extraits de la spiruline	40
3.4.3.	Activité antibactérienne et antifongique des extraits de spiruline	40
3.4.3.1.	Méthode de diffusion sur disques	40
3.4.3.2.	Méthode de diffusion de puits	41
IV.	Résultats et discussions	44
1.	Identification phénotypique des souches tests ;.....	44
1.1.	Etudes microscopiques	44
1.2.	Etudes biochimiques	44
1.2.1.	Test d'utilisation de citrate	44
1.2.2.	Test d'oxydase.....	45
1.2.3.	Mannitol-mobilité	45
1.2.4.	Recherche de la catalase.....	45
1.2.5.	Recherche de nitrate réductase	46

1.2.6.	Test de fermentation des sucres et de la production de gaz sur milieu TSI	46
1.2.7.	Test Urée-indole	47
1.2.7.1.	Production d'indole	47
1.2.7.2.	Recherche de l'uréase	47
1.2.8.	Test de Coagulase	48
1.2.9.	Le milieu BCPL	48
1.2.10.	Test VP-RM.....	49
1.2.10.1.	Test RM.....	49
1.2.10.2.	Test VP	49
2.	Calcul du rendement d'extraction.....	50
3.	L'activité antibacterienne et antifongique.....	50
	Conclusion.....	56

Liste des figures

Figure 1 : structure d'une cellule de cyanobactérie (Trabelsi,2009).....	5
Figure 2 : Principaux plans d'organisations des cyanobacteries (BERNARD,2014)	7
Figure 3 : Spiruline vue au microscope	11
Figure 4 : Les différentes aspect de la Spiruline	12
Figure 5 : Cycle biologique de la Spiruline	14
Figure 6 : Stromatolithes en formation.....	15
Figure 7 : Photo d'une femme kanembou écrémant la Spiruline du Lac Rombou.....	16
Figure 8 : Composition de la Spiruline.....	18
Figure 9 : Positionnement de la Spiruline par rapport a d'autres aliments en termes de taux de proteines	21
Figure 10 : Structure chimique des chromophores bilins de phycocyanine (a) et bilirubine (b)	30
Figure 11 : pourcentages d'inhibition de différentes fractions obtenues à partir d'extrait protéique pendant le procédé de purification de la phycocyanine	31
Figure 12 : L'échantillon de la poudre de Spiruline	36
Figure 13 : Protocole d'extraction des métabolites de la Spiruline par macération	37
Figure 14 : Protocole d'extraction par soxhlet.....	39
Figure 15 :Etapes de la réalisation de l'activité antimicrobienne par méthodes des puits et des disques.....	42
Figure 16 : Observation microscopique après coloration des souches tests	44
Figure 17 : Résultats du test d'utilisation de citrate.....	44
Figure 18 : Recherche d'oxydase chez <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figure 19 : Mannitol-mobilité.....	45
Figure 20 : Recherche de la catalase	46
Figure 21 : Recherche de la nitrate réductase	46
Figure 22 : Résultats du test TSI.....	47
Figure 23 : Urée-indole	47
Figure 24 : Tube à hémolyse positive et le témoin	48
Figure 25 : Utilisation du lactose dans BCPL.....	48
Figure 26 : Resultats du test VP-RM	49
Figure 27 : Résultats de la méthode par disques	53
Figure 28 : Résultats de la méthode par puits	53

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques sites naturels de <i>Spirulina plantensis</i>	10
Tableau 2: Comparaison entre les genres <i>Spirulina</i> et <i>Arthrospira</i>	13
Tableau 3: Composition en acides aminés de la Spiruline	20
Tableau 4: Pourcentages des principaux acides gras de la Spiruline	22
Tableau 5: Composition en vitamines	24
Tableau 6: Souches tests	33
Tableau 7: Résultats de l'identification phénotypiques des souches tests	49
Tableau 8: Rendement d'extraction	50
Tableau 9: Zone d'inhibition en fonction des méthodes et concentration utilisées	54

Liste des abréviations

AJR : Apports journaliers recommandés

FDA : Food and Drug Administration

HDL : High Density Lipoprotein

IgE : Immunoglobuline E

LDL : Low Density Lipoprotein

PSM : Polysaccharides membranaires

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

TDA : Tryptophane désaminase

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Introduction

Introduction

La spiruline (*Arthrospira platensis* ou *Spirulina platensis*) est une cyanobactérie filamenteuse riche en protéines, vitamines et diverses substances d'intérêt, et ne présente aucune toxicité connue. L'utilisation de la spiruline comme aliment et son commerce remontent à il y a longtemps. Cependant, avant 1970, cette utilisation était restreinte à certaines zones limitées des régions intertropicales, zones où les algues vivaient spontanément dans de nombreux lacs chauds (température supérieure à 30°C) à pH alcalin et à salinité élevée. La popularité des propriétés nutritionnelles de cette cyanobactérie en tant que complément alimentaire riche en protéines, vitamines et diverses substances d'intérêt a suscité une demande génératrice d'un marché actuellement en expansion.

Aux États-Unis, au Japon, en Inde, en Chine, en Thaïlande, à Taïwan et ailleurs, de nombreuses entreprises se consacrent à la culture et à la commercialisation de la spiruline. Actuellement, la production mondiale dépasse les 3 000 tonnes de matière sèche par an (Trabelsi, 2011).

La Spiruline a été largement étudiée et son usage maintenant est répandu dans le monde entier comme un produit alimentaire et comme un complément alimentaire, qui a attiré l'attention des chercheurs depuis de nombreuses années, comme indique les centaines de publications dans ses divers aspects. Son potentiel bénéfique a été expérimentalement prouvé *in vitro* et *in vivo* pour traiter certaines pathologies et dans la prévention de l'hypercholestérolémie, certaines maladies inflammatoires, les allergies, le cancer, la toxicité induite par le médicament, les infections virales, les maladies cardiovasculaires, le diabète et certaines pathologies (Ferhat et Lakehal, 2019).

La recherche de plantes ayant une activité antimicrobienne a pris une importance croissante ces derniers temps, en raison de l'inquiétude mondiale grandissante face à l'augmentation alarmante du taux d'infection par des micro-organismes résistants aux antibiotiques. Bien qu'extrêmement efficaces, les antibiotiques sont capables d'induire une résistance chez les bactéries. Depuis 450 ans, la résistance bactérienne est le principal facteur responsable de l'augmentation de la morbidité, de la mortalité et des coûts des soins de santé liés aux infections bactériennes (Mala et al., 2009).

Il existe donc un besoin urgent de développer des agents alternatifs, qui devraient être exempts d'effets secondaires. Les composés naturels sont plus acceptables sur le plan environnemental (El-Monem et al., 2018).

Le mécanisme de défense contre les antibiotiques est largement présent chez les bactéries (par exemple *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*) et est devenu un problème de santé mondial. Cependant, au cours des trois dernières décennies, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus aux produits naturels issus des plantes pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens et antioxydants. Plusieurs espèces d'algues ou cyanobactéries contiennent des composés bioactifs naturels qui agissent comme de puissants agents antimicrobiens. Les espèces de spiruline, par exemple, possèdent de précieux composés antimicrobiens, antiviraux et antioxydants (Mala et al., 2009).

Ce travail a permis de réaliser trois parties principales :

- La première partie concerne l'identification phénotypiques des souches tests pour confirmer leur pureté. Cette partie est effectuée par une étude microscopique et des tests biochimiques ;
- la deuxième partie s'intéresse à l'extraction des extraits de la poudre de *Spirulina plantensis* par deux méthodes et deux solvants différents ;
- La troisième et la dernière concerne la réalisation des tests sur les effets antimicrobiens des extraits obtenus contre des souches cibles.

Recherche bibliographique

LESCYANOBACTERIES

I. Les cyanobactéries

1. Définition

Les cyanobactéries sont des organismes ayant à la fois certaines caractéristiques des bactéries mais également des plantes. En effet, ce sont des procaryotes de structure cellulaire proche de celle des bactéries et qui possèdent des pigments photosynthétiques analogues à ceux que l'on peut retrouver chez les végétaux. Elles sont donc capables d'effectuer la photosynthèse avec dégagement d'oxygène. Cette double appartenance les a longtemps fait appeler algues bleues, cyanophycées ou cyanoprocaryotes (CHARDONNET, 2007).

2. Description

Les cyanobactéries forment un des groupes bactériens les plus larges et les plus diversifiés écologiquement. Elles sont présentes dans pratiquement tous les environnements et constituent un des acteurs majeurs de la biomasse et de la production végétale sur terre. Ce sont également les seuls procaryotes à réaliser une photosynthèse oxygénée, en utilisant l'eau comme donneur d'électrons, similaire aux algues et aux plantes supérieures (TRABELSI, 2009).

Les cyanobactéries sont des procaryotes à paroi Gram négative et elles sont classées parmi les eubactéries. En effet les cyanobactéries, comme les bactéries vraies, ne possèdent pas de noyau individualisé. Elles sont dépourvues de membrane nucléaire, de nucléoles et de chromosomes différenciés. La partie centrale de la cellule renferme seulement des granulations de chromatine qui représentent un appareil nucléaire très simple. Le cytoplasme lui aussi est simple, en effet, les mitochondries, les dictyosomes et le réticulum endoplasmique n'y sont pas représentés. Les thylakoïdes qui supportent les pigments photosynthétiques, ne sont pas rassemblés en chloroplastes. La paroi cellulaire est par ailleurs caractérisée par la présence d'une couche rigide de peptidoglycane (TRABELSI, 2009).

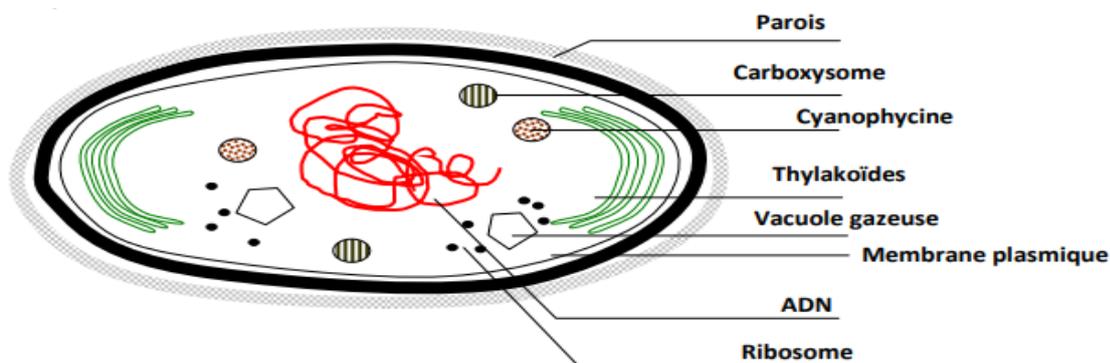


Figure 1 : structure d'une cellule de cyanobactérie (Trabelsi, 2009)

3. Diversité morphologique

Les cyanobactéries présentent une grande diversité de formes et de tailles. Elles sont cependant regroupées en trois grands types d'organisation morphologique :

- Unicellulaire,
- Coloniale
- Filamenteuse pluricellulaire.

Les cyanobactéries unicellulaires peuvent présenter des formes de type sphérique, cylindrique ou encore ovoïde. La multiplication cellulaire de ces individus se fait par fission binaire. Les organismes présentant ce type de morphologie et ne formant pas de colonies sont généralement des picocyanobactéries dont la taille est supérieure à 2-3 μm . Les formes unicellulaires peuvent également former des agrégats au sein d'un mucilage (composé entre autres d'exo polysaccharides) suite à des divisions cellulaires multiples et former des colonies de forme plus ou moins régulière selon les espèces considérées (O/Chroococcale).

Les formes filamenteuses (ou trichomes), issues de divisions cellulaires sur un plan unique, présentent des organisations de type unisériées (O/Oscillatoriales, O/Pseudanabaenales, O/Nostocales) ou plurisériées (une ou plusieurs séries de cellules jointives). Certaines d'entre elles sont pourvues d'une gaine de polysaccharides, ou sont entourées d'une couche de mucilage ou encore présentent des ramifications (vraies ou fausses, O/Stigonematales,). Les formes filamenteuses se dispersent généralement par fragmentation du trichome au niveau de cellules dégénérescentes appelées nécridies (BERNARD,2014).

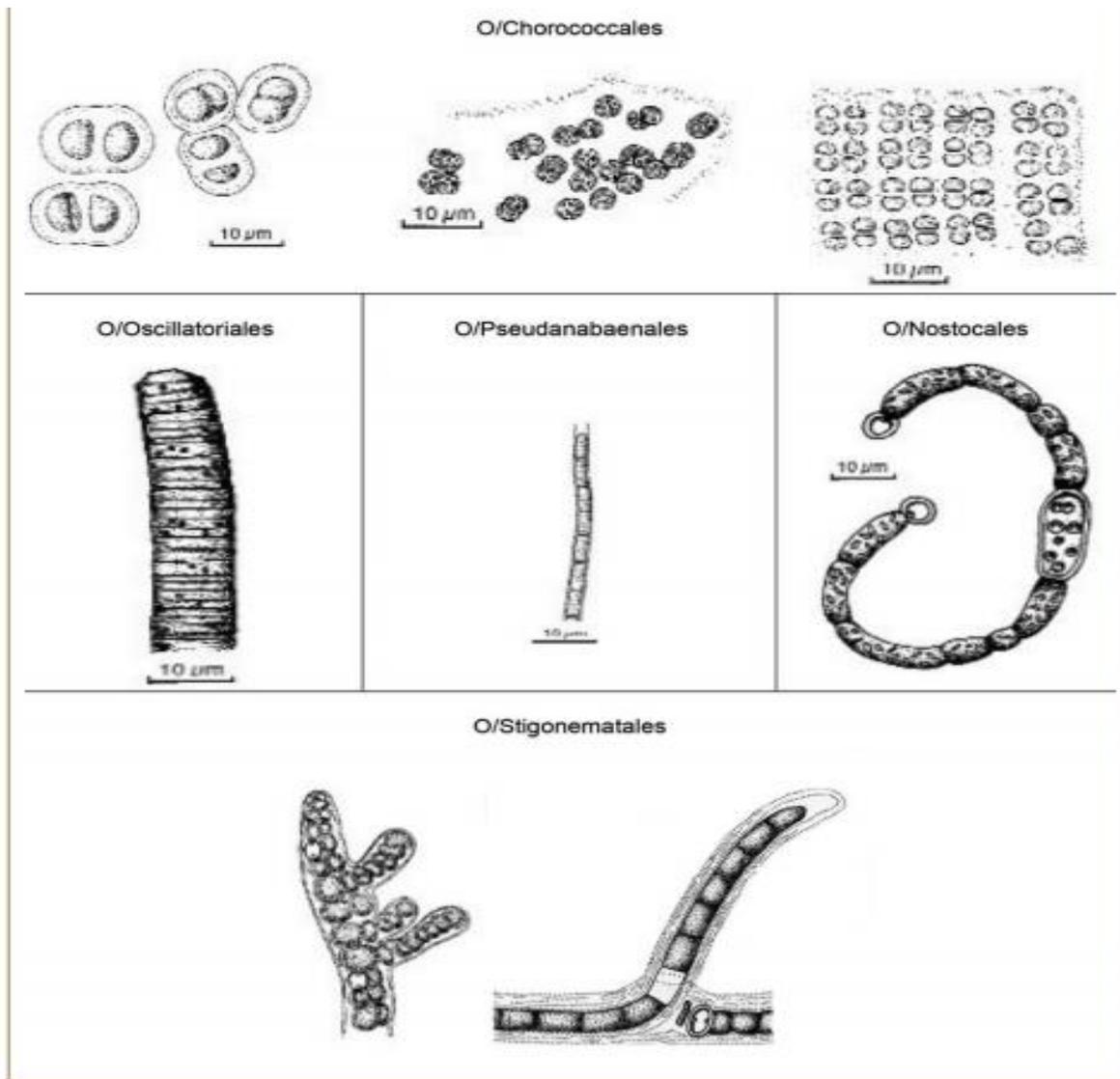


Figure 2 : Principaux plans d'organisations des cyanobacteries (BERNARD,2014)

4. Multiplication

La reproduction des cyanobactéries est une reproduction végétative, c'est-à-dire une reproduction asexuée, elle se produit par division binaire de la cellule mère en deux cellules filles, en bourgeonnement ou en divisions multiples. Selon les espèces et les conditions environnementales, le temps de doublement de la population varie de quelques heures à quelques jours. Chez les formes unicellulaires la division successive de la cellule mère libère des nanocytes ou baeocytes. Ainsi, les formes filamenteuses se dispersent par fragmentation au niveau des nécriides (cellules dégénérantes) libérant de courts trichomes ou filaments (les hormogonies) (ENORA,2008).

Spirulina plantensis

II. Spirulina

1. Définition et habitat

De son nom scientifique *Arthrospira platensis*, la spiruline est une cyanobactérie multicellulaire et filamenteuse qui a acquis une popularité considérable dans le secteur de la santé, de l'industrie alimentaire et des aquacultures. Il se développe et pousse dans l'eau, peut être récolté et transformé facilement. Il a une teneur très élevée en macro et micronutriments, en acides aminés essentiels, en protéines, en lipides, en vitamines, en minéraux et en anti-oxydants. La spiruline est considérée comme un complément alimentaire complet pour lutter contre les carences de malnutrition dans les pays en développement (Ruma et al. ;2017).

C'est un organisme procaryote qui partage avec les plantes la capacité d'effectuer de la photosynthèse. À partir des composés minéraux, d'eau et de l'énergie lumineuse captée grâce à la chlorophylle, il transforme le gaz carbonique et dégage de l'oxygène (Ahounou,2018).

La spiruline se développe dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Elle s'observe plus communément dans les eaux saumâtres ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (Sguera ,2008).

Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud. Ainsi on la retrouve généralement dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou) et en Asie du sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). Il s'agit certes d'un organisme cosmopolite mais il est beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe (Charpy et al. ; 2008).

Son habitat naturel est donc une eau :

natronée (contenant du bicarbonate de sodium nature) dont le pH doit être compris entre 8,5 et 11, saumâtre (de 20 à 70 g de sel par litre d'eau), Chaude (entre 35 et 40°C), la croissance varie durant la journée, en dessous de 15°C et au-dessus de 39°C, elle s'arrête, où le rayonnement solaire est important (donc soit sous les tropiques soit en altitude), riche en nutriments apportés par les affluents des lacs et des sols (fer, azote, urée, acide phosphorique, sulfate de magnésium...).riche en gaz carbonique et oxygène. Par ailleurs ce milieu chaud et alcalin, et la forte concentration en bicarbonate sont peu propices à la prolifération d'autres micro-organismes, garantissant une propreté microbiologique (Manet,2016).

Tableau 1: Quelques sites naturels de *Spirulina plantensis* (Sguera,2008)

<u>Afrique</u>	
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du Kanem : lacs Latir, Ouna, Bor-kou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom, Ounianga Kébir
Soudan	Cratère de Djebel Marra
Djibouti	Lac Abber
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe
Congo	Mougounga
Kenya	Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron
Tanzanie	Lac Natron
Tunisie	Lac Tunis ; Chott el Jerid
Zambie	Lac Bangweoulou
Madagascar	Beaucoup de petits lacs près de Toliara
<u>ASIE</u>	
Inde	Lacs Lonar et Nagpur
Myanmar	Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank
Sri Lanka	Lac Beira
Pakistan	Mares près de Lahore
Thaïlande	Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de Radburi, 80 km au S.O. de Bangkok
<u>AMERIQUE DU SUD</u>	
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas Près de l'Île d'Amantani dans le lac Titicaca
Mexique	Lac Texcoco ; lac Cratère
Uruguay	Montevideo
Equateur	Lac Quiliotoa : cratère de 1km de diamètre
<u>AMERIQUE DU NORD</u>	
Californie	Oakland ; Del Mar Beach
Haïti	Lac Gonâve
République Dominicaine	Lac Enriquillo
<u>EUROPE</u>	
Hongrie	Non précisé
France	Camargue
<u>AUTRES SITES POSSIBLES</u>	
Partout où vivent le flamant nain, <i>Phoenicoenaias minor</i> (Afrique et Asie) et le flamant de James, <i>Phoenicoparrus jamesi</i> (Amérique du sud)	
Ethiopie	Lac Abiata
Kenya	Lac Rodolphe ; lac Hannington

Tanzanie	Lac Manyara ; lac Rukua
Zambie	Lac Mweru
Botswana	Makgadigka Salt Pans
Namibie	Etosha Salt Pan
Afrique du Sud	Etat libre d'Orange, près de Vaaldam
Bolivie	Lacs Colorado, Poopo, Chalviri, Salar de Uyuni
Chili	Aguas Calientes, Lagunas Brava, lac Vilama, Salar de Surire
Mauritanie	Côte sud
Inde	Rann of Kutch ; Gujarat
Madagascar	Côte Ouest

2. Morphologie et caractères généraux

La Spiruline est une cyanophycée microscopique d'une longueur moyenne d'environ 250µm. Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12 µm de diamètre non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires (Goulamabasse,2018).

Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort ce qui lui a valu son appellation de « Spiruline » (Charpy et *al.*,2008).



Figure 3 : Spiruline vue au microscope (Goulamabasse,2018)

Cependant les Spirulines présentent différentes formes (figure2). On trouve des formes spirales classiques (figure 2A), ondulées (figure2B) et parfois droites (figure 2C). Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat (Goulamabasse ,2018 ; Charpy et *al.* ;2008).

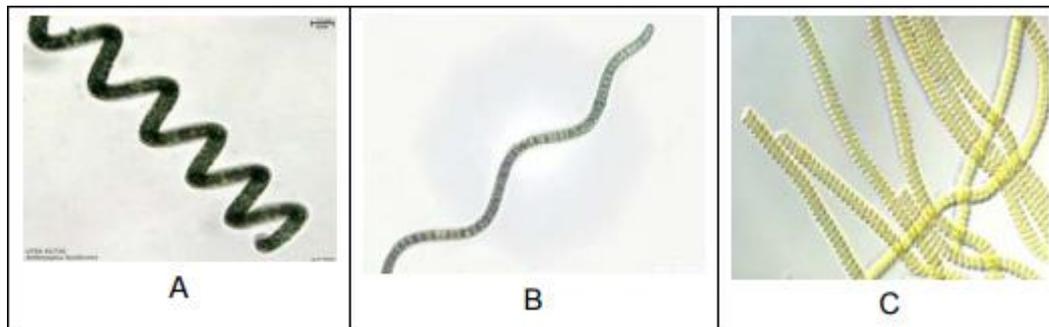


Figure 4 :Les différentes aspect de la Spiruline (Charpy et *al.* ;2008)

Plus précisément, la Spiruline est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament ou trichome. L'enroulement du trichome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au-dessus de la spirale. Les facteurs environnementaux telles les températures auraient cependant une influence sur l'orientation de l'hélice, (Muhling et *al.* ; 2003).

Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis. Le système pigmentaire de la Spiruline est constitué de chlorophylle a ; de pigments hydrosolubles, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleu (phycocyanine) ; de caroténoïdes (β -carotène, cryptoxanthine) (Charpy et *al.* ;2008).

3. Classification

La spiruline a été décrite pour la première fois par Wittrock et Nordsted en 1844 sous le nom de *Spirulina jeneri plantensis* Nordsted (Vonshak, 1997).

En 1960, la distinction entre les procaryotes et les eucaryotes est établie. Elle se base sur la différenciation d'organisation cellulaire. En 1962 Stanier et ses collaborateurs constatèrent que cette « algue bleue verte » était dépourvue de compartiments cellulaires. Elle fait donc partie des procaryotes. Ils proposèrent de désigner ce microorganisme « cyanobactérie », avec un préfixe d'origine Grec « cyano, cyan » du nom du pigment bleu la phycocyanine qui la compose (Nicoletti, 2016).

Cette nouvelle désignation est acceptée et figure pour la première fois au « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » en 1974 (Vonshak, 1997).

On la classe selon Ripley Fox (1999) (Ferhat et Lakehal,2019) :

Règne: Monera

Sous règne : Prokaryota ; **Phylum :** Cyanobacteria

Classe : Cyanophyceae

Ordre : Nostocales

Famille : Oscillatoriceae

Genre : *Arthrospira*

Espèces : *Arthrospira platensis*

Cependant il existe plusieurs espèces en fonction du lieu de découverte (Manet,2016) :

A. platensis Nordstedt la plus commune est celle où il existe le plus d'études, retrouvée au

Tchad, Congo, Éthiopie, Afrique du Sud...

- *A. geitleri* Stizenberger ou *A. maxima* Stizenberger retrouvée au Mexique

- *A. paracas* Planchon retrouvée au Pérou.

- *A. subsala* Oersted retrouvée en mer

- *A. major* Kutzing, *A. jenniferi* Stizenberger

De nouvelles espèces ont émergé après des améliorations pour développer des souches plus résistantes, plus productives et ayant la meilleure qualité nutritionnelle. Selon des articles, la spiruline a deux noms de genre. La confusion entre *Spirulina* et *Arthrospira* est due au fait qu'*Arthrospira stizenberger* (initialement nommé par M. Stizenberger) et *Spirulina turpin* (forme propre) ont été unifiées en *Spirulina* par M. Geitler en 1932 en se basant uniquement sur leur forme en spirale. Bien que leurs différences morphologiques soient rappelées dans Tableau 2, les deux noms de genre existent toujours (Manet,2016).

Tableau 2: Comparaison entre les genres *Spirulina* et *Arthrospira* (Manet,2016).

<i>Arthrospira</i>	<i>Spirulina</i>
Trichomes en hélice ouverte	Trichomes en hélice presque fermée
Paroi cellulaire visible si les vacuoles à gaz ne sont pas trop nombreuses	Paroi cellulaire difficilement visible (gaine non prononcée)
Cellules de 6 à 12 µm de large, possibles constriction entre les cellules adjacentes	Cellules de 2 à 4 µm de large, de forme non fixe et avec peu ou pas de constriction entre les cellules adjacentes
Mobilité par rotation	Mobilité permanente par rotation
La reproduction s'effectue par scission simple ou multiple, par bourgeonnement ou encore par fragmentation au hasard	Reproduction probable par rupture trans cellulaire du trichome

En 1962, les taxonomistes distinguent les procaryotes des eucaryotes. Les algues sont classées comme procaryotes. Mais au final, la Spiruline est au carrefour entre le règne des bactéries (échangeant des informations génétiques entre elles), le règne des plantes (contenant de la chlorophylle), et le règne des animaux (la paroi cellulaire ne contient pas de cellulose (Manet,2016)).

4. Reproduction

Sa reproduction est végétative (asexuée) et s'effectue par scission simple, fission binaire ou multiple, par bourgeonnement ou fragmentation au hasard. Les 3 étapes fondamentales de son cycle de vie sont :

- la fragmentation des trichomes,
- puis les cellules s'élargissent, le trichome mature,
- et se divise en filaments par fission binaire, ces filaments prenant une forme hélicoïdale (Manet,2016).

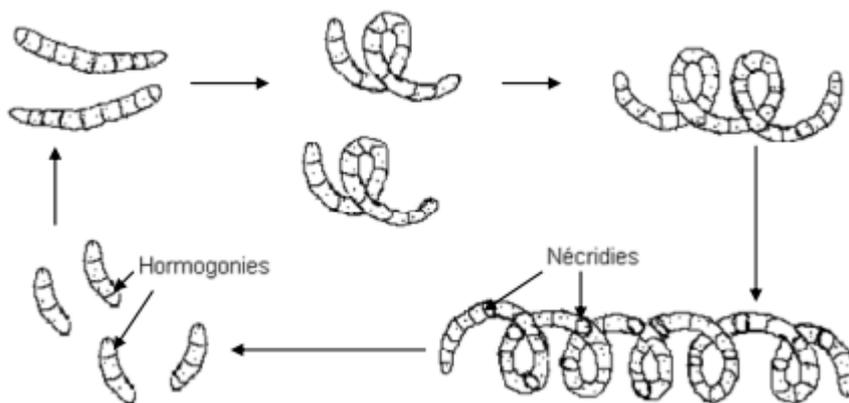


Figure 5 :Cycle biologique de la Spiruline (Charpy et *al.*,2008)

5. Description

5.1. Découverte et historique

Il est admis par la communauté scientifique que l'apparition des cyanobactéries date de 3,5 milliards d'années, constituant ainsi les plus anciennes formes de vie sur terre. (Ahonou,2018)

À la période précambrienne (2,5- 0,5 milliards d'années), les cyanobactéries ont constitué l'essentiel de la biomasse et ont alors permis un accroissement du taux d'oxygène et une di-

minution du taux de CO₂ de l'atmosphère terrestre. Un héritage vivant de cette « Ère des cyanobactéries » est constitué par les stromatolithes en Australie (figure 3) (Bernard, 2014).



Figure 6 : Stromatolithes en formation (Bernard ,2014)

Elles constituent aussi le socle de la vie dans les océans puisqu'elles sont à l'origine de la grande diversité du phytoplancton. Elles résistent aux conditions les plus extrêmes notamment grâce à leur capacité à se rétracter en un agrégat de plusieurs milliers de filaments lorsque les conditions de température ou d'hydratation leurs sont défavorables, elles conservent au centre de leurs capsules un minimum d'humidité nécessaire à leur survie dans l'attente d'une amélioration des conditions extérieures : on parle alors d'état de dormance (Ahounou,2018).

Bien que déjà décrite par Wittrock et Nordstedt en 1844, l'algue ne fut vraiment redécouverte que quelques 450 ans après par le botaniste belge J. Léonard lors d'une expédition belgo-française basée au Tchad (1964 - 1965). Ce dernier a en effet constaté que les Kanembous du sud Kanem écumaient la surface des mares aux environs du lac Tchad, mares riches en carbonates de sodium, à la recherche de la fameuse algue abondante sur ce lac et récoltée sous forme d'une purée bleu-vert. Cette purée était ensuite utilisée dans la préparation de gâteaux vendus dans la région et appelé « dihé ». Un phycologue français Dangeard avait examiné ces gâteaux dès 1940 et avait constaté qu'ils étaient faits d'une algue bleue comestible. Compère constata, en étudiant des échantillons qu'avait ramené Léonard de son expédition, qu'en effet les gâteaux contenaient essentiellement l'algue bleue *Spirulina platensis*. Les chercheurs belges démontrèrent qu'ils sont extrêmement riches en protéines (Sguera ,2008).



Figure 7 :Photo d'une femme kanembou écrémant la Spiruline du Lac Rombou (Sguera,2008)

En effet, elle est non seulement consommée depuis de nombreuses générations en Afrique, mais on a également constaté, en relisant certains chroniques de la conquête espagnole décrivant la vie des Aztèques, et ces derniers la consommaient déjà à cette époque. Le conquistador espagnol Cortès rapporte dans ses mémoires cette curieuse habitude qu'avaient les Indiens de promener à la surface des lacs des filets très serrés, pour récolter une sorte de boue verdâtre, qu'ils faisaient sécher au soleil, pour la transformer et s'en servir. Cette galette, nommée <<te-cuitlatl>> par les Aztèques, constituait leur aliment de base. Ainsi, les Aztèques récoltaient la spiruline de la même manière que le peuple kanembou pour s'alimenter (Joris,2015).

Cependant, la récolte de spiruline s'effondra en même temps que l'empire Aztèque et ne fut redécouverte en ce lieu, que quatre siècles plus tard, de façon inattendue. En effet, dans les années 1970, au Mexique, la société Sosa Texcoco exploitait les eaux alcalines souterraines du lac Texcoco. L'extraction du carbonate de sodium était perturbée par une minuscule algue qui obstruait le système, l'algue qui gênait tant l'extraction était consommée depuis des années par les peuples du lac Tchad, la spiruline. Après son identification l'ingénieur français, Hubert Durand-Chastet, qui dirigeait la société Sosa Texcoco et l'Américain Ripley Fox, commencèrent la culture de la spiruline, car ils voyaient en elle, un complément alimentaire d'exception et la solution au problème de la faim dans le monde (Joris,2015 ; Manet,2016).

Et en 1967, la spiruline fut nommée comme wonderful future food source par the International Association of Applied Microbiology. En 1974, La FDA reconnaît les bienfaits de la spiruline. Cette même année, the United Nations World Food Conference déclare la spiruline comme « best food for the future ». Elle peut être légalement commercialisée comme nourriture ou complément nutritif si elle est étiquetée correctement et qu'elle ne contient pas de substances contaminées ou altérées et peut être ainsi incorporée dans des produits alimentaires

(pâtes, barre de céréales, composant de salade...). Elle peut aussi être utilisée comme colorant alimentaire.

En France, il aura fallu 10 ans pour que le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique donne un avis favorable à la consommation d'algues en 1984.

En 1979, la spiruline arriva dans les premiers magasins au États-Unis. La même année fut créée en Californie une firme, Earthrise Spirulina Compagny, aujourd'hui leader mondial sur le marché de la spiruline (Manet,2016).

5.2. Composition de la spiruline

La composition de la spiruline varie selon les conditions de culture, la période de récolte, l'origine géographique, le procédé de récolte, de séchage, de broyage, de conditionnement, mais aussi par le taux d'ensoleillement et de ce fait certains industriels modifient les milieux de culture afin que la spiruline produite soit plus riche en fer, en zinc ou encore en acides gras (Goulamabasse ,2018).

En moyenne, la spiruline contient en poids sec jusqu'à 70 % de protéines. Outre une concentration en protéines très importante, la spiruline contient énormément de micronutriments tels que des vitamines, des minéraux et des pigments fortement antioxydants :

- Des protéines végétales complètes hautement assimilables.
- 12 vitamines : Béta-carotène, D, E, K, B1, B2, B3, B5, B6, Inositol (B7), B8, B9, B12,
- 11 minéraux et oligoéléments : Calcium, Fer, Magnésium, Phosphore, Potassium, Zinc, Cuivre, Manganèse, Sodium, Chlore, Sélénium,
- 18 acides aminés dont 8 essentiels ;
- 3 pigments : Phycocyanine, Chlorophylle, Caroténoïde ;
- Des enzymes dont la superoxyde dismutase ;
- 7 acides gras essentiels : AC. Palmitique, AC. Palmitoléique, AC. Stéarique, AC. Oléique, AC. Linoléique...
- Des glucides (Robin,2017).

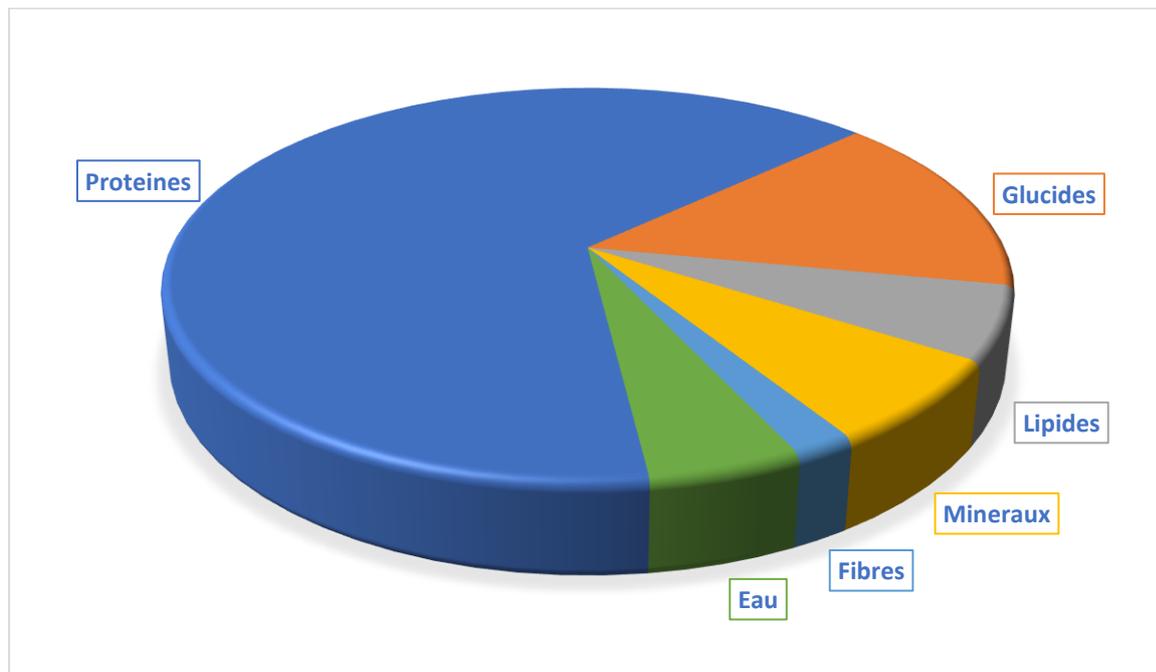


Figure 8 :Composition de la Spiruline (Robin,2017)

Protéines = 65 % en poids

Glucides = 15 % en poids

Minéraux = 7 % en poids

Lipides = 6 % en poids

Fibres = 2 % en poids

Eau = 5 % en poids

Contenu énergétique = 5000 calories ou 20,9 kJ/ gramme sec.

5.3. Conditions physiques et chimiques de croissance

Pour se développer, la Spiruline a besoin d'éléments minéraux simples tels l'eau, les sels minéraux, le CO₂ et l'O₂ qu'elle puise directement dans son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie grâce à son système pigmentaire. Ce mode de synthèse de biomasse est la photo autotrophie. La Spiruline croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines (8 < pH < 11,5) et natronées (fortement concentrées en carbonates et bicarbonates) de la zone intertropicale (Charpy *et al.* ;2008).

En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer, sont les éléments limitants de la production phytoplanctonique dans les milieux aquatiques. La Spiruline se développe dans des eaux chaudes (28 à 40°C) et bénéficiant d'une intensité lumineuse élevée. Le vent joue un rôle important en créant une agitation qui favorise une dispersion homogène de la Spiruline dans le milieu, et donc son exposition à la lumière.

En milieu naturel, lorsque les conditions sont optimales, les Spirulines peuvent se développer en grande quantité et entrent alors en compétition avec d'autres organismes. Lors des efflorescences, la consommation des carbonates et bicarbonates entraîne une augmentation du pH limitant ainsi la croissance des autres microorganismes (Goulamabasse ,2018 ; Charpy et *al.* ;2008).

6. Intérêts de la spiruline

En raison de sa culture facile, elle est utilisée dans le domaine animal comme complément protéique. En médecine humaine, elle a été proposée comme additif alimentaire ou comme nutriment à part entière dans les pays à problèmes nutritionnels. De manière plus générale, en matière nutritionnelle tant dans les pays riches que dans les pays pauvres, cette algue fait l'objet d'un véritable « culte », dans de nombreuses publications internet (2600 sites à ce jour à partir du mot clé « spiruline ») avec des résultats réputés spectaculaires dans la malnutrition infantile, sans arguments scientifiques. Elle a même été testée *in vitro* contre le virus du sida (Branger et *al.* ;2003).

6.1. Intérêts nutritionnels

La spiruline est très appréciée pour ses nombreuses propriétés particulièrement intéressantes sur le plan nutritionnel telles que sa composition protéique équilibrée, la présence de lipides essentiels rares ainsi que de nombreux minéraux et vitamines. Dépourvue de paroi cellulosique, la spiruline est facile à digérer crue ou séchée. De nombreux tests nutritionnels ont prouvé la biodisponibilité de ses micronutriments (Raphaëlle et *al.* ;2012).

6.1.1. Protéine et en acides aminés

La spiruline est un aliment très riche en protéine. Ainsi, comme l'indique le tableau ci-dessous la spiruline contient la plupart des acides aminés et notamment tous les acides aminés essentiels constituant près de 60% du poids total des protéines. Ce spectre d'acides aminés montre que la valeur biologique des protéines de la spiruline est élevée et pourrait sûrement être optimisée par les procédés de culture (Sguera,2008).

D'un point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, puisqu'on y retrouve tous les acides aminés essentiels (valine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane) (Ahounou,2018).

Tableau 3: Composition en acides aminés de la Spiruline (Manet,2016)

<u>Acides aminés</u>	<u>Masse en mg/10g de spiruline</u>
Acides aminés essentiels	
Isoleucine	350
Leucine	540
Lysine	290
Méthionine	140
Phénylalanine	280
Thréonine	320
Tryptophane	90
Valine	400
Acides aminés non essentiels	
Alanine	470
Arginine	430
Acide aspartique	610
Cystéine	60
Acide glutamique	910
Glycine	320
Histidine	100
Proline	270
Serine	320
Tyrosine	300

. Plusieurs études ont montré que la spiruline possède des niveaux protéiques similaires à ceux de la viande et du soja. De plus, l'absence de paroi confère à la spiruline une bonne digestibilité, entre 75 et 90%. Ainsi elle ne nécessite ni cuissons ni traitements spéciaux pour rendre ces protéines disponibles (Manet,2018).

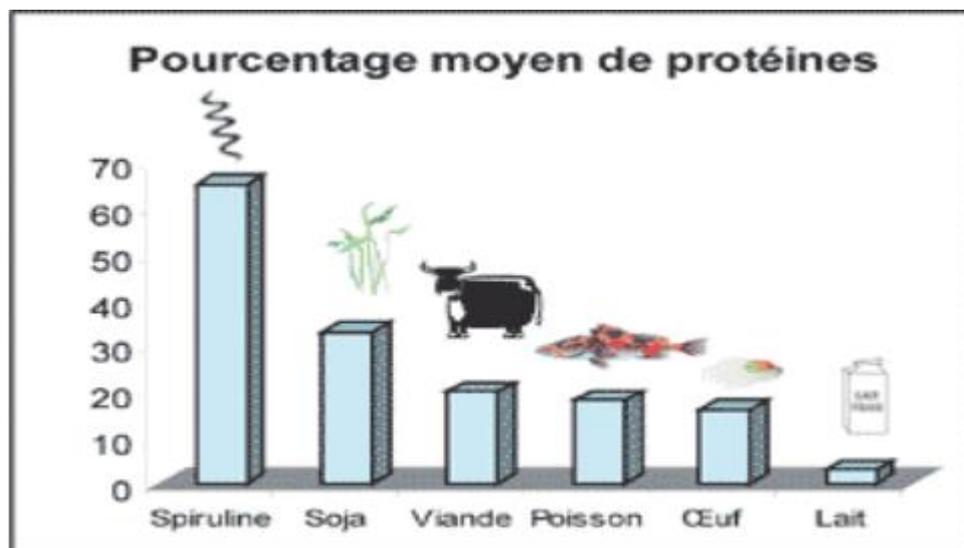


Figure 9 : Positionnement de la Spiruline par rapport à d'autres aliments en termes de taux de protéines (Goulamabasse,2018)

6.1.2. Lipides

Les lipides représentent, généralement, que 6 à 8% de poids sec de la spiruline, mais ils peuvent atteindre jusqu'à 11%. Ces variations quantitatives et qualitatives sont dues aux conditions de culture, méthode d'extraction utilisée et aux variétés de spiruline.

La teneur en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. Les lipides peuvent se répartir en deux fractions : une fraction saponifiable (acide gras) 83% et une fraction insaponifiable 17% (Joris,2015 ; Charpy et *al.* ;2008).

6.1.2.1. Fractions saponifiables (acides gras)

Les acides gras font partie intégrante des lipides qui sont des nutriments indispensables au système nerveux, système cardiovasculaire et à la peau. Ils jouent un rôle énergétique et constituent au maintien de la chaleur corporelle. De plus, ils véhiculent les vitamines liposolubles (A, D, E, K) et contribuent à leur absorption. La fraction saponifiable, représentant 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la spiruline, est essentiellement composée de monogalactosyl diglycéride et de digalactosyl diglycéride (23%), de sulfoquinovosyl diglycéride (5%) et de phosphatidyl glycérol (25,9%). Les triglycérides ne sont présents qu'à de très faibles taux (0,3%). La phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine et le phosphatidyl inositol ne sont présents qu'en très faible quantité (Goulamabasse,2018).

Tableau 4: Pourcentages des principaux acides gras de la Spiruline (Goulamabasse,2018)

Acides gras	% des Acides gras totaux
Palmitique (16 :0)	25.5
Stéarique (18 :0)	1.7
Palmitoléique (16 :1)oméga – 6	3.8
Oléique (18 :1) oméga – 6	16.6
Linoléique (18 :2) oméga-6	40.1
Gamma-linolénique (18 :3) oméga-6	40.1
Alpha-linolénique (18 :3) oméga-3	Traces

La spiruline figurerait parmi les meilleures sources connues d'acide gamma-linolénique, avec le lait humain, et quelques huiles végétales peu connues (huile d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre). La présence d'acide gamma-linolénique est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants et que c'est un précurseur de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (Charpy et *al.* ;2008).

6.1.2.2. La fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable de la spiruline représente 1,1 à 1,3% de la matière sèche et environ 13% de la fraction lipidique totale. Elle est constituée de stérols, de terpènes, de paraffines, et de pigments.

- La quantité de stérols (dont le cholestérol) retrouvée dans la spiruline est très faible, variant entre 0 à 0,015% de son poids sec

-Les alcools terpéniques représentent 5 à 10% de la fraction insaponifiable.

- Enfin, les hydrocarbures saturés (paraffines) représentent entre 0,1 et 0,3% de la spiruline sèche, avec majoritairement du n-heptadécane pouvant dans certaines conditions être toxique (notons qu'on en retrouve dans certaines levures alimentaires à hauteur de 0,1 à 0,5%) (Ahounou,2018).

6.1.3. Glucides

Premières sources énergétiques de l'organisme, les glucides constituent 15 à 25% du poids sec de la spiruline. Les glucosamines et l'acide muramique associés à des peptides, constituent la paroi cellulaire des spirulines. Bien que non digestibles, ces parois sont relativement fragiles

et rendent le contenu cellulaire très accessible aux enzymes de digestion : un avantage important par rapport aux organismes pourvus de parois cellulosiques (levures, chlorelles...) (Ahounou,2018 ; Goulamabasse,2018).

L'essentiel des glucides assimilables sont des polymères : glucosanes aminés rhamnosanes aminés et du glycogène. Tandis que les glucides simples comme le glucose, le fructose, et le saccharose, ainsi que les polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, ne sont présents qu'en très faibles quantités (Ahounou,2018).

Les composés glucidiques importants par leurs propriétés sont :

- Les cyclitols :Présents sous forme phosphorylée, les cyclitols correspondent à 2-3 % de la matière sèche de la Spiruline. Ils se composent essentiellement de meso-inositol phosphate qui constitue une source de phosphore organique ainsi que d'inositol (350-850mg de matière sèche). Cette teneur en inositol serait environ huit fois celle de la viande et plusieurs centaines de fois celle des végétaux les plus riches en cette molécule. Les cyclitols phosphatés sont aussi des capteurs de calcium qui peuvent avoir un effet décalcifiant si l'apport en calcium devenait insuffisant (Charpy et *al.* ;2008).

- Deux polysaccharides complexes sulfatés et spécifiques de la spiruline : spirulane-calcique (Ca-Sp) et du spirulane-sodique (Na-Sp). Le Ca-Sp a fait l'objet de nombreuses études pour ses propriétés antivirales, anticoagulantes, et immunostimulantes (Christophe et Denis,2011).

-Un nouveau polysaccharide d'un poids moléculaire élevé a été isolé chez *Spirulina platensis*. Cet activateur potentiel des monocytes et macrophages humains a été nommé « Immulina ». Ce polysaccharide, structurellement complexe et fortement hydrosoluble, représente entre 0,5% et 2% du poids sec de cette cyanophycée.Il a été étudié pour ses propriétés immunomodulatrices et antimicrobiennes (Ahounou,2018 ; Goulamabasse,2018).

6.1.4. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques nécessaire en faible quantité et ayant un rôle dans le développement, le fonctionnement et l'entretien de l'organisme. Hormis la vitamine D qui est synthétisée au niveau de la peau, les autres vitamines doivent être apportées par l'alimentation en quantité minimales, quelques milligrammes voire microgrammes par jour (Manet,2016).

Tableau 5: Composition en vitamines

Composition	Pour 10g de spiruline
Vitamines liposolubles	
Vitamine A	15 à 24 mg
Vitamine E	0.5 à 1.9 mg
Vitamine K	0.2 mg
Vitamines hydrosolubles	
B1	0.35mg
B2	0.35mg
B3	1.46mg
B5	0.5-10mg
B6	0.08mg
B8	0.5µg
B9	0.01g
B12	0.015-0.032mg

6.1.4.1. Les vitamines liposolubles

Le β -carotène représente 80% des caroténoïdes contenu dans la spiruline, les 20% restants sont de la phycoxanthine et de la cryptoxanthine. Ces deux caroténoïdes sont convertis en vitamine A uniquement par les mammifères. La vitamine A est retrouvée dans les aliments d'origine animale (foie, huile de foie de morue, poissons, œufs et laitages) sous forme de rétinol, directement utilisable ; dans les végétaux c'est son précurseur, le β -carotène, ou provitamine A, uniquement transformé selon les besoins de l'organisme qui est retrouvé. 4 g de spiruline apportent autant de β -carotène que 100 g de légumes de couleurs vives (Manet,2016).

6.1.4.2. Vitamines hydrosolubles

Les vitamines hydrosolubles ne peuvent pas être stockées dans l'organisme (excepté la vitB12), ce qui signifie que leur apport doit être assurées quotidiennement par notre alimentation.

Parmi les vitamines hydrosolubles, on retrouve la vitamine B12 en très grande quantité. La Spiruline en contient 4 fois plus que le foie cru (longtemps considéré comme la source alimentaire la plus riche en vitamine B12). Elle joue un rôle dans la formation de l'ADN et des globules rouges. Cependant, il semblerait que sa biodiversité soit remise en cause chez l'homme. En effet, la plupart de cyanobactéries utilisées en compléments alimentaires con-

tiendraient une part prédominante de pseudo vitamine B12, inactive chez l'homme (Joris,2015).

6.1.5. Acides nucléiques (ADN et ARN)

Le taux d'acides nucléiques est compris entre 4 à 6% dans la matière sèche. Cette fraction correspond aux taux d'ADN (30%) et d'ARN (70%) présents dans la spiruline (Joris,2015).

6.1.6. Enzymes

La spiruline contient une quantité importante de l'enzyme superoxyde dismutase (1.000 à 4.000 UI/g), une puissante enzyme antioxydante. Il s'agit d'une enzyme au fort pouvoir antioxydant (Manet,2016).

6.1.7. Pigments

La spiruline est riche en pigments responsables de sa couleur. Les principaux pigments sont la phycocyanine et la chlorophylle. La phycocyanine est une phycobiliprotéine. Seul colorant bleu alimentaire naturel, elle est le pigment le plus abondant de la spiruline et représente plus de 15 % du poids frais et plus de 20 % du poids sec de l'algue. La chlorophylle est présente en proportion de 9-15 g/kg (Sguera,2008).

6.1.8. Minéraux et oligo-éléments

La spiruline contient tous les minéraux essentiels (7 % du poids sec). Sa teneur en minéraux varie selon le pH et la composition du milieu de culture. Concernant le fer, il est 2 à 3 fois mieux assimilé que celui des légumes ou de la viande. En effet, le fer de la spiruline n'est pas à l'état libre mais chélaté à des acides aminés qui vont favoriser son absorption (Manet,2016).

Le zinc est considéré comme un micronutriment majeur dans la malnutrition. La spiruline ne contient généralement que des traces de zinc mais peut facilement être enrichie. Il existe des protocoles simples pour enrichir la spiruline en zinc. Le magnésium est un élément important pour la santé et une carence est fréquente chez les enfants malnutris La spiruline est naturellement riche en magnésium et la biodisponibilité de celui-ci pour l'homme a été démontrée (Christophe et Denis,2011).

6.2. Intérêts thérapeutiques

Des nombreuses études ont montré l'intérêt thérapeutiques pour l'homme. Des études cliniques ont été menées chez l'homme pour confirmer le rôle de la spiruline dans plusieurs do-

maines thérapeutiques. Elles ont montré son effet dans les maladies cardiovasculaires, diabètes etc... (Mamadou et *al.*,2014).

6.2.1. Effets de la spiruline sur des paramètres biochimiques chez

l'homme :

Il a été montré que la spiruline contribue à l'augmentation du taux de cholestérol HDL et à la diminution des autres paramètres lipidiques (cholestérol total, LDL, VLDL et triglycérides) chez l'homme. Elle diminue aussi le taux de glucose sanguin (la réduction de l'hémoglobine glyquée chez l'homme).

Ces modifications des paramètres ont été observés avec des doses de spiruline allant de 1g /jour à 8g/jour pendant 6 semaines à 2 mois. En outre, une diminution des fréquences cardiaques et de production des apolipoprotéines ont été notés (Mamadou et *al.* ;2014).

6.2.2. Effet anti-anémie ferriprive

Les études sont encourageantes chez le rat dès 1998 sur l'utilisation de la spiruline dans l'anémie, d'où une augmentation du taux d'hémoglobine et de fer sanguin durant la gestation et la lactation des rats est observée après avoir remplacé 45% de leur alimentation quotidienne par de la spiruline. D'autres études chez l'animal existent : chez le rat, la spiruline est efficace contre l'anémie et la leucopénie provoquées par une intoxication au plomb ou au cadmium et elle permet de contrecarrer les désordres hématologiques (hémoglobine, nombre de globules blancs et rouges) causés par la phénytoïne (antiépileptique) à des doses de 200 mg/kg/j, la phycocyanine chez la souris stimule l'hématopoïèse.

La spiruline soit par l'activation de l'érythropoïèse soit par l'apport en vitamine B12 et B9 et en fer peut corriger une anémie et permet d'améliorer les performances physiques, et cognitives et le statut immunitaire. L'augmentation de la ferritine prouve que la spiruline est une source de fer très assimilable, 2 à 3 fois mieux que le fer de la viande. 10 g de spiruline apportant en moyenne 7 à 15 mg de fer (soit 50 à 100 % des AJR) (Manet,2016).

6.2.3. L'effet du Phycocyanine dans le système sanguin

La phycocyanine est un pigment respiratoire de nature polypeptidique propre à la spiruline. Cette molécule complexe agit sur la moelle osseuse en stimulant l'évolution et la différenciation des cellules souches des lignées sanguines rouges et blanches. Cette action a été démontrée par les travaux du Pr Zhang, spécialiste chinois des microalgues, qui a comparé l'action de la phycocyanine à celle des systèmes hormonaux (reins et moelle osseuse) régulateurs de l'érythropoïèse. Cette découverte est corroborée par les travaux d'Evets, chercheur à

l'Université médicale d'État de Grodenski (Russie), qui a traité et guéri de nombreux enfants à la fonction médullaire détruite par l'effet des radiations de Tchernobyl. Ainsi un groupe de 270 enfants irradiés de façon chronique a connu un rétablissement total de la fonction médullaire avec stabilisation du taux des IgE au terme d'un simple traitement de six semaines à raison de 5 g par jour de spiruline (Girardin,2005).

6.2.4. Effets immunomodulateurs de la spiruline

La spiruline intervient au niveau du système immunitaire. Elle active les macrophages et les cellules NK, la production d'anticorps et active également les cellules T et B. Elle a également des effets immunomodulateurs en augmentant la production des cytokines, l'interféron- γ , l'interleukine -2 (IL-2) et de Natural killer (NK) (Mamadou et *al.* ;2014).

6.2.5. Activités anti-inflammatoires et essais sur des modèles animaux

Plusieurs études ont été menées sur des modèles animaux afin de démontrer l'action anti inflammatoire de la phycocyanine *in vivo*. Le mode opératoire utilisé consiste à provoquer l'inflammation au moyen de différents activateurs et de comparer la réaction inflammatoire avec et sans administration préalable de phycocyanine à l'animal (Sguera,2008).

6.2.6. Activité antivirale

Ayehunie et Belay, dirigeant une équipe de chercheurs du Dana Farber Cancer Institute et de la faculté de médecine de Harvard (Boston, États-Unis), ont démontré qu'un extrait hydrosoluble (polysaccharides membranaires) de spiruline permettait d'inhiber la réplication du VIH-1 dans des lymphocytes d'origine humaine, à des doses excluant tout risque de cytotoxicité. L'équipe du Pr Hayashi, de l'American Chemical Society, a également démontré l'efficacité *in vitro* de cet extrait polysaccharidique contre les virus Herpès simplex virus, cytomégalovirus, virus de la grippe A et VIH-1. Le mécanisme semble reposer sur le fait que le virus, ne pouvant se fixer sur la membrane de la cellule hôte, ne peut donc ni pénétrer celle-ci ni, par voie de conséquence, se répliquer (Girardin,2005).

6.2.7. Effets antitumorales

Plusieurs auteurs ont souligné la capacité de la spiruline à accélérer l'élimination des substances radioactives ou chimicotoxiques mutagènes, ce qui peut expliquer une action anticancéreuse préventive. La richesse de la spiruline en antioxydants (bêta-carotène, vitamine E, zinc et sélénium) peut renforcer cette action anticancéreuse.

Le rôle des endonucléases consiste à réparer les altérations subies par le matériel génétique nucléaire (ADN chromosomique), au fur et à mesure qu'elles se produisent à la suite par de l'action de substances délétères comme des substances radio- ou chimiotoxiques. Les PSM de la spiruline agiraient sélectivement sur ces enzymes réparatrices, dans le sens d'une stimulation, ce qui aurait pour effet de faciliter la réparation de l'ADN endommagé et donc d'empêcher un éventuel processus de cancérisation cellulaire (Girardin,2005).

6.2.8. Effets contre le diabète, l'obésité et la circulation sanguine

D'après Takaï et al. (1991), la fraction soluble dans l'eau de la Spiruline a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum. Par ailleurs, Becker et *al.* ont montré en 1986 qu'une supplémentation en Spiruline de 2,8 g 3 fois par jour pendant 4 semaines entraînait une réduction du poids corporel chez les obèses. Iwata et al. (1990) ont remarqué une suppression de l'hypertension chez les rats, suite à un apport de Spiruline (Sguera,2008).

6.3. Aspects industriels

La production mondiale de la spiruline est actuellement estimée à un peu plus de 5 000 tonnes par an. Sa culture à grande échelle a commencé il y a 30 ans au Mexique et en Chine avant de gagner plusieurs autres parties du monde. À l'échelle mondiale, les plus grands producteurs commerciaux de spiruline se trouvent aux États-Unis, en Thaïlande, en Inde, à Taiwan, en Chine, au Bangladesh, au Pakistan, en Birmanie, en Grèce et au Chili. Ils sont représentés par SiamAlgae Company à Bangkok, Earthrise Farm aux États-Unis ou encore Cyanotech Corporation à Hawaï.

Cependant, la production la plus importante provient de Chine. Elle fournit plus de 50 % de la spiruline commercialisée dans le monde. Pourtant, les conditions de production ne sont pas toujours satisfaisantes et le produit fini est souvent de qualité nutritionnelle et toxicologique discutables (Ahounou,2018).

6.3.1. Spirulina et l'industrie pharmaceutique

La spiruline en tant que telle n'intéressera pas les industries pharmaceutiques car, malgré ses propriétés démontrées comme anti-inflammatoire, elle n'apporte pas de réelle avancée thérapeutique et ses effets sont surtout préventifs et non curatifs. Néanmoins, l'étude du mode d'action et de la conformation des molécules actives de l'algue pourrait permettre le développement de nouvelles molécules synthétiques qui pourraient être exploitées dans des médicaments apportant un réel bénéfice thérapeutique (Sguera,2008).

6.3.2. Spirulina platensis et l'industrie alimentaire

Depuis près de 10 ans, la spiruline a déjà été introduit de nombreux produits. Aujourd'hui, la quasi-totalité des compléments alimentaires à base de spiruline sur le marché ont comme indication de traiter la fatigue ou d'apporter une supplémentation protéique. Ces indications utilisent seulement les propriétés nutritionnelles de l'algue à savoir sa composition riche en protéines et en vitamines. Aucun ne fait part des propriétés thérapeutiques. En effet, il est légalement interdit pour un complément alimentaire de vanter des propriétés curatives ou thérapeutiques auquel cas, il serait considéré comme un médicament (Sguera,2008).

6.4. Aspects économiques

Le coût de la spiruline a toujours été des plus variés, depuis même ses premières productions industrielles. En fait, chaque producteur imposait son prix sur le marché selon la qualité de son produit. Il est important de faire la distinction entre coût de production et prix de vente, car si la spiruline était produite à seulement 5\$ le Kg en Extrême-Orient en 1985, le kg s'y vendait déjà à 100\$ alors que Sosa Texcoco le vendait à la même époque à quelques 5\$. Et maintenant encore, c'est un produit à haute valeur ajoutée dans les pays occidentaux, notamment lorsqu'elle est vendue en pharmacie.

En 1996, elle a un coût moyen de 25\$ le kg, prix varie considérablement en fonction du lieu de production, la quantité, la qualité, l'emballage et la conjoncture, auxquels il faudrait ajouter la technique de production. Ainsi, en 1998, 200kg de spiruline d'Extrême-Orient coûtent 10\$ le kg, tandis que le prix international par tonne se situe alors autour de 15 à 20\$ le kg. Le prix du détail tourne autour de 80\$ le kg, mais en pharmacie sous forme de gélules, la spiruline se vend en moyenne à 300\$ le kg (Elyah,2003).

7. Activité antioxydante

Le stress oxydatif et la production de radicaux libres est très importante pour l'homme car elle lui permet de résister aux virus et bactéries, mais lorsque la production devient anarchique, les radicaux libres et les molécules instables deviennent dangereux et s'attaquent aux molécules voisines, avec des conséquences plus ou moins graves : mort cellulaire ou des dommages à l'ADN qui peuvent produire des cellules mutantes qui causent le cancer. L'oxygène vital de l'organisme devient toxique et est à l'origine de nombreuses maladies (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, diabète de type 2, cataractes dues au vieillissement prématuré, rides de la peau, artériosclérose). Au total, près de 200 pathologies sont liées au stress oxydatif.

L'organisme dispose de plusieurs moyens pour lutter contre ces radicaux libres : système enzymatique (SOD, catalase, glutathion peroxydase), antioxydants (vitamine A, C, E), minéraux (sélénium), composés flavonoïdes... Dans certains cas, plus de radicaux libres sont produites

(pollution, tabagisme, ultraviolets, certaines maladies, aliments, pesticides, radiations : fours à micro-ondes, téléphones portables, etc.).

La prise de compléments alimentaires riches en antioxydants tels que la spiruline qui contient de nombreux systèmes antioxydants (enzymes : SOD, phycocyanine, acide γ -linoléique, β -carotène et vitamine E) peut être bénéfique. 1 kg de spiruline contient autant d'antioxydants qu'une tonne de fruits(Manet,2016).

De nombreux chercheurs ont étudié l'activitéantioxydante de la phycocyanine sous divers aspects.

La structure chimique de la phycocyanine est très proche de celle de la bilirubine, qui est un produit de dégradation de l'hémoglobine. Comme nous le savons tous, la bilirubine est un antioxydant physiologique important contre les espèces réactives de l'oxygène. Il inhibe les modifications oxydatives des protéines plasmatiques et des résidus d'acides aminés aromatiques.

L'absorption des radicaux libres d'oxygène par la bilirubine protège l'albumine sérique et d'autres cibles biologiques (Sguera,2008).

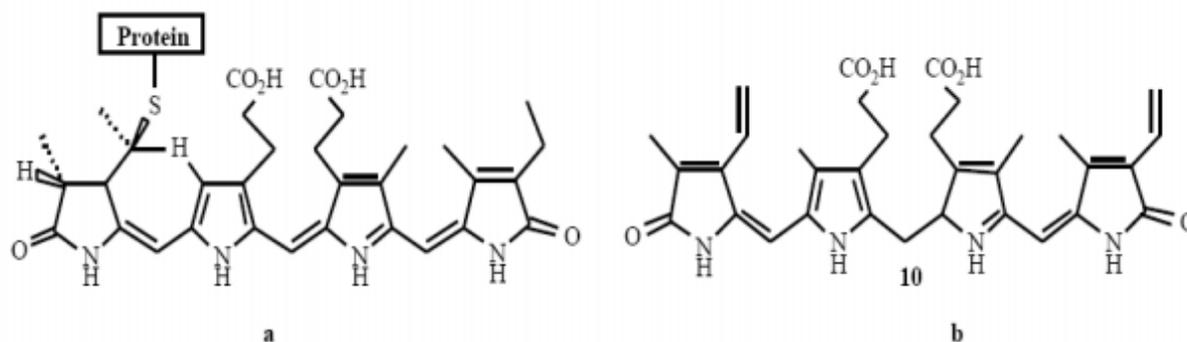
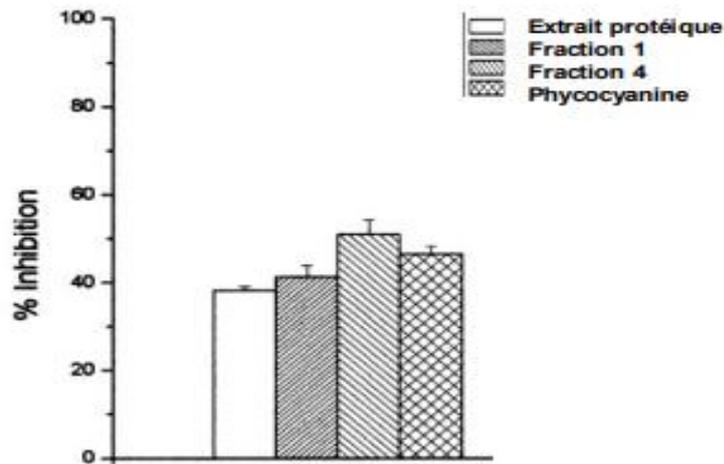


Figure 10 :Structure chimique des chromophores bilins de phycocyanine (a) et bilirubine (b)(Sguera,2008).

Afin de prouver que l'activité antioxydante de *Spirulina platensis* est bien la phycocyanine, Piero Estrada *et al.* (2001) ont comparé la capacité de l'extrait de protéine de spiruline et de l'extrait de phycocyanine pure à éliminer les radicaux libres hydroxyles.

Les résultats présentés ci-dessous indiquent que les phycobiliprotéines sont principalement responsable de l'activité antioxydante. La partie 4 correspond à la phycocyanine purifiée, et son activité est supérieure à celle de la fraction 1 non purifiée qui, elle-même est supérieure à l'extrait protéique seul (Sguera,2008).



Fraction 1 : extraction par solvant puis filtration sur colonne = phycocyanine impure
 Fraction 4 : extraction par solvant puis filtration sur colonne et purification par chromatographie = phycocyanine purifiée

Figure 11 : pourcentages d'inhibition de différentes fractions obtenues à partir d'extrait protéique pendant le procédé de purification de la phycocyanine (Sguera,2008).

7.1. Etude chez l'animal

De nombreuses études animales ont testé l'activité antioxydante de la spiruline. Le modèle d'hypercholestérolémie du lapin blanc de Nouvelle-Zélande a été utilisé pour étudier les effets bénéfiques de *Spirulina platensis* sur la peroxydation des lipides tissulaires et les dommages oxydatifs à l'ADN.

L'hypercholestérolémie est induite en nourrissant des lapins avec un régime riche en cholestérol (HCD : High Cholesterol Diet) pendant 4 semaines. Le régime a ensuite été complété avec de la spiruline (1 ou 5%, w/w) pendant 8 semaines. Les auteurs ont constaté que la supplémentation en spiruline réduisait significativement l'augmentation de la peroxydation lipidique induite par le HCD. En effet, la peroxydation lipidique est revenue à un niveau contrôlé.

De plus, le niveau de dommages à l'ADN dans les lymphocytes est considérablement réduit. Cela suggère que les compléments alimentaires à base de spiruline sont une stratégie prometteuse pour protéger les cellules de la peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN causés par le stress oxydatif (Goulamabasse, 2018).

Matériels et Méthodes

III. Matériels et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de biologie animale 01 de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, durant la période allant 25 avril au 10 juin 2021.

1. Obtention des souches tests

Cinq souches ont été obtenus des différents laboratoires de recherche et pédagogiques de l'université de Mostaganem (UMAB) sont montrées dans le tableau suivants :

Tableau 6: Souches tests

Les bactéries Gram positives	Les bactéries Gram négatives	Levure
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Proteus sp</i>	<i>albicans</i>

2. Identification phénotypique des souches tests ;

2.1. Etude microscopique :

Des frottis fixés ont été préparés à partir des souches pures puis une coloration de Gram a été effectué. La forme, la disposition des cellules et le type de coloration de Gram ont été enregistrés.

2.2. Etude biochimique

2.2.1. Test d'utilisation du citrate

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone ; le citrate. Les bactéries possédant l'enzyme citratase sont capables de se développer sur ce milieu. La bactérie qui utilise le citrate alcalinise le milieu, ce qui fait virer le bleu de bromothymol du vert au bleu en milieu basique (Meziani, 2012). L'ensemencement du milieu se fait en surface, par une strie centrale et longitudinale puis incubation à l'étuve 37°C pendant 18 à 24 heures.

2.2.2. Recherche de l'oxydase

Ce test est réalisé sur une colonie pure ou sur plusieurs petites colonies. Celles-ci sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rond. Une goutte d'eau distillée est déposée sur un disque oxydase. La colonie prélevée est étalée et frottée sur le disque ; L'apparition d'une cou-

leur violette en quelques secondes à une minute indique une réaction positive, i.e. la mise en évidence de la cytochrome oxydase, enzyme de la chaîne respiratoire.

2.2.3. Test mannitol-mobilité

Le test de mobilité est réalisé en tubes contenant un milieu mannitol. Le milieu est inoculé par piqûre centrale, à partir d'un inoculum en milieu liquide, et est incubé au 24 heures à 37°C. Une croissance en halo autour de la piqûre signifie que le germe est mobile, une croissance uniquement autour de la piqûre signifie que la bactérie n'est pas mobile. Et le virage du milieu vers le jaune orangé signifie que la bactérie a utilisé le mannitol.

2.2.4. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) formé comme sous-produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage (Meziani,2012).

Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H₂O₂, puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée ou une anse plastique à usage unique :

- Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase.
- Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

2.2.5. Recherche de la nitrate-réductase

La nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess.

- Ensemencer le bouillon nitraté avec quelques gouttes de suspension bactérienne.
- Incuber 24h à 37 °C

Lecture : Après 24 heures d'incubation à 37°C

- Vérifier que le bouillon est trouble (présence de culture)
- Ajouter le réactif de Griess (Nitrite I + Nitrite II).
- Observer la couleur du milieu.
- Ajouter du zinc selon le résultat de l'étape précédente et interpréter la couleur du milieu.

2.2.6. Test de fermentation des sucres et de la production de gaz sur milieu TSI

C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H₂S) et de gaz.

Commencer par ensemencer la pente par des stries serrées ensuite le culot par une piqûre centrale puis incuber à 37°C pendant 18h-24h.

2.2.7. Test d'indole-uréase

Le milieu urée-indole est un milieu de culture qui permet en 24 h de réaliser trois tests biochimiques qui permettent l'identification de germes, particulièrement les entérobactéries. Ces trois tests sont : Le test uréase, le test TDA, et le test indole (Meziani, 2012).

Ensemencer chaque tube abondamment à partir d'une culture pure et fraîche prélevée sur un milieu d'isolement ensuite incuber pendant 18-24 heures à 37°C.

2.2.8. Recherche de la Coagulase

Le test de la coagulase différencie les souches de *Staphylococcus aureus* des autres espèces à coagulase négative (SCN).

Dans un tube à hémolyse, on a introduit successivement :

- 0,5ml de Plasma de lapin
- 0,5ml d'une culture de 24 heures.

Après l'homogénéisation on incube les tubes à 37°C et la lecture du résultat est réalisée après 2h, 4h et 24h. La réaction est considérée comme positive lorsque le coagulum occupe les 3/4 du volume initialement mis en jeu (Boussoufa, 2018).

2.2.9. Ensemencement en milieu BCPL

Le bouillon lactosé BCPL est un milieu de culture comportant un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol. Ce dernier donne une couleur pourpre au milieu, et passe au jaune si le lactose du milieu est utilisé par les bactéries, par fermentation.

A partir d'une culture bactérienne on ensemence le milieu et l'incube à 37°C pendant 18-24h.

2.2.10. Bouillon Clark et Lubs (Test VP-RM)

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Clark et Lubs et nous l'avonsensemencé à l'aide d'une anse de platine avec la souche bactérienne à analyser. Après avoir incubé à 37C° pendant 18 heures nous avons partagé le milieu en deux tubes pour pratiquer les deux tests :

- Réaction de Voges-Proskauer en ajoutant quelques gouttes du réactif VP1 et le même volume du réactif VP2. La lecture s'effectue après quelques minutes.
- Test du rouge de méthyle en additionnant 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. La lecture est immédiate.

3. Etude de l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits de la cyanobactérie *Spirulina sp*

3.1. Obtention de l'échantillon de la Spiruline

L'échantillon de la spiruline a été acheté dans une pharmacie à Mostaganem



Figure 12 :L'échantillon de la poudre de Spiruline

3.2. Extraction des métabolites de la Spiruline

L'extraction a été réalisée par deux méthodes : méthode d'extraction par macération et par soxhlet ainsi que deux solvants l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

3.2.1. Extraction Par Macération

3g de poudre de spiruline ont été mélangés à 30ml d'éthanol à l'aide d'un pilon et gardé à 4°C toute une nuit pour une extraction complète. Après, une filtration est effectuée à l'aide d'un papier filtre. Le surnageant a été recueilli après une centrifugation de 6000trs/10min.L'extrait a été concentré sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un rota vapeur. Le résidu sec est conservé à 4°C jusqu'à une utilisation ultérieure (Farag et *al.*,2014).

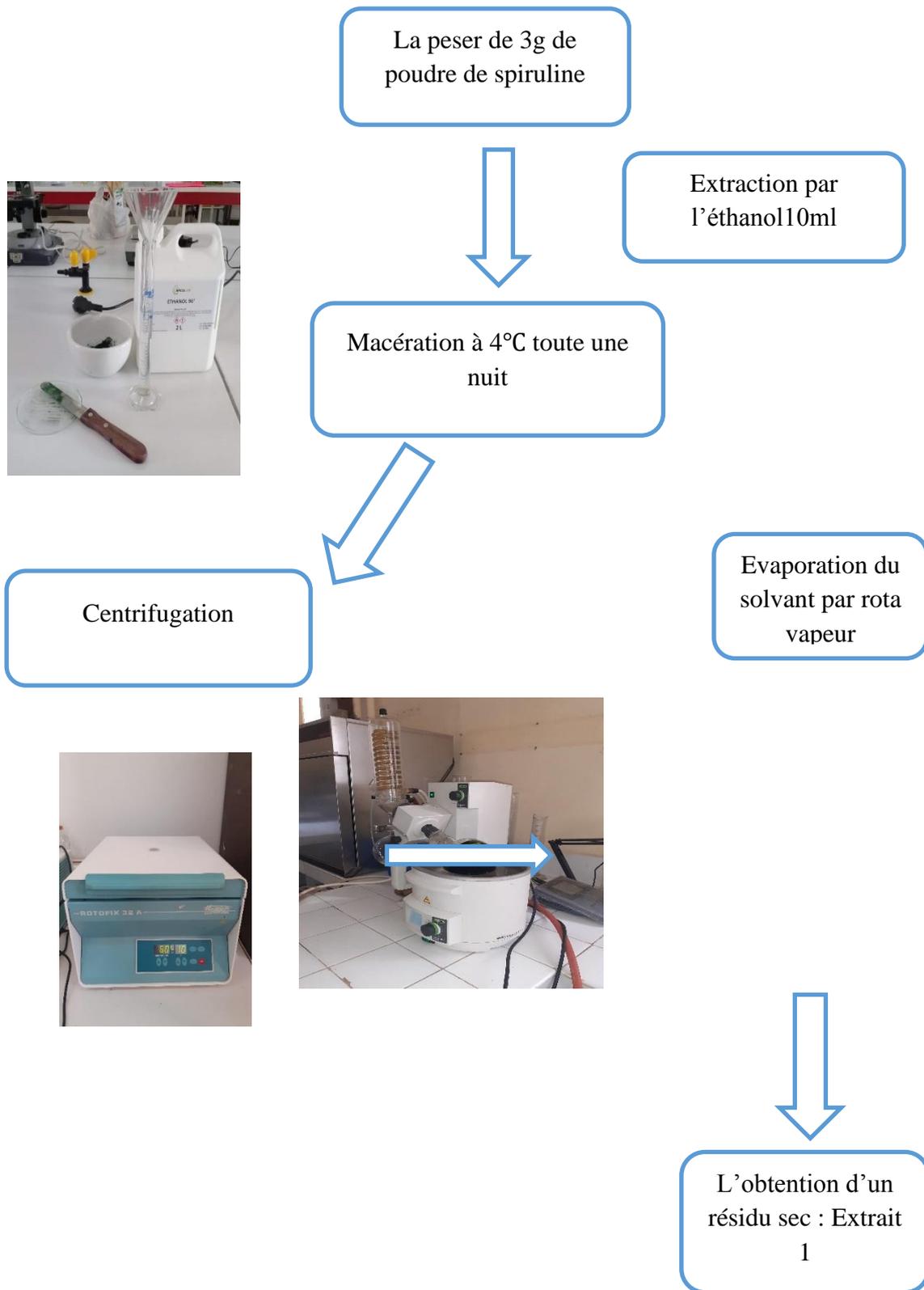


Figure 13 :Protocole d'extraction des métabolites de la Spiruline par macération

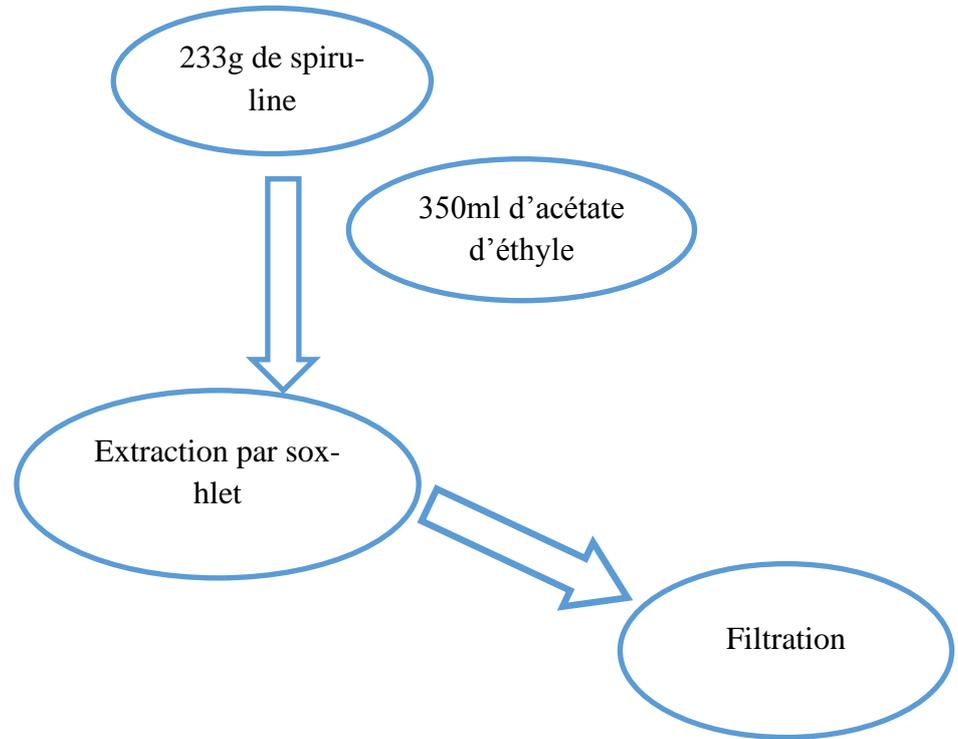
3.2.2. Extraction par soxhlet

Un extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction par solvant en continu d'une espèce chimique dans un poudre solide.

3.2.2.1. Principe

La taille de la cartouche étant limitée il était nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches.

Les 233g de la poudre de spiruline ont été extraites dans trois cartouches différentes avec le même volume d'acétate d'éthyle (350ml). Après, une filtration est effectuée à l'aide d'un papier filtre. L'extrait a été éliminée en utilisant un évaporateur rotatif sous pression réduite à 40°C. Le résidu sec est conservé à 4°C (Juluru et Perumal,2011).



Evaporation du solvant par rota vapeur



Résidu sec conservé à 4°C : Extrait 2

Figure 14 : Protocole d'extraction par soxhlet

3.3. Calcul de rendements d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage du principe actif dissout dans le solvant organique utilisé pour l'extraction. Déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche rendue en poudre utilisée pour l'extraction.

$$R (\%) = [M1 / M0] \times 100$$

R % : Rendement en extraits exprimée en g /100g de matière sèche.

M1 : quantité d'extrait récupérée exprimée en g.

M0 : quantité de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g (Bougoffa et Hamidi, 2020).

3.4. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de la spiruline

3.4.1. Préparation des cultures bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries puis incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. Les cultures pures de 24 heures ont été suspendue dans un tube contenant 5ml de sérum physiologique, la densité optique des suspensions a été ajustée de 0.08 à 0.1, lue à 620 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire voisine à celle de 0,5 Mc Farland. On obtient alors des inoculums estimés de 10⁶ à 10⁸ unités formant colonies par millilitre (UFC/ ml) (Mala et al., 2009).

3.4.2. Préparation des extraits de la spiruline

Pour tester l'activité antimicrobienne et antifongique pour l'extrait obtenus par la méthode de Soxhlet différentes concentrations ont été préparée : 1, 10, 25, 50, 75 et 100 mg /ml dans diméthylsulfoxyde (DMSO) pour l'extrait numéro 1 obtenus par la méthode de Soxhlet. Pour l'extrait par macération juste deux concentrations ont été préparées 1 et 75mg/ml en raison du faible rendement de la méthode d'extraction par macération (Bougoffa et Hamidi, 2020).

3.4.3. Activité antibactérienne et antifongique des extraits de spiruline

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits de la spiruline, deux méthodes de diffusion sur gélose ont été utilisées : méthode de disques et de puits.

3.4.3.1. Méthode de diffusion sur disques

Dans les conditions aseptiques 20 ml de milieu de gélose Mueller-Hinton fondu ont été versé dans des boîtes de Pétri stériles et laissé se solidifier. Les boîtes de pétri contenant de gélose

Mueller-Hinton sont inondées séparément par 1 ml d'une suspension bactérien de 10^8 UFC (unité formant colonie) /ml, des disques stériles (stérilisation à 120°C pendant 20 min par autoclavage) de papier wattman de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface de la gélose Mueller-Hinton (2 disques/boite) puis inondés par l'extrait par macération de spiruline des concentrations 1 et 75mg /1m) à l'ordre de 20μ par disque. Puis laisser les boites sur la pailasse pendant 30 minutes pour que le composé se diffuse correctement. Les boites sont incubées à 37° pendant 18 à 24h (Frag et *al.*,2014).

Comme témoins positifs et négatifs des disques imprégnés de DMSO et des disques d'antibiotiques chargés de 30 μg de gentamycine sont utilisés respectivement. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 et 24 heures (Usharani, et *al.*, 2015).

3.4.3.2. Méthode de diffusion de puits

Dans les conditions aseptiques 20 ml de milieu de gélose Mueller-Hinton fondu ont été versé dans des boîtes de Pétri stériles et laissé se solidifier. Les boîtes de pétri contenant de gélose Mueller-Hinton sont inondées séparément par 1 ml d'une suspension bactérien de 10^8 UFC/ml. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisées dans la gélose Mueller-Hinton (6 puits/boite). 50 μl des extraits de *Spirulina platensis* (Extrait par soxhlet) à diverses concentrations ont été ajoutés dans chaque puits respectifs du milieuensemencé et laissée au repos sur la pailasse pendant 30 minutes pour une bonne diffusion. Les boites sont incubées à 37°C pendant 18 à 24h (Juluru et Perumal,2011).

L'activité antibactérienne de l'extrait de spiruline testé est déterminée par la mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition obtenues au contact et autour des puits. Tout dépend des valeurs des travaux dans la littérature en évaluer l'effet des extraits (action bactéricide ou action bactériostatique)(Al-ghanayem, 2017).

Les mêmes témoins utilisés pour la méthode de diffusion de disque ont été aussi utilisés dans cette méthode des puits

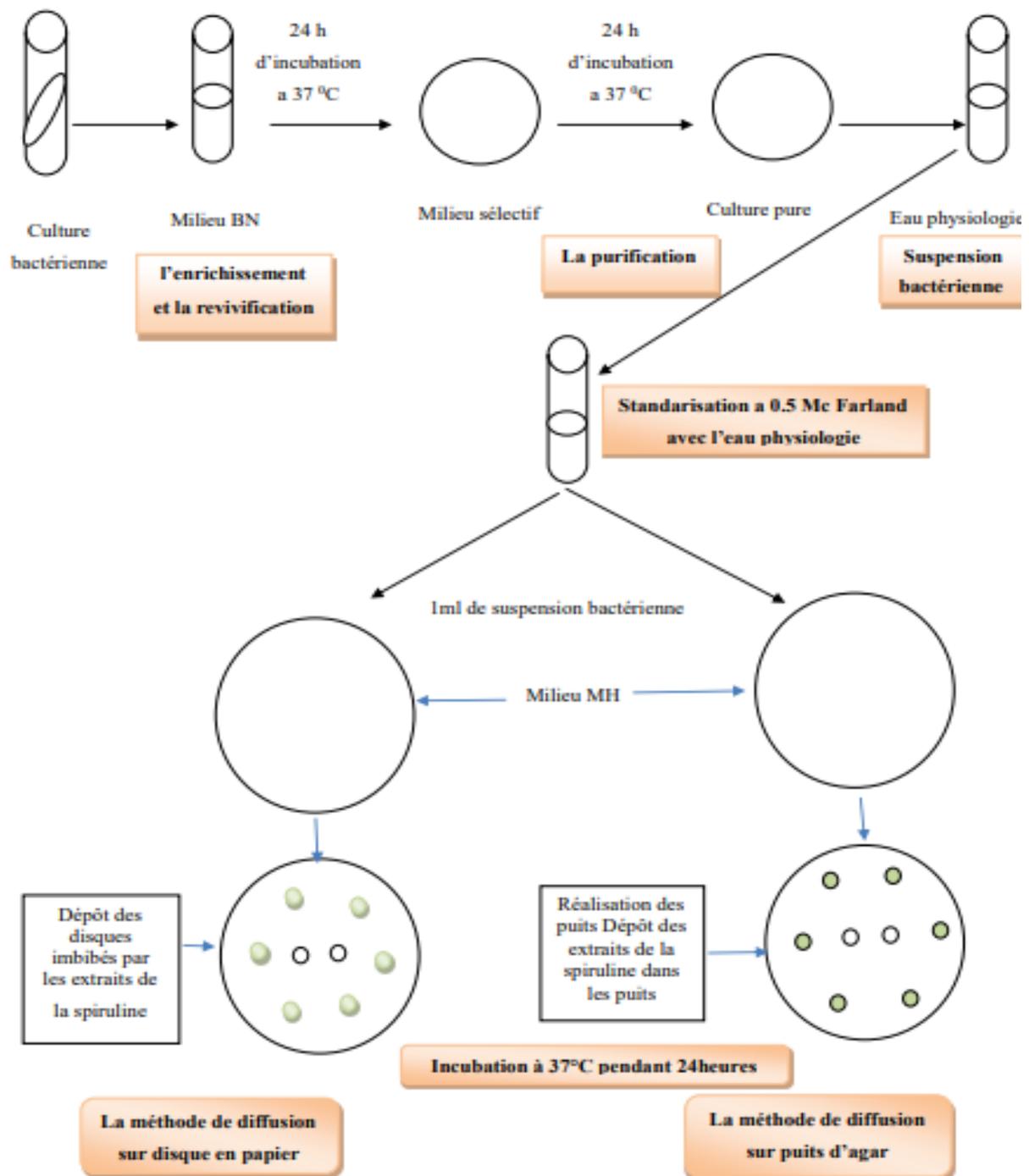


Figure 15: Etapes de la réalisation de l'activité antimicrobienne par méthodes des puits et des disques

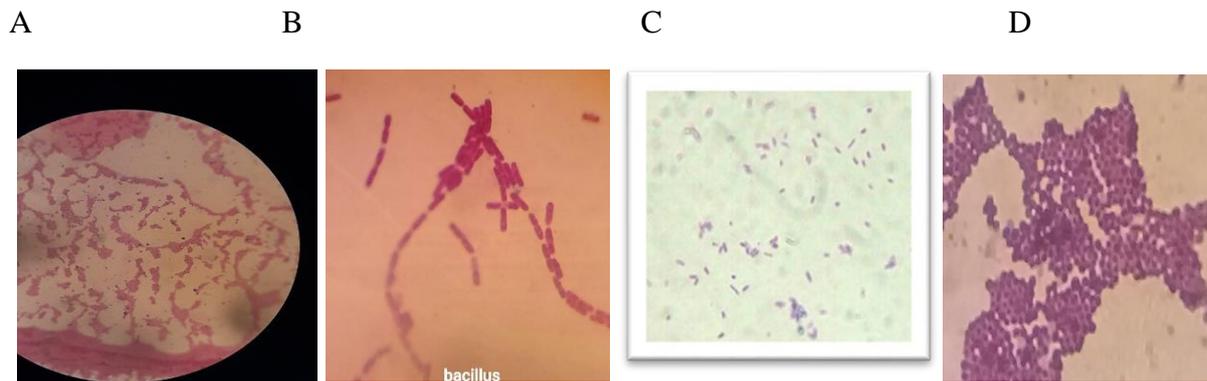
Résultats et discussions

IV. Résultats et discussion

1. Identification phénotypique des souches tests ;

1.1. Etudes microscopiques

Après la coloration de Gram une observation microscopique avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$) a été effectuée. Le Gram des souches a été confirmé (figure 16).



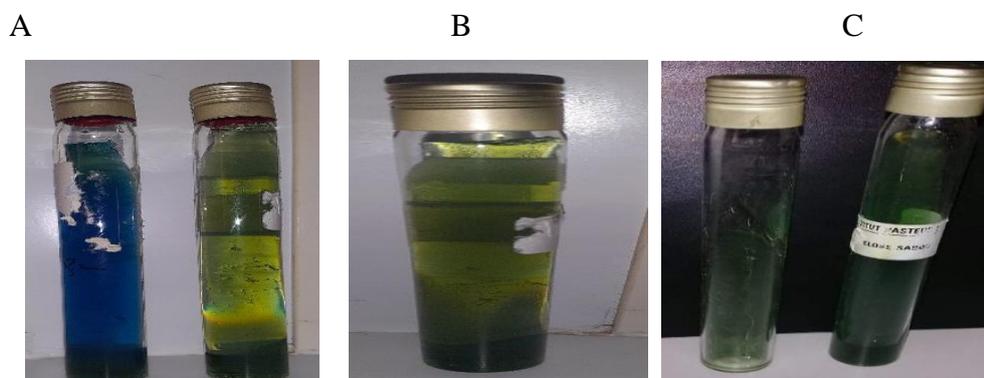
A) *Proteus* sp B) *Bacillus cereus* C) *Escherichia coli* D) *Staphylococcus aureus*

Figure 16: Observation microscopique après coloration des souches tests

1.2. Etudes biochimiques

1.2.1. Test d'utilisation de citrate

Seul *Proteus* sp a pu se développer dans le milieu ce qui signifie qu'il a la capacité d'utiliser le citrate comme source de carbone. Le virage du milieu du vert au bleu indique que la bactérie a alcalinisé le milieu. Donc on peut dire que *Proteus* sp est citrate positive (+) et que les autres souches tests sont citrate négative (-) (**Figure 17**).



A) *Proteus* sp B) *Escherichia coli* C) *Staphylococcus aureus*

Figure 17: Résultats du test d'utilisation de citrate

1.2.2. Test d'oxydase

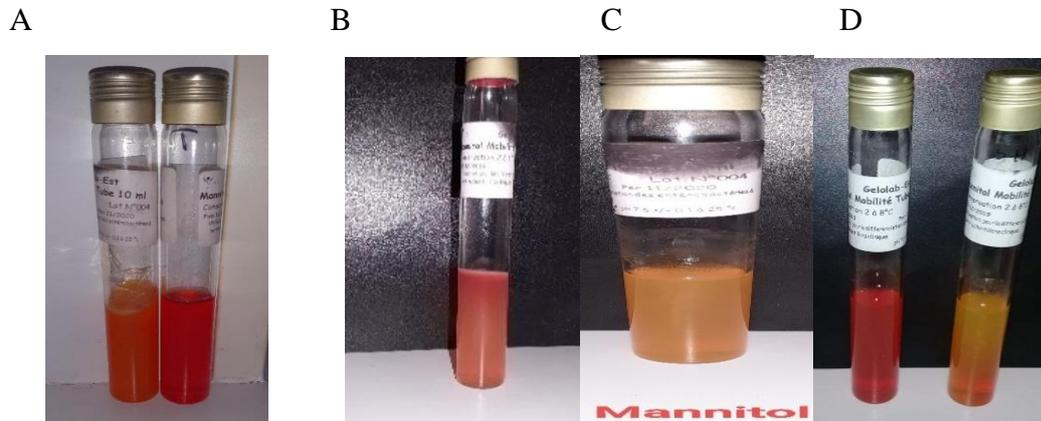
Le test d'oxydase a été réalisé sur une seule souche *Staphylococcus aureus*. D'après les résultats obtenus la souche ne possède pas cet enzyme en raison de l'absence de l'apparition de la coloration violette (**Figure 18**).



Figure 18: Recherche d'oxydase chez *Staphylococcus aureus*

1.2.3. Mannitol-mobilité

Pour les quatre souches tests le milieu a viré vers le jaune orangé ce qui signifie que les souches ont utilisé le mannitol. Le virage de couleur est dû à la fermentation du mannitol ce qui a provoqué une acidification du milieu. La croissance des souches a été observable en halo autour de la pique, elles sont donc des bactéries mobiles tandis que *Staphylococcus aureus* a eu une croissance juste au niveau de la pique elle est donc non-mobile (figure 19).

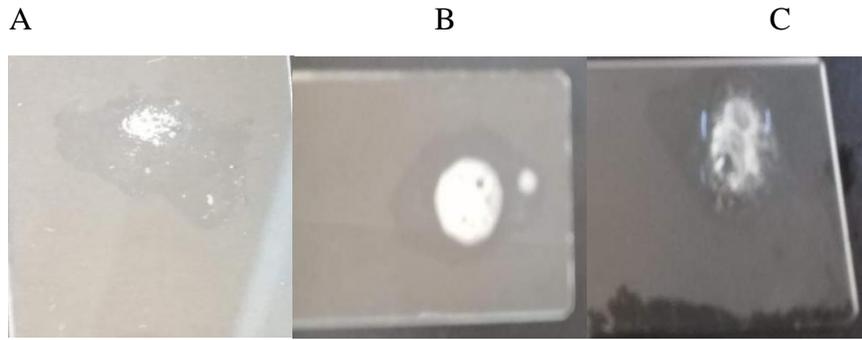


A) *Proteus spB* B) *Bacillus cereus* C) *Escherichia coli* D) *Staphylococcus aureus*

Figure 19: Mannitol-mobilité

1.2.4. Recherche de la catalase

Les trois souches possèdent l'enzyme catalase. Ils ont donc la capacité de neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène (**Figure 20**).

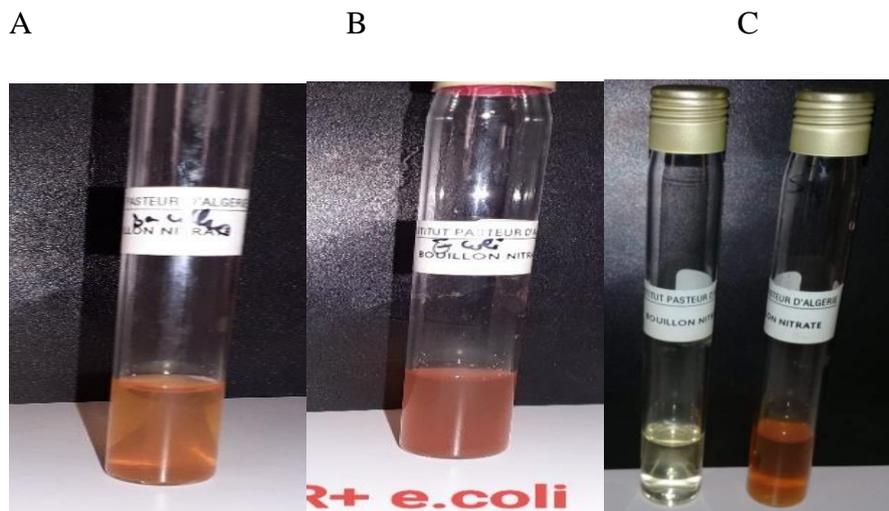


A) *Escherichia coli* B) *Bacillus cereus* C) *Staphylococcus aureus*

Figure 20: Recherche de la catalase :

1.2.5. Recherche de nitrate réductase

Après l'ajout du réactif de Griess (Nitrite I + Nitrite II) le milieu a viré en rouge orangé donc les souches *B. cereus*, *E. coli* et *S. aureus* possèdent l'enzyme nitrate réductase au stade NO_2^- (**Figure 21**).



A) *Bacillus cereus* B) *Escherichia coli* C) *Staphylococcus aureus*

Figure 21: Recherche de la nitrate réductase

1.2.6. Test de fermentation des sucres et de la production de gaz sur milieu TSI

Un virage de couleur vers le jaune est observé tout au long du tube le milieu a viré en jaune donc une fermentation du glucose et du lactose s'est produite ; de l'acide a été produit. Pour *E. coli* et *B. cereus* un gaz a été formé suite à cette fermentation (**Figure 22**).



A) *B. cereus* B) *E. coli* C) *S. aureus*

Figure 22: Résultats du test TSI

1.2.7. Test Urée-indole

1.2.7.1. Production d'indole

Après l'ajout du réactif de Kovacs un anneau rouge a été observé dans la partie supérieur du tube. Cet anneau résulte de la réaction indole avec le réactif de Kovacs on peut donc dire que la réaction est positive et que la bactérie produit l'indole. C'est le cas de la souche test *E. coli*. Pour les souches restantes aucun anneau a été observé donc la réaction est négative (**Figure 23**).

1.2.7.2. Recherche de l'uréase

Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent décomposer l'urée en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique (Meziani,2012).

Pour les toutes les souches tests aucun virage du milieu n'a été observé.

A



B



C

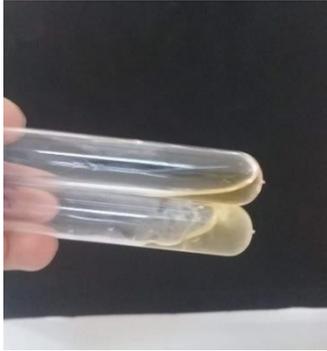


A) *Proteus* sp B) *Bacillus cereus* C) *Escherichia coli*

Figure 23: Urée-indole

1.2.8. Test de Coagulase

Après incubation, un caillot a été formé dans le plasma ce qui signifie que le plasma a coagulé donc *Staphylococcus aureus* possède l'enzyme coagulase (**Figure 24**).



Staphylococcus aureus

Figure 24: Tube à hémolyse positive et le témoin

1.2.9. Le milieu BCPL

E. coli "lactose +" a utilisé le lactose présent dans le milieu comme source d'énergie. En dégradant le lactose, la bactérie a produit de l'acide ce qui a entraîné une acidification du milieu et donc le virage de l'indicateur coloré de pH (le pourpre de bromocrésol), qui en milieu acide est jaune.

Les souches test *B. cereus* et *Proteus* sp qui sont lactose - n'utilisent pas le lactose mais les peptones. En dégradant les peptones les bactéries alcalinisent le milieu qui restera donc violet (**Figure 25**).

A



B



C

A) *Proteus* sp B) *Bacillus cereus* C) *Escherichia coli*

Figure 25: Utilisation du lactose dans BCPL :

1.2.10. Test VP-RM

1.2.10.1. Test RM

Après l'ajout du rouge de méthyle le milieu est devenu rouge pour les deux souches *E.coli* et *S.aureus* donc ils sont RM positif.

1.2.10.2. Test VP

Après l'ajout des réactifs VP-1 et VP-2 on constaté que les deux souches sont VP négatives.



RM Proteus VP Proteus VP E.coli RM E. coli

Figure 26: Resultats du test VP-RM

Tableau 7: Résultats de l'identification phénotypiques des souches tests

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Proteus sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mannitol-mobilité	++	++	++	±
Catalase	+	+	Nt	+
Indole-uréase	±	--	-/Nt	Nt
Nitrate reductase	NR+	NR+	Nt	NR+
VP-RM	±	Nt	±	Nt
Coagulase	Nt	Nt	Nt	+
Citrate	-	Nt	+	-
BCPL	Lactose+	Lactose-	Lactose-	Nt
TSI	TSI+/gaz +	Glucose+/gaz+	Nt	TSI+
Kligler agar	Nt	Nt	H2S+	Nt

+ = positive - = negative Nt = non testé

2. Calcul du rendement d'extraction

On constate que l'extraction par l'éthanol a donné un rendement plus important que l'extraction par l'acétate d'éthyle (tableau 2).

Tableau 8: Rendement d'extraction

	Rendement massique	Pourcentage
Extraction par l'éthanol	0.02g	2%
Extraction par l'acétate d'éthyle	0.01g	1%

3. L'activité antibactérienne et antifongique

L'activité antibactérienne a été étudiée sur quatre souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus sp* et sur une levure *Candida albicans*.

Les résultats obtenus sont en fonction de la concentration des extraits de la Spiruline et la méthode d'extraction.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont indiqués dans les figures 27 et 28 et dans le tableau 9. Ces résultats montrent l'activité antimicrobienne et antifongique de *Spirulina platensis* extraite avec différents solvants contre différentes espèces de bactéries. Il ressort clairement de cette étude que le diamètre de la zone d'inhibition dépend principalement du type de solvant utilisé et des bactéries testées.

Les deux extraits ont un effet positif contre les bactéries Gram positives et Gram négatives.

Les concentrations 50mg/ml et 75mg/ml n'ont montré aucune activité inhibitrice envers *Staphylococcus aureus* et *Proteus sp*. Ce dernier n'a été inhibé que par deux concentrations 1mg/ml et 25mg/ml avec des 10mm de diamètre.

Bacillus cereus a été inhibé juste par les concentrations 25mg/ml et 50mg/ml les autres concentrations n'ont pas donné effet.

Aucune activité n'a été observée pour les concentrations 75mg/ml et 100mg/ml envers *Escherichia coli*. La plus grande zone est 15mm pour la concentration 50mg/ml et la plus petite est de 8mm pour la concentration 10mg/ml

Pour l'extrait éthanolique, lorsque la concentration augmente une activité accrue a été observée. C'est le cas de *Candida albicans* 8mm pour la concentration 1mg/ml et 10mm pour

75mg/ml, pour *Escherichia coli* 11mm pour 1mg/ml et 13mm pour 75mg/ml et pour *Proteus* sp 9mm pour 1mg/ml et 10mm pour la concentration 75mg/ml. Pour *Bacillus cereus* : 9mm pour 1mg/ml et 8mm pour 75mg/ml et *Staphylococcus aureus* : 12mm pour 1mg/ml et 10mm pour 75mg/ml.

Il existe de nombreux rapports sur les extraits de solvant de *Spirulina platensis* qui ont inhibé les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. En raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, la recherche de médicaments antibactériens à partir de cyanobactéries a augmenté dans le monde entier (Al-ghanayem, 2017).

Usharani et al (2015) ont rapporté que l'activité antibactérienne d'extraits de Spiruline envers des bactéries Gram négatives *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et des bactéries Gram positives *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Dans le cas de l'extrait d'éthanol, pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'extrait de Spiruline sur *S. aureus* ils ont testé deux concentrations : 2.5mg/ml et 5mg/ml. Les zones d'inhibitions obtenues sont 9mm pour la première et 13mm pour la deuxième. Avec les mêmes concentrations respectivement sur *P. mirabilis* les zones étaient de 12mm et 14mm. Sur *E. coli* et *B. cereus* c'étaient respectivement 14mm pour 2.5mg/ml, 16mm pour 5mg/ml et 12mm pour 2.5mg/ml et 15mm pour 5mg/ml. Pour une concentration de 10mg/ml la zone d'inhibition de *C. albicans* a été de 12mm.

Cependant la concentration minimale inhibitrice des trois souches a été 5mg/ml en notant que la concentration de 10mg/ml était nécessaire et suffisante pour une inhibition complète d'*Escherichia coli*.

En revanche pour *Candida albicans* la concentration minimale d'inhibition était de 8mg/ml pour l'extrait d'éthanol.

Ce que l'on peut dire à partir des résultats obtenus, c'est que cette cyanobactérie a provoqué une inhibition des bactéries cibles, mais cette inhibition dans la majorité des cas n'était pas directement proportionnelle à l'augmentation de la concentration, ce qui nécessite de réaliser des répétitions pour parvenir à une conclusion.

Il existe de nombreux rapports documentés sur les extraits éthanoliques de *Spirulina platensis* qui inhibe la croissance des bactéries.

Juluru et Perumal (2011) ont rapporté que l'extrait éthanolique de spiruline a donné une bonne activité sur *Candida albicans* (Une zone d'inhibition égale à 8mm) et une faible activité sur *Bacillus subtilis*. (Une zone d'inhibition égale à 4mm).

Ils ont rapporté aussi que l'extrait d'acétate d'éthyle de spiruline a donné une zone d'inhibition de 4 mm contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

Le travail de Juluru et Perumal (2011) indique aussi qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée avec le contrôle négatif DMSO et le contrôle positif gentamycine (10µg) a montré une zone d'inhibition allant de 0.6 mm à 2.1 mm contre les bactéries pathogènes testées

Aucune zone d'inhibition n'a été observée dans le contrôle négatif DMSO et le contrôle positif gentamycine (10µg) a montré une zone d'inhibition allant de 0.6 mm à 2.1 mm contre les bactéries pathogènes testées.

La différence d'activité des extraits contre les bactéries peut être due à des différences des propriétés physiologiques ou biochimiques des souches d'algue ou à différents biotopes ou les conditions de culture telles que la lumière, la température et le milieu (Bougoffa et Hamidi, 2020).

La procédure d'extraction peut également entraîner des différences d'activité antimicrobienne en raison de différences dans la nature du solvant, le moment de l'extraction ou la stabilité des composés antibactériens dans un solvant particulier (Bhuvanawari et al., 2013).

A partir de la comparaison entre l'effet antibactérien des extraits de *Spirulina platensis* et l'effet des antibiotiques contre les bactéries pathogènes il a été constaté que l'extrait éthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle de spiruline peuvent être une alternative naturelle aux antibiotiques utilisés.

Enfin, il est conclu de cette étude que les extraits de certaines souches cyanobactériennes ont montré une activité antimicrobienne contre les agents pathogènes utilisés dans la présente enquête. Des recherches supplémentaires devraient être menées pour identifier et purifier les produits naturels de ces cyanobactéries contre l'activité antibactérienne et antifongique. Amélioration des connaissances sur la composition, l'analyse et les propriétés de ces cyanobactéries en ce qui concerne les composés antimicrobiens contribuerait aux efforts en vue de l'application pharmaceutique (Frag et al., 2014).

a)

b)

c)



d)



e)

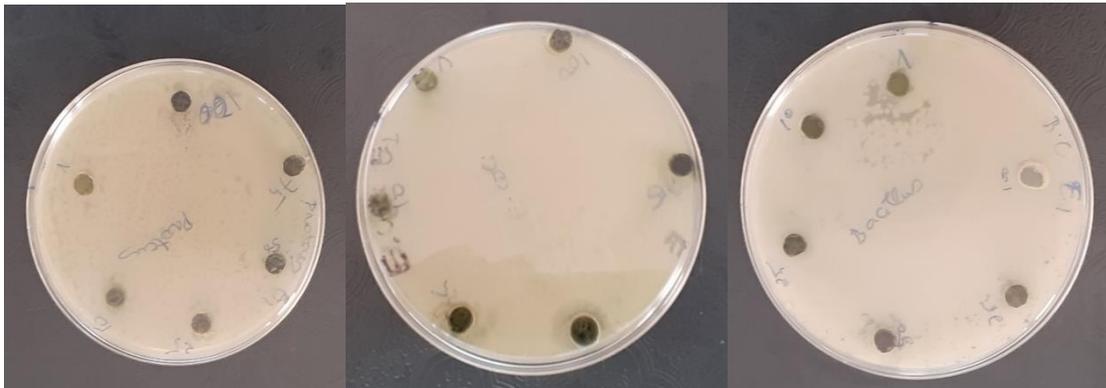


a) *C. albicans* b) *S. aureus* c) *B. cereus* d) *E. coli* e) *Proteus* sp

Figure 27: Résultats de la méthode par disques

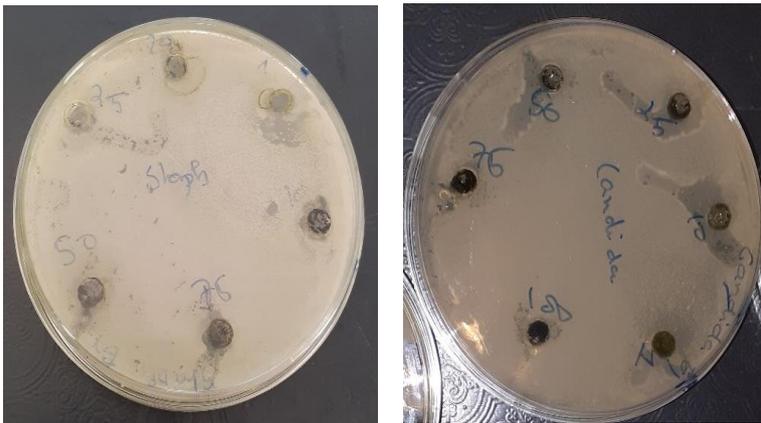
a) b)

c)



d)

e)



a) *Proteus* sp b) *B. cereus* c) *E. coli* d) *S. aureus* e) *C. albicans*

Figure 28: Résultats de la méthode par puits

Tableau 9: Zone d'inhibition en fonction des méthodes et concentration utilisées

	Methodes des puits							Methodes des disques	
		1mg/m l	10mg/m l	25mg/ ml	50mg/m l	75mg/ ml	100mg/ ml	1mg/ml	75mg/ ml
Zone d'inhibition en mm	Candida albicans	15	8	12	10	10	8	8	10
	Staphylococcus aureus	17	12	14	-	-	8	12	10
	Bacillus cereus	-	-	10	8	-	-	9	8
	Escherichia coli	10	8	10	15	-	-	11	13
	Proteus sp	10	-	10	-	-	-	9	10

Conclusion

Conclusion

Durant cette dernière décennie, un intérêt particulier est porté aux substances extracellulaires des cyanobactéries. En effet, les métabolites extracellulaires des cyanobactéries sont dans la plupart des cas des substances actives dont les activités biologiques sont diverses et multiples : antifongique, antibactérienne etc., d'où ils peuvent constituer une source potentielle d'actifs biologiques pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique. Ce travail s'inscrit dans cette direction de recherche, la cyanobactérie *Spirulina platensis* a été utilisée comme modèle de recherche.

La partie expérimentale de cette étude a été consacré à la mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de *Spirulina platensis* sur cinq souches : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus sp* et *candida albicans*.

Les résultats obtenus ont montré que le rendement d'extraction dépend de la méthode, des conditions et des solvants de l'extraction. L'activité antimicrobienne peut être absente, présente ou cibler des espèces bactériennes différentes. Cette variation d'activité dépend des extraits, des conditions d'extraction et des souches elles-mêmes.

Ce travail a permis d'émettre une conclusion réelle concernant les extraits de *Spirulina platensis* qui peuvent être une source de composés naturels alternatifs aux antibiotiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahounou M. N. (2018). La spiruline : Un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation. Thèse pour l'obtention d'un Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Rouen, UFR de Médecine et de Pharmacie :p 12-13,27,31,43
- Al-ghanayem, A. A. (2017). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* extracts against certain pathogenic bacteria and fungi. *Advances in BioResearch* ;8(6) : p96-101
- Barry M., Ouedraogo M., Sourabie S.et Guissou I.P. (2014). Intérêt thérapeutique de la spiruline chez l'homme : revue générale. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* ;8(6) : p2741-2742.
- B. Branger, J.L. Cadudal, M. Delobel c, H. Ouoba, P. Yameogo, D. Ouedraogo, D. Guerin, A. Valea, les personnels des CREN, C. Zombre, P. Ancel. (2003). La spiruline comme complément alimentaire dans la malnutrition du nourrisson au Burkina-Faso. *Archives de pédiatrie* ; 10 : p 424–431.
- Bernard C. (2014). Les cyanobactéries et leurs toxines. *Revue francophone des laboratoires* : p54-55-56-57.
- Bhuvanewari, G. R., et al. (2013). Antibacterial Activity of *Spirulina* (*Arthospira platensis* Geitler) against Bacterial Pathogens in Aquaculture. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* ; 65 : p1-8.
- Bougoffa S., Hamidi A. (2020). Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait de la spiruline (*Spirulina platensis*) sur différentes souches pathogènes dans la région de Ouargla. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de MASTER ACADÉMIQUE. UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA : p33-41
- Boussoufa N. (2018). Effet des extraits de *Moringa oleifera* sur les isolats des staphylocoques à coagulase négative. Mémoire de fin d'études. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem : p34.
- C. Girardin-Andréani (2005). Spiruline : système sanguin, système immunitaire et cancer. *Phytothérapie* ; 4 : p158-161.
- Chardonnet P. (2007). Les Cyanobactéries Et Leurs Toxines. Risques pour la Santé Et L'environnement. Aspects Analytiques. Thèse pour l'obtention d'un Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Limoges : p17.

Charpy L., Langlande M. J., Alliod R. (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique. Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Institut de recherche pour le développement, Marseille : p 6-11.

Christophe H., Denis V. (2011). La spiruline dans la lutte contre la malnutrition. Bilan et perspective : p4

El-Monem, A. M. A., Gharieb, M. M., Hussian, A. E. M., & Doman, K. M. (2018). Effect of pH on phytochemical and antibacterial activities of *Spirulina platensis*. International Journal of Applied Environmental Sciences ; 13(4) : p35-339.

Elyah A. (2003). QUEL AVENIR POUR LA SPIRULINE ? Mémoire Bibliographique, Institut National des Sciences et Techniques de la Mer : p17-18.

Enora B. (2008). Contribution à la compréhension du déterminisme de la mise en place des proliférations de cyanobactéries et de leur production de toxines. THESE DE DOCTORAT DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE.p24

Farag A. Shaieb, Ahmed A. Issa, Ahmad Meragaa (2014). Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*. Archives of Biomedical Sciences ; 2 (2) : p34-41.

Ferhat W., Lakehal S. (2009). Culture et production de la spiruline *Arthrospira platensis* dans la région d'El 'Oued. MEMOIRE DE FIN D'ETUDE. Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued : p1-5.

Goulambasse, T. R. (2018). La Spiruline : Activités Thérapeutiques et son Intérêt dans la Lutte contre la Malnutrition à Madagascar, Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie, université de Lille : p 9-16, 17, 25, 26. 46, 108, 109, 111, 112.

G. Usharani, G. Srinivasan, S. Sivasakthi et P. Saranraj (2015). Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis* Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi. Advances in Biological Research ; 9 (5) : p292-298.

Joris V. (2015). Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Alimentation et Nutrition. UNIVERSITE MONTPELLIER : p 60-78.

J. Sivakumar and P. Santhanam(2011).Antipathogenic activity of *Spirulina* powder. Recent Research in Science and Technology ; 3(4) : p158-161

Lecointre, R. (2017). Optimisation de la production de spiruline dans une ferme à Madagascar afin de lutter contre la malnutrition infantile, MEMOIRE INGENIEUR agroalimentaire de l'école nationale vétérinaire, agroalimentaire, et l'alimentation, Oniris, nante atlantiques : p4

- Mala, R., Sarojini, M., Saravanababu, S., & Umadevi, G. (2009). Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. *Journal of Cell and Tissue Research* ; 9(3) : p1951-1955
- Manet A. (2016) La Spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine. Thèse d'exercice. Université Grenoble Alpes :p9,9,12,19,20,22,35
- Meziani M. (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Mémoire Présenté pour l'Obtention du Diplôme de Magistère. Université Mentouri Constantine : p8,16
- Muhling M, Harris N, Belay A, Whitton BA (2003). Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. *Journal of Phycology* ; 39 : p360-367
- Nicoletti M. (2016). Microalgae Nutraceuticals. *Foods Basel Switz* ; 5 : p2-13
- Raphaëlle Birot, Diane de Jouvencel, Laetitia Raginel et Geneviève Rouillé (2012). From malnutrition to HIV : *Spirulina* is an effective solution which continues to reveal its secrets. *Field Actions Science* : p1-5
- Ruma A.S., Rajeev R., Sudhakar K. (2017). *Spirulina* From growth to nutritional product : A review. *Trends in Food Science & Technology* ;69 :p157-171
- Sguera S. (2008).*Spirulina platensis* et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. Thèse pour l'obtention d'un Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1 : p12-13,21-22-24-25,34,87,88-89,102,125,138-139
- Trabelsi L. (2009).Identification et caractérisation des polymères extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* Compère (1968). Thèse pour l'obtention d'un Diplôme du grade de Docteur d'Université en Sciences Biologiques et Biotechnologies. Institut supérieur de Biotechnologie de MONASTIR : p9-10
- Vonshak A.(1997). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) : physiology, cell-biology, and biotechnology. *Journal of Applied Phycology* ; 9 : p295–296

