

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance

Je dédie cette thèse ...

A MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis ma naissance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A MON CHER MARI KAMEL

Mon conseiller, et mon ami fidèle, qui m'a assistée dans les moments difficiles et m'a tenue par la main pour traverser ensemble ces épreuves.... Je te suis très reconnaissante. Je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ton aide précieuse et surtout pour ta patience et ta compréhension. C'est grâce à ton aide et à ton soutien que ce travail a pu voir le jour.

A MES CHERS ENFANTS RAYAN et RAZAN

Rien ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, pas même cette dédicace. Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous protéger, éclairer votre chemin et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers. Que ce modeste travail puisse vous servir d'exemple.

A MES CHERS ET ADORABLE FRERES ET SŒUR S

Radia, la douce, mon autre moi-même, un cadeau de Dieu, Abderaaouf le généreux au cœur immense, Mohammed, l'aimable, le discret mais si proche à mon cœur, Yasmine ma petite sœur, la prunelle de mes yeux, qui pourrait être ma fille et que j'aime profondément. En témoignage de ma profonde affection et de toute ma tendresse, à vous tous, que du bonheur et de succès. Que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde ainsi que vos enfants.

A MA BELLE FAMILLE

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus

A MES CHERS ONCLES, TANTES, LEURS EPOUX ET EPOUSES A MES CHERS COUSINS COUSINES *Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

A LA MEMOIRE DE MON PETIT FRERE SALAH EDDINE

A LA MEMOIRE DE MES GRAND-PARENTS

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je remercie Allah, le tout puissant pour m'avoir accordé santé et force, et qui malgré tout ce que j'ai enduré, m'a permis d'arriver au bout de ce long voyage au cours duquel je me suis enrichie, tant sur le plan humain que sur le plan scientifique.

Mes remerciements vont en premier lieu à mon directeur de thèse, M. Malek Amiali, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrech, pour m'avoir dirigée, conseillée, et encouragée, pour sa bonne volonté, les précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail. Je ne saurais lui exprimer ma reconnaissance et mon respect, pour son soutien dans les bons moments, comme dans les périodes de découragement. J'ai énormément apprécié ses compétences professionnelles en plus de ses qualités humaines.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à mon co-directeur de thèse M. Arezki Bitam, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrech, pour son estimable participation à la réalisation de ce travail, sa disponibilité et sa gentillesse.

J'exprime ma gratitude à M. Ahmed Benchabane, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrech, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury ainsi que pour sa bonté et ses conseils avisés qu'il m'a prodigués pendant toutes ces années académiques. Soyez assuré Monsieur de toute mon estime et de mon profond respect.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux examinateurs pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance et pour avoir corrigé l'intégralité de ce manuscrit :

M. Ait Amar H. Professeur à la Faculté de Génie des Procédés de l'USTHB

M. Hachemi M. Professeur à la Faculté des Sciences de l'Ingénieur de l'UMBB

M^{me}. Tennah S. Maître de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire ENSV

Mes remerciements vont aussi à :

M. Hiri A. pour m'avoir donné la souche HTam sur laquelle j'ai réalisé mes travaux de recherche et pour ses précieux conseils lors du démarrage de la culture.

M. Benayed, responsable du Laboratoire Central de la Police Scientifique (LCPS) ainsi que toute son équipe pour leur gentillesse et pour leur contribution à la réalisation de quelques analyses au sein de leur laboratoire.

M. Hazzit M. Maître de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique pour son aide et ses conseils si précieux.

M^{me}. Ferhat Z. Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique pour son encouragement et sa gentillesse.

M^{me}. Henk D. Maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique pour son orientation et son aide si efficaces.

M. Belhasnet R. Maître de conférences à l'ENSSMAL pour m'avoir aidée à la mise en culture de la spiruline.

Je tiens également à remercier toutes mes amies et mes collègues de l'USTHB qui m'ont soutenu et ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier Naima Khatib, Habiba Zouaoui, Amina Cherchali , Soraya Akrèche et Nora Kabèche.

Toi Nora, ma collègue et amie, je te remercie en particulier et davantage pour m'avoir aidée dans la correction de mon manuscrit, tu es si essentielle que je me demande comment va-t-on continuer notre parcours pédagogique sans toi?

Pour leurs différentes implications dans ce travail, j'aimerais remercier tout les ingénieurs, techniciens de L'ENSA : Med Tayeb, Med Benalia, Radouane, Med Belahmer, Kamel Ahsene, Fatma Zohra et Khadidja.

Je n'oublierai surtout pas de remercier encore une fois mon amie et grande sœur Naima Khatib. Ton soutien indéfectible et ton encouragement m'ont été indispensables au cours de ces années. Tous les excellents moments que nous avons passés ensemble, seront des souvenirs inoubliables pour moi, et qui dureront je l'espère encore très longtemps.

Enfin, Que toutes les personnes non citées, que j'ai pu côtoyer et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce manuscrit, veuillent m'excuser mais qu'elles sachent que j'ai apprécié leur soutien.

Que dieu vous bénisse tous.

ABSTRACT

Arthrospira platensis (*Spirulina*) is a widely known blue green microalga in nutritional and therapeutic applications, due to its richness in nutrients and bioactive elements (ω -6, phycocyanins (CPC), polyphénols) with has antioxidant functional properties. Comparative studies on biochemical and phytochemical composition of different strains native from Algeria, Chad and the USA, showed that the HSP strains of the United States and HTam of Algeria cultivated in controlled environments has a great potential to be used in nutraceuticals because there richness in nutrients and bioactive compounds, mainly CPC. However, much effort has been devoted to study and developed new methods of extracting phycocyanin from spirulina by minimizing the impact on the nutritional content and quality of extracted compounds. Among innovative methods of cell disruption, pulsed electric field (PEF) treatment is widely used for disintegration of cells and extraction of intracellular components, while minimizing the changes of their physical and chemical properties. Compared to conventional treatment for phycocyanins extraction (Ultrasound and freezing / thawing) from fresh spirulina, PEF is more efficient, since it allows a concentration of 0.178 g / l, with an efficiency of 96% by applying a reduced processing time (300 μ s) and a low energy density of 0.052 kJ / ml. The optimization study PEF phycocyanin extraction from this microalga, show that the PEF parameters namely, intensity, time and temperature of treatment, also their interactions have a significant effect on the yield extraction and the CPC purity. The optimum extraction obtained is 0.16 g / l with a desirability of 91% and a purity of 0.83. These results are obtained for specific conditions of PEF (45 kV / cm), temperature (20 ° C) and processing time (75 μ s). The CPC extracted has a very high antioxidant activity (87% at a concentration of 200 μ g / ml).

RÉSUMÉ

L'algue bleue vert *Arthrospira platensis* communément appelée spiruline est cultivée et commercialisée dans le monde sous différentes souches et formes. Largement connue dans le domaine nutritionnel et thérapeutique en raison de sa richesse en éléments nutritifs principalement les protéines ainsi qu'une large gamme de composés bioactifs à propriétés fonctionnelles antioxydantes (ω -6, les phycocyanines CPC et polyphénols). L'analyse comparée de la composition biochimique de différentes souches provenant de trois pays (Algérie, Tchad et Etats-Unis d'Amérique) a montré que les souches HSP des États-Unis et HTam de l'Algérie cultivées en milieu contrôlé en plus de potentiel à être utiliser dans le nutraceutiques, car elles sont très riche en composés bioactifs (CPC). Cependant, Beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'étude et au développement de nouvelles méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline en réduisant au maximum l'impact sur le contenu nutritionnel et la qualité des composés extraits. Parmi les méthodes innovatrices de rupture cellulaire, le traitement par champ électrique pulsé (CEP) est largement utilisé pour la désintégration des cellules et l'extraction des composants intracellulaires, tout en réduisant au minimum la perte de leurs propriétés physico-chimiques. Comparé aux traitements conventionnels d'extraction des phycocyanines, (Ultrasons et congélation / décongélation) à partir de la spiruline fraîche, le CEP est plus efficace, puisque il permet d'avoir une concentration de 0,178 g/l, avec une efficacité de 96 % en appliquant un temps de traitement réduit (300 μ s) et une densité d'énergie faible 0,052 kJ/ml. L'étude de la modélisation et de l'optimisation de l'extraction de la phycocyanine par CEP à partir de cette microalgue à montrer que les paramètres intensité de CEP, temps et température de traitement ainsi que leur interactions ont un effet significatif sur le rendement d'extraction des phycocyanines et la pureté de la CPC. L'optimum d'extraction obtenu est de 0,16 g/l avec une désirabilité de 91 % et une pureté de 0,83. Ces résultats sont obtenus pour des conditions particulières d'intensité de CEP (45 kV/cm), de température (20 °C) et de temps de traitement (75 μ s). la CPC extraite à une activité antioxydante très élevée (87% pour une concentration de 200 μ g/ml).

ملخص

الطحالب المجهرية *Arthrospira* المعروفة باسم سبيرولينا. معروفة على نطاق واسع في مجال التطبيقات العلاجية و الغذائية بسبب غناها بالعناصر الغذائية خاصة البروتينات و العناصر النشطة بيولوجيا ذات الخصائص الوظيفية المؤكدة. أظهر تحليل البيوكيمياء لسلاسل مختلفة من ثلاثة بلدان (الجزائر، تشاد والولايات المتحدة الأمريكية) أن سلالة HSP الولايات المتحدة وسلاسل HTam الجزائر غنية جداً في بيواكتيفيس (خاصة phycocyanine, CPC). لقد أنفق الكثير من الجهد في دراسة وتطوير أساليب جديدة لاستخراج phycocyanine من سبيرولينا. من بين أساليب مبتكرة لتمزق الخلية، العلاج بالمجال الكهربائي النبضي (CEP) يستخدم على نطاق واسع لتفتك الخلايا واستخراج المكونات داخل الخلايا، وتقليل من الخسائر في خصائصها الفيزيائية مقارنة بالعلاجات التقليدية (الموجات فوق الصوتية وتجميد/ذوبان الجليد) لاستخراج CPC من سبيرولينا الطازجة. ونظراً لأنه يساعد على استخراجه بتركيز 0.178 غرام/لتر، مع كفاءة 96% بتطبيق وقت قصير جداً (300 المايكروثانية) وطاقة ضعيفة تقدر ب 0.052 كيلوجول/مل. إعدادات (الوقت، شدة التيار ودرجة الحرارة) لها أثراً كبيراً على الأداء لاستخراج فيكوسيانينس. النتائج المثلى المتحصل عليها هي نسبة 0.16 g/l من CPC مع استصواب 91% ودرجة نقاء 0.83. يتم الحصول على هذه النتائج في ظروف الشدة (45 كيلوفولت/سم)، درجة الحرارة (20 درجة مئوية) ووقت العلاج (المايكروثانية 75). للمنتجات المستخرجة نشاطات مضادة للأكسدة عالية جداً (87% بتركيز 200 ميكروغرام/مل).

Avant propos

Cette thèse a été réalisée au sein du Département de Technologie Alimentaire de l'École Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach (ENSA), dans le cadre de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques, option Sciences Alimentaires.

La présente thèse a adopté un format qui permet un rangement efficace. Cette forme de présentation est plus en adéquation avec les exigences de la compétition internationale. Cette étude est divisée en cinq chapitres. Le chapitre I comporte une analyse bibliographique. Les chapitres II, III et IV comportent la partie expérimentale présentée sous formes d'articles scientifiques. Enfin le chapitre V comporte une conclusion générale. Les chapitres de la partie expérimentale sont liés entre eux et constituent des parties indispensables pour la préparation de la thèse. Ils rentrent dans le cadre du thème « Extraction des composés bioactifs de la spiruline par champ électrique pulsé ».

Tous les chapitres sont intégrés dans une unité cohésive avec une progression logique d'un chapitre à l'autre. Dans le but de s'assurer qu'il y'a une continuité, des textes de connexion ont été élaborés afin de fournir des ponts logiques entre les différents chapitres.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail de cette thèse, en plus d'une introduction générale, il s'ensuit les chapitres suivants :

Le Chapitre I : comporte une analyse bibliographique portant sur :

- La spiruline, sa technique de culture, ses compositions biochimique, phytochimique et les propriétés thérapeutiques des phycobiliprotéines ;
- Les différentes méthodes d'extraction conventionnelles et innovantes et leurs applications sur les microalgues ;
- Le champ électrique pulsé, son principe, ses composantes, les paramètres influençant son efficacité et les différentes applications ;

Le Chapitre II : développe la caractérisation phytochimique et physicochimique de différentes souches d'*Arthrospira platensis* originaires d'Algérie, du Tchad et des Etas Unis d'Amérique. Il portera sur une étude comparative de la composition entre différentes souches

Avant propos

de spiruline en poudre originaire des trois pays et d'autres souches fraîches cultivées au laboratoire. Cette partie a pour but de maîtriser la culture de la spiruline dans de bonnes conditions afin d'obtenir une biomasse de bonne qualité nutritionnelle et de sélectionner la souche qui présente le plus de potentiel pour être utilisée dans des travaux ultérieurs. De même, il s'agira de mettre en valeur la souche HTam cultivée dans le sud Algérien ;

Le Chapitre III: traite l'effet des technologies du champ électrique pulsé, des ultrasons et de la congélation/décongélation sur l'extraction des phycobiliprotéines à partir de la spiruline. Sera présentée également, l'efficacité de chaque traitement vis-à-vis du rendement d'extraction et du coût de consommation d'énergie ;

Le Chapitre VI: aborde l'optimisation et l'étude de l'effet de l'intensité du champ électrique, de la température et du temps de traitement sur le rendement d'extraction des phycobiliprotéines à partir de la spiruline. Une contribution à la purification de la phycocyanine et à la détermination de son activité antioxydante ont été également réalisées ;

Le Chapitre V : se termine par une conclusion générale. Après une synthèse des principaux résultats obtenus lors des études correspondant à chaque chapitre, des perspectives ont été exposées.

Notre force est l'innovation, notre engagement c'est d'améliorer la qualité de la vie.

Our strength is innovation; our commitment is to improving the quality of life.

Parties publiées de la thèse

Aouir A., Amiali M., Bitam A., Benchabane A. et Raghavan V. G., (2017). Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA. Food Measure June 2017, Volume 11, Issue 2, pp 913–923. © Springer Science+Business Media New York.

Aouir A., Amiali M., Kirilova-Gachovska T., Benchabane A., Bitam A., (2015). The Effect of Pulsed Electric Field (PEF) and Ultrasound (US) Technologies on the Extraction of Phycopiliproteins from *Arthrospira Platensis*. IEEE Canada international Humanitarian Technology Conference (IHTC). 2015: 1- 4 p.

Parties de la thèse présentées à des conférences scientifiques

Aouir A., Amiali M., Kirilova-Gachovska T., Benchabane A., Bitam A. Etude comparative de la composition biochimique et phytochimique de quelques souches d'*Arthrospira platensis* originaires d'Algérie, du Tchad et des Etats-Unis d'Amérique. Premier séminaire national sur la Biodiversité, l'Environnement et la Sécurité Alimentaire (Biosec, 20-21 Octobre 2015). Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Université M'hamed Bougara Bumerdes.

Aouir A., Amiali M., Kirilova-Gachovska T. Benchabane A. et Bitam A. Technologies on the Extraction of Phycopiliproteins from *Arthrospira Platensis*. 2015 IEEE, Canada International Humanitarian Technology Conference (IHTC) Ottawa, Canada May 31 to June 4, 2015.

Aouir A., Amiali M. et Akretch S. Utilisation d'un plan d'expérience pour l'optimisation de l'extraction de la phycocyanine brute par le champ électrique pulsé chez *Arthrospira platensis* (spiruline). 28ème Congrès annuel international de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), Hammamet du 21 au 24 /03/2017.

Liste des Tableaux et des Annexes

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Tableau 1.1 | Les diverses appellations de la spiruline (Girardin, 2005)..... | 7 |
| Tableau 1.2 | Composition en pigment de la spiruline (<i>Arthrospira</i>) (Belay, 1997)..... | 16 |
| Tableau 1.3 | Propriétés pharmacologiques et biologiques des phycocyanines..... | 26 |
| Tableau 1.4 | Avantages et inconvénients de méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines (Manirafasha <i>et al.</i> , 2016)..... | 30 |
| Tableau 1.5 | Les types de fréquences (Luque et De Castro 2003)..... | 33 |
| Tableau 1.6 | Appareils de CEP pour le traitement d'aliments, recensement réalisé par (Barsotti <i>et al.</i> , 1998)..... | 64 |
| Tableau 1.7 | Avantages et limites de l'extraction des lipides des micro-algues par CEP (Joannes <i>et al.</i> , 2015)..... | 69 |
| Tableau 2.1 | Caractéristiques des souches étudiées..... | 74 |
| Tableau 2.2 | Composition physico-chimique des différentes souches étudiées..... | 85 |
| Tableau 2.3 | Profil en acides gras des cinq spirulines étudiées exprimées en % de lipides totaux..... | 88 |
| Tableau 2.4 | AGS, AGMI, AGPI, $\omega 3$, $\omega 6$ (en pour cent des lipides totaux)..... | 92 |
| Tableau 2.5 | Teneur en éléments minéraux et en métaux lourds en mg/kg de MS..... | 93 |
| Tableau 2.6 | Dénombrement de la microflore des spirulines étudiées..... | 95 |
| Tableau 2.7 | Teneur en phycobiliprotéines (CPC, APC and PE) en (%), phycocyanine brute en (%) et pureté..... | 99 |
| Tableau 3.1 | Les paramètres physico-chimiques de la culture de la spiruline..... | 108 |
| Tableau 3.2 | Paramètres du traitement par CEP en continu..... | 112 |
| Tableau 3.3 | La pureté de la phycocyanine extraite par différentes méthodes de désintégration cellulaire..... | 123 |
| Tableau 4.1 | Limites de variation des facteurs et réponses..... | 133 |
| Tableau 4.2 | Plan d'expérience en unités codées..... | 133 |
| Tableau 4.3 | Les résultats des essais du plan factoriel..... | 137 |
| Tableau 4.4 | Evolution de la fonction de désirabilité en fonction des différents essais.. | 148 |
| Tableau 4.5 | Optimisation de la désirabilité..... | 149 |
| Annexe 1 | Composition des milieux de culture Hiri et Zarrouk | |
| Annexe 2 | Procédure de Van – Soest (1963) | |
| Annexe 3 | Courbe d'étalonnage des glucides A570 nm = f (masse de glucose) | |
| Annexe 4 | Conditions opératoires de l'analyse du profil en AG par CPG | |
| Annexe 5 | Courbe d'étalonnage des phénols totaux | |
| Annexe 6 | Analyse de la variance pour PhP | |
| Annexe 7 | Analyse de la variance pour Pureté | |
| Annexe 8 | Analyse de la variance ANOVA et Coefficients pour déterminer l'influence des différents paramètres sur l'extraction des PhP à partir de Spirulina | |
| Annexe 9 | Analyse de la variance ANOVA et Coefficients pour déterminer l'influence des différents paramètres sur la pureté de la CPC de Spirulina | |
| Annexe 10 | Test de Fisher (Analyse de la variance) | |

Liste des Figures

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| Figure 1.1 | Morphologie typique d' <i>Arthrospira platensis</i> (Falquet <i>et al.</i> , 2006)..... | 8 |
| Figure 1.2 | Les morphologies de dix souches d' <i>A. platensis</i> . Les barres d'échelle, 100 μ m. (Hui-Na Zhou <i>et al.</i> , 2013)..... | 8 |
| Figure 1.3 | Formation d'une nécrie chez <i>Arthrospira maxima</i> . Barre= 10mm. (Sili <i>et al.</i> In Vonshak, 2002)..... | 9 |
| Figure 1.4 | Plan théorique de production annuelle de Spiruline (Anonyme., 2008).... | 10 |
| Figure 1.5 | Spectres d'absorption des différents pigments de cyanobactéries (Annick Wilmotte 2010)..... | 16 |
| Figure 1.6 | Structure de quelques pigments photosynthétiques des algues (d'après Ragan, 1981)..... | 17 |
| Figure 1.7 | Structure des phycobilines (Chromophores) (Ruiz, 2005)..... | 19 |
| Figure 1.8 | Différence entre les phycobilines (Grossman <i>et al.</i> , 1993)..... | 20 |
| Figure 1.9 | Structure des phycobilisomes (Patil and Raghavarao, 2007)..... | 21 |
| Figure 1.10 | Diagramme du processus de production de phycocyanine (Manirafasha <i>et al.</i> , 2016)..... | 28 |
| Figure 1.11 | Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Pétrier <i>et al.</i> , 2008)..... | 34 |
| Figure 1.12 | Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques (Michel, 2011)..... | 37 |
| Figure 1.13 | Diagramme de phase pour le CO ₂ (Nova Sterilis, 2016)..... | 40 |
| Figure 1.14 | Quelques applications des puissances pulsées d'après Kristiansen (1993) | 42 |
| Figure 1.15 | Modèle électrique d'une cellule biologique (Ciobanu, 1987). Avec R1 la résistance de l'espace extracellulaire ; R2 la résistance du cytoplasme ; R3 la résistance de la membrane cellulaire et C la capacité électrique de la membrane cellulaire | 44 |
| Figure 1.16 | Principe de l'effet du champ électrique pulsé..... | 46 |
| Figure 1.17 | Electroporation de la membrane cellulaire basée sur un modèle viscoélastique: (a) augmentation de la fluctuation membranaires, (b) des réarrangements moléculaires conduisant à une discontinuité, et (c) une expansion du pore conduisant à une rupture mécanique de la membrane. (Dimitrov, 1984)..... | 47 |
| Figure 1.18 | Les composants majeurs d'une installation de CEP (Amiali, 2005)..... | 48 |
| Figure 1.19 | Principe du condensateur (Touya, 2005)..... | 49 |
| Figure 1.20 | Chambres de traitement continues (a), (b), (c) et Statique (d). (FDA, 2000)..... | 53 |
| Figure 1.21 | Les formes d'onde d'impulsion couramment utilisées et les circuits électriques génériques: (a) onde exponentielle monopolaire et bipolaire ; (b) onde carrée monopolaire et bipolaire (Maged <i>et al.</i> , 2012)..... | 56 |

Liste des Figures

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figure 2.1 | Aspect et couleur des poudres des différentes souches étudiées..... | 74 |
| Figure 2.2 | (a) : Spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à flamme type Perkin Elmer Analyst 800. (b) : Chromatographie ionique de type Dionex ICS-3000..... | 80 |
| Figure 2.3 | Variabilité morphologique d' <i>A. platensis</i> . A: filament droit (Spiruline 4); B et B': forme ondulée (Spiruline 5). Bar représente 500 μm | 84 |
| Figure 2.4 | Concentration de la biomasse (g/L) des souches 4 et 5 cultivées en milieu Zarrouk..... | 85 |
| Figure 2.5 | Teneur en chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> et caroténoïdes en (mg/g) dans différentes souches de spiruline..... | 97 |
| Figure 2.6 | Teneur en polyphénols de différentes souches de Spiruline..... | 101 |
| Figure 3.1 | Circuit électrique d'une installation d'un traitement par CEP en continu.. | 110 |
| Figure 3.2 | Type de chambre de traitement par CEP. A : chambre statique, B : chambre continu type cofield..... | 111 |
| Figure 3.3 | La densité cellulaire de la spiruline exprimée en 10^5 bactéries /ml..... | 114 |
| Figure 3.4 | Concentration en phycobiliprotéines avant et après le traitement statique par CEP à 2 et 3.5 kV / cm. C-PC: phycocyanine, A-PC: allophycocyanine, PE: Phycoérythrine..... | 116 |
| Figure 3.5 | Comparaison entre la concentration des phycobiliprotéines extraites par congélation/décongélation et par CEP en mode continu (à 46 kV/cm)... | 118 |
| Figure 3.6 | Concentration des phycobiliprotéines extraites après un traitement par ultrasons à 30, 60 et 90 min..... | 121 |
| Figure 3.7 | Densité d'énergie des différents traitements exprimée en kJ/cm^3 | 125 |
| Figure 4.1 | Installation d'un système de champ électrique pulsé congélation/décongélation et par CEP en mode continu (à 46 kV/cm)... | 131 |
| Figure 4.2 | Impulsion de type exponentiel de déclin..... | 132 |
| Figure 4.3 | Graphique de Pareto pour les effets principaux et les interactions sur l'extraction des PhP (a) et la pureté (b)..... | 139 |
| Figure 4.4 | Graphique des effets principaux sur l'extraction des PhP (a) et la pureté de la CPC (b)..... | 142 |
| Figure 4.5 | Graphique des effets des interactions sur l'extraction des PhP (a) et la pureté de la CPC (b)..... | 144 |
| Figure 4.6 | Optimisation multi réponse..... | 147 |
| Figure 4.7 | Pourcentage du piégeage des radicaux libres DPPH en fonction des concentrations en phycocyanine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)..... | 149 |
| Figure 4.8 | Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations du BHT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)..... | 151 |
| Figure 4.9 | FTIR de la phycocyanine de phycocyanine ($\mu\text{g} / \text{ml}$)..... | 152 |

Abréviations et nomenclature

| Symbole | Définition | Unité |
|------------------|--|--|
| A | Surface de l'électrode | (m ²) |
| AGE | Acide gras essentiels | - |
| AGL | Acide γ -linoléinique | - |
| AGMI | Acides gras monoinsaturés | - |
| AGPI | Acide gras polyinsaturé | - |
| AGS | Acides gras saturés | - |
| APC | Allophycocyanine | - |
| BHT | Butyle hydroxyle toluène | - |
| C | Capacitance | Farad (F) |
| Car | Caroténoïde | - |
| CEP | Champ électrique pulsé | - |
| Chl | Chlorophylle | - |
| CPC | Phycocyanine | - |
| d | Distance entre les électrodes | (m) |
| Do | Densité optique | - |
| DPPH | α, α -Diphényl- β -picrylhydrazyle | - |
| E | Intensité du champ électrique | kilovolt par centimètre (kVcm ⁻¹) |
| Er | Intensité du champ électrique de rupture | (kVcm ⁻¹) |
| F | Débit | ml/s |
| f | Fréquence | Hertz (Hz) |
| HTam | Hiri Tamanrasset | - |
| I | Courant | Ampère (A) |
| IC ₅₀ | Concentration d'inhibition | - |
| n | Nombre de pulsation | - |
| P | Puissance | Watt (W) |
| PE | Phycoérythrine | - |

| | | |
|----------|--------------------------------------|--|
| PbP | Phycobiliprotéines | - |
| PTM | Potentiel transmembranaire | - |
| Q | Energie stockée dans le condensateur | Joule |
| Qe | Densité d'énergie | Joule par mètre (J/m ³) |
| R | Résistance | Ohms (Ω) |
| t | Temps de traitement | Seconde (s) |
| T | Température | °C |
| US | Ultrasons | - |
| V | Voltage | kilo- Volt (kV) |
| v | Volume de la chambre de traitement | Mètre cube (m ³) |
| W | Energie | Joule |
| MZ | Milieu Zarrouk | - |
| ρ | Résistivité | Ohms par mètre (Ω -m) |
| σ | Conductivité électrique (CE) | Siemens par mètre (S m ⁻¹) |
| τ | Durée de la pulsation | microseconde (μ sec) |

Table des matières

| | | |
|-------------------|--|------------|
| | Avant propos | i |
| | Parties de la thèse publiées dans des articles scientifiques | iii |
| | Parties de la thèse présentées dans des conférences scientifiques | iii |
| | Liste des tableaux et des Annexes | iv |
| | Liste des figures | v |
| | Abréviations et nomenclature | vii |
| | Introduction générale | 1 |
| Chapitre I | Partie Bibliographique | 4 |
| 1.1 | Généralités sur la spiruline..... | 4 |
| 1.1.1 | Micro-algues et Cyanobactéries..... | 4 |
| 1.1.2 | <i>Arthrospira platensis</i> (La spiruline)..... | 5 |
| 1.1.2.1 | Historique..... | 5 |
| 1.1.2.2 | Classification et Taxonomie confuse..... | 6 |
| 1.1.2.3 | Morphologie des différentes souches <i>d'Arthrospira platensis</i> | 7 |
| 1.1.2.4 | Ecologie et biologie..... | 9 |
| a | Reproduction..... | 9 |
| b | Production de spiruline et influence des conditions de culture..... | 9 |
| c | Répartition géographique et culture..... | 11 |
| 1.2 | Composition nutritionnelle de la spiruline..... | 11 |
| 1.2.1 | Protéines..... | 12 |
| 1.2.2 | Lipides..... | 12 |
| 1.2.3 | Glucides..... | 13 |
| 1.2.4 | Vitamines..... | 13 |
| 1.2.5 | Minéraux..... | 14 |
| 1.2.6 | Pigments..... | 14 |
| 1.3 | Composés bioactifs de la spiruline..... | 18 |
| 1.3.1 | Définition des composés bioactifs..... | 18 |
| 1.3.2 | Phycobiliprotéines..... | 18 |
| 1.3.3 | Phycobilisomes..... | 21 |
| 1.3.4 | Phycocyanine..... | 21 |
| 1.3.5 | Purification et stabilité de la phycocyanine..... | 22 |
| 1.3.5.1 | Purification..... | 22 |
| 1.3.5.2 | Stabilité..... | 24 |
| 1.3.6 | Activités thérapeutiques de la phycocyanine..... | 25 |
| 1.3.7 | Intérêt de l'extraction de la phycocyanine | 26 |
| 1.4 | Extraction des composés bioactifs à partir des microalgues..... | 29 |
| 1.4.1 | Méthodes conventionnelles d'extraction..... | 31 |
| 1.4.1.1 | Méthodes mécaniques | 31 |
| 1.4.1.2 | Méthodes chimiques | 32 |
| 1.4.2 | Méthodes innovatrices d'extraction..... | 32 |
| 1.4.2.1 | Extraction assistée par les ultrasons..... | 33 |
| a | Principe..... | 33 |
| b | Applications sur les microalgues..... | 35 |

Tables des matières

| | | |
|----------------|--|-----------|
| c | Avantages et inconvénients | 35 |
| 1.4.2.2 | Extraction assistée par les hautes pressions | 36 |
| a | Principe..... | 36 |
| b | Application sur les microalgues | 36 |
| c | Avantages et inconvénients..... | 36 |
| 1.4.2.3 | Extraction assistée par micro ondes | 37 |
| a | Principe..... | 37 |
| b | Application sur les microalgues..... | 38 |
| c | Avantages et inconvénients..... | 38 |
| 1.4.2.4 | Extraction par fluide supercritique..... | 38 |
| a | Principe..... | 38 |
| b | Application sur les microalgues..... | 39 |
| c | Avantages et inconvénients | 40 |
| 1.4.2.5 | Extraction par le champ électrique pulsé..... | 41 |
| 1.5 | Champ électrique pulsé (CEP)..... | 41 |
| 1.5.1 | Approche historique..... | 41 |
| 1.5.2 | Mécanisme d'action du CEP | 43 |
| 1.5.2.1 | Rupture diélectrique..... | 43 |
| 1.5.2.2 | Théorie de l'électroporation..... | 46 |
| 1.5.3 | Différents composants du système | 48 |
| 1.5.3.1 | Générateur à haute tension..... | 48 |
| 1.5.3.2 | Condensateurs à haute puissance | 49 |
| a | Transfert d'énergie..... | 49 |
| b | Energie stockée dans les condensateurs..... | 50 |
| c | Densité d'énergie | 51 |
| 1.5.3.3 | Commutateur à fermeture | 51 |
| 1.5.3.4 | Chambre de traitement..... | 52 |
| 1.5.3.5 | Appareils de control..... | 53 |
| 1.5.4 | Paramètres influençant l'efficacité du traitement | 54 |
| 1.5.4.1 | Facteurs technologiques..... | 54 |
| a | Intensité du champ électrique..... | 54 |
| b | Type de pulsation..... | 55 |
| c | Durée et fréquence de traitement..... | 56 |
| d | Température de traitement..... | 57 |
| 1.5.4.2 | Facteurs physicochimiques du milieu..... | 57 |
| a | pH et la force ionique..... | 58 |
| b | Conductivité électrique..... | 58 |
| c | Composition du milieu | 60 |
| 1.5.4.3 | Facteurs biologiques..... | 61 |
| a | Type et taille de la cellule..... | 61 |
| b | Concentration et stade de croissance | 62 |
| 1.5.5 | Consommation énergétique et rentabilité du CEP | 62 |
| 1.6 | Applications du champ électrique sur les microalgues..... | 65 |
| 1.6.1 | Extraction des composés cellulaires | 66 |
| 1.6.1.1 | Extraction des pigments | 66 |
| 1.6.1.2 | Extraction des nutriments..... | 66 |
| 1.6.2 | Contrôle des contaminants dans les cultures des microalgues..... | 67 |
| 1.6.3 | Augmentation de la croissance des algues par champ électrique pulsé ultra court..... | 68 |
| 1.6.4 | Production de biocarburants à partir des microalgues..... | 68 |

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Chapitre II | Comparaison de la composition biochimique de différentes souches d'<i>Arthrospira platensis</i> originaires de l'Algérie, du Tchad, et des Etats Unis d'Amérique | 70 |
| 2.1 | Résumé..... | 70 |
| 2.2 | Introduction | 71 |
| 2.3 | Matériel et méthodes..... | 73 |
| 2.3.1 | Matériel biologique..... | 73 |
| 2.3.2 | Conditions et contrôle de la culture | 75 |
| 2.3.3 | Analyses biochimiques et physicochimiques | 76 |
| 2.3.3.1 | Détermination du taux d'humidité..... | 76 |
| 2.3.3.2 | Détermination de la teneur en fibres | 76 |
| 2.3.3.3 | Détermination du taux de cendres | 76 |
| 2.3.3.4 | Détermination du taux de glucides | 76 |
| 2.3.3.5 | Détermination du taux de protéines..... | 77 |
| 2.3.3.6 | Détermination de la teneur en matière grasse | 77 |
| 2.3.3.7 | Détermination du profil en acides gras..... | 78 |
| 2.3.3.8 | Dosage des éléments minéraux et des métaux lourds..... | 78 |
| 2.3.3.9 | Calcul de la valeur énergétique..... | 80 |
| 2.3.4 | Analyse phytochimique | 80 |
| 2.3.4.1 | Dosage de la chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> et des caroténoïdes..... | 80 |
| 2.3.4.2 | Dosage des pigments solubles dans l'eau (phycobiliprotéines)..... | 81 |
| 2.3.4.3 | Dosage des phénols totaux..... | 81 |
| 2.3.5 | Analyses microbiologiques | 82 |
| 2.3.5.1 | Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) selon la norme NF V08-051 ((Anonyme, 1992)..... | 82 |
| 2.3.5.2 | Dénombrement de la flore fongique (F.F.) | 83 |
| 2.3.5.3 | Dénombrement des coliformes totaux (CT) | 82 |
| 2.3.6 | Analyse statistique..... | 83 |
| 2.4 | Résultats et discussion..... | 83 |
| 2.4.1 | Morphologie des souches étudiées et leurs croissances..... | 83 |
| 2.4.2 | Composition nutritionnelle et microbiologique | 85 |
| 2.4.2.1 | Composition physicochimique..... | 85 |
| 2.4.2.2 | Profil en acides gras des spirulines étudiés | 88 |
| 2.4.2.3 | Composition en éléments minéraux et métaux lourds | 92 |
| 2.4.2.4 | Composition microbiologique | 95 |
| 2.4.3 | Composition phytochimique | 96 |
| 2.4.3.1 | Teneur en chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> et caroténoïdes..... | 96 |
| 2.4.3.2 | Teneur en phycobiliprotéines..... | 98 |
| 2.4.3.3 | Teneur en polyphénols totaux | 100 |
| 2.5 | Conclusion..... | 102 |
| | Texte de Connexion | 103 |

| | | |
|---------------------|---|------------|
| Chapitre III | Traitements comparés entre la congélation/décongélation, les ultrasons, et le champ électrique pulsé sur l'extraction des phycobiliprotéines à partir d'<i>Arthrospira platensi</i>. | 104 |
| 3.1 | Résumé..... | 104 |
| 3.2 | Introduction..... | 105 |
| 3.3 | Matériel et méthodes..... | 107 |
| 3.3.1 | Matériel biologique..... | 107 |
| 3.3.2 | Conditions et contrôle de la culture..... | 107 |
| 3.3.3 | Coloration de Gram | 108 |
| 3.3.4 | Extraction des phycobiliprotéines..... | 109 |
| 3.3.4.1 | Préparation de l'échantillon | 109 |
| 3.3.4.2 | Extraction conventionnelle par congélation décongélation..... | 109 |
| 3.3.4.3 | Traitement statique par CEP | 109 |
| 3.3.4.4 | Traitement en mode continu par CEP..... | 111 |
| 3.3.4.5 | Traitement par les ultrasons..... | 112 |
| 3.3.5 | Dosage des phycobiliprotéines..... | 112 |
| 3.3.6 | Mesure de la densité d'énergie..... | 113 |
| 3.3.7 | Analyse statistique..... | 113 |
| 3.4 | Résultats et discussion | 114 |
| 3.4.1 | Cinétique de la croissance bactérienne | 114 |
| 3.4.2 | Résultat de la coloration de Gram..... | 115 |
| 3.4.3 | Résultats de l'extraction des phycobiliprotéines par les différents traitements | 115 |
| 3.4.3.1 | Traitement par CEP en mode statique..... | 115 |
| 3.4.3.2 | Traitements par congélation/décongélation et par CEP en mode continu..... | 118 |
| 3.4.3.3 | Traitement par les ultrasons..... | 121 |
| 3.4.4 | Pureté de la C-PC après extraction par les différents traitements | 123 |
| 3.4.5 | Densité d'énergie délivrée par les différentes méthodes d'extraction | 124 |
| 3.4.6 | Conclusion..... | 126 |
| | Texte de Connexion..... | 127 |
| | | |
| Chapitre IV | Effet de l'intensité du champ électrique, de la température et du temps de traitement sur l'extraction des phycobiliprotéines de la spiruline | 127 |
| 4.1 | Résumé..... | 128 |
| 4.2 | Introduction..... | 129 |
| 4.3 | Matériel et méthodes..... | 130 |
| 4.3.1 | Préparation de l'échantillon | 130 |
| 4.3.2 | Installation de CEP..... | 131 |
| 4.3.3 | Dosage des phycobiliprotéines et mesure de la pureté..... | 132 |
| 4.3.4 | Modélisation et optimisation de l'extraction des phycobiliprotéines et de la pureté de la CPC..... | 132 |
| 4.3.5 | Mesure de l'activité antioxydante | 135 |
| 4.3.5.1 | Purification partielle de la phycocyanine..... | 135 |
| 4.3.5.2 | Préparation de la solution alcoolique de DPPH: (α , α -diphényle- β -picrylhydrazyle)..... | 135 |
| 4.3.5.3 | Protocole expérimental | 135 |

Tables des matières

| | | |
|-------------------|--|------------|
| 4.3.6 | Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform Infrared FTIR)..... | 136 |
| 4.4 | Résultats et discussion..... | 136 |
| 4.4.1 | Résultats expérimentaux de l'extraction des phycobiliprotéines et de la pureté | 136 |
| 4.4.2 | Analyse statistique..... | 137 |
| 4.4.2.1 | Modélisation et validation du modèle | 137 |
| 4.4.2.2 | Analyse des résultats du modèle..... | 141 |
| a | Effets directs..... | 141 |
| b | Effets des interactions..... | 143 |
| 4.4.3 | Optimisation..... | 147 |
| 4.4.4 | Activité antioxydante de la phycocyanine..... | 149 |
| 4.4.5 | Spectre infrarouge de la phycocyanine..... | 151 |
| 4.5 | Conclusion..... | 153 |
| Chapitre V | Conclusion générale | 154 |
| 5.1 | Conclusions..... | 154 |
| 5.2 | Perspectives..... | 156 |
| | Références bibliographiques | 158 |

Les composés bioactifs ou composantes fonctionnelles sont des composés chimiques naturels contenus dans un végétal, un animal ou une source marine telles que les microalgues. Ils ont un effet bénéfique sur la santé de l'homme, améliorant ainsi son bien-être. De nombreuses données scientifiques obtenues après d'importantes études épidémiologiques ont permis d'établir des liens entre ces composés bioactifs des microalgues et leurs effets protecteurs contre l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, le cancer et d'autres problèmes de santé (Abd El Baky et El-Baroty, 2013 ; Shalaby et Shanab, 2013 ; Chen *et al.*, 2014 ; Gardeva *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, la production mondiale de microalgues a atteint plus de 10 000 tonnes métriques par année. L'espèce « *Arthrospira platensis* », ou « **Spiruline** » fait partie du phylum des Cyanobactéries ou algues « bleu-vert » la plus cultivée (50 % de la production mondiale) (Vo *et al.*, 2015). L'Algérie est l'un des rares pays où la spiruline est cultivée de manière semi-industrielle à Tamanrasset et à Oran. Une autre ferme de culture de la spiruline d'une capacité de production théorique de deux tonnes/an est projetée dans la wilaya de Ghardaïa en 2017.

Cette microalgue de 3,5 milliards d'années est consommée depuis des siècles par certains peuples d'Afrique centrale et d'Amérique latine pour sa richesse nutritionnelle. Depuis plusieurs décennies, la spiruline fait l'objet d'une redécouverte par les scientifiques, tant pour ses propriétés nutritionnelles avérées, principalement les protéines (60 à 70 %), les oméga 6 (25 %) et les vitamines (dont 13 % de B₁₂) ; que pour son intérêt thérapeutique grâce à ses pigments naturels appelés « **Phycobiliprotéines** » (Charlemagne, 2008 ; Kent *et al.*, 2015).

Les phycobiliprotéines sont des composés hydrosolubles constitués de trois types de molécules, **la C- phycocyanine (C-PC)**, **l'allophycocyanine (APC)** et **la phycoérythrine (PE)**. Localisés à la surface des thylakoïdes, ces pigments sont assemblés de façon superposée dans une même unité appelée phycobilisome (complexe majeur, collecteur d'énergie lumineuse chez les Cyanobactéries) (Manirafasha *et al.*, 2016). La C-phycocyanine ou phycocyanine (C-PC) constitue environ 50 % de phycobiliprotéine (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2012) et représente jusqu'à 20 % du poids sec de la spiruline (Chaiklahan *et al.* 2011). Elle joue un rôle bénéfique dans la santé humaine grâce à ses propriétés pharmacologiques et biologiques potentielles. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence

l'effet bénéfique de la C-PC sur la santé humaine de part ses différentes propriétés : antioxydantes et anti-inflammatoires (Chen *et al.*, 2014), immunomodulantes et immunostimulantes (Li *et al.*, 2010), anti-cancérigènes (Gardeva *et al.*, 2014), antidiabétiques (Ou *et al.*, 2013), athéroprotectives (Strasky *et al.*, 2013) et même cosmétique (Christaki *et al.*, 2016).

La possibilité de répondre aux exigences de bien-être des consommateurs et de remédier à certains problèmes de santé publique par l'intermédiaire de la phycocyanine, nous a incité à approfondir la connaissance des meilleurs moyens d'obtention de cette molécule bioactive. Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice. Cette étape est primordiale puisqu'elle déterminera la qualité et la quantité des molécules extraites et assurera par conséquent, le succès des étapes suivantes.

Des méthodes traditionnelles, comme la macération, la congélation/décongélation et l'extraction par l'utilisation de solvants, étaient jusque-là utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels (Moraes *et al.*, 2011). Ces procédés sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grandes quantités de solvants organiques, toxiques pour la plupart (Manirafasha *et al.*, 2016).

Le développement de nouvelles méthodes d'extraction alternatives dites « **éco-extraction** » ou « **chimie verte** » a marqué ces dernières années. Elles offrent de nombreux avantages d'un point de vue temps d'extraction, consommation de solvant, rendement d'extraction et reproductibilité, et ce, sans altérer la qualité de l'extrait. De plus, ces techniques sont simples d'utilisations, automatiques et souvent plus sélectives (Grimi *et al.*, 2014).

L'extraction assistée par **champ électrique pulsé (CEP, Pulsed electric field, PEF)** figure parmi ces méthodes innovatrices. Elle consiste à appliquer de courtes pulsations de champ électrique (20-80 kV/cm) à l'aliment placé entre deux électrodes (Amiali, 2005 ; Jemai et Vorobiev, 2006 ; Gachovska *et al.*, 2006). L'exposition d'une cellule animale ou végétale à un champ électrique extérieur induit une différence de potentiel électrique de part et d'autre de sa membrane. Lorsque ce champ électrique est très intense (> 10 kV/cm), il induit un potentiel transmembranaire de valeur plus élevée que le potentiel naturel de la cellule. Si le potentiel transmembranaire atteint une valeur critique (1V), le phénomène de répulsion entre

les molécules chargées de la membrane entraîne la formation de pores dans la membrane cellulaire augmentant sa perméabilité. La formation irréversible de pores entraîne la migration vers l'extérieur du contenu cellulaire (Zimmermann, 1986).

Habituellement, la spiruline se consomme sèche sous forme de poudre, ou de comprimés ou de gélules. Alors que l'extrait liquide de la phycocyanine présente l'énorme avantage de préserver les molécules actives sous leur forme spatiale originelle. De surcroît, comme l'extraction par CEP se fait à froid, ces molécules ne subissent aucune dégradation. Toutefois, sous cette forme d'extrait liquide, la phycocyanine demeure toujours capable de capter l'énergie solaire provoquant progressivement le blanchiment de l'extrait. De ce fait, pour assurer une meilleure efficacité de conservation, il est important de le conserver à l'abri de la lumière (Pottecher, 2014).

Compte tenu de l'efficacité du traitement par CEP sur les produits alimentaires liquides (Ngadi *et al.* 2010), des recherches approfondies doivent être mises en œuvre pour acquérir une meilleure compréhension des phénomènes liés à cette application du CEP pour l'extraction de la phycocyanine à partir de la biomasse fraîche de la spiruline.

Ce travail a pour objectif d'apporter sa contribution au développement des connaissances sur le sujet, à savoir mettre en œuvre une méthode innovante d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline fraîche, plus rapide et plus efficace tout en réduisant l'énergie consommée et en préservant sa pureté.

Pour atteindre cet objectif, des études expérimentales ont été abordées :

- Une caractérisation phytochimique et biochimique de quelques souches de spiruline (*Arthrospira platensis*) originaires de différents pays, Algérie, Tchad et États Unis d'Amérique.
- Une étude comparative entre l'efficacité de plusieurs procédés (CEP, ultrasons et congélation/décongélation) sur l'extraction des phycobiliprotéines (C-PC, APC et PE) de la spiruline.
- Une optimisation des paramètres (température, temps et intensité du CEP) pour l'extraction des phycobiliprotéines d'une pureté élevée.

1.1 Généralités sur la spiruline

Les microalgues sont des organismes microscopiques unicellulaires ou pluricellulaires. Leurs tailles varient de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Pour les étudier, il est nécessaire de les observer au microscope optique ou au microscope électronique, ce qui permet de voir plus de détails, en particulier ceux relatifs à leur morphologie.

La spiruline est considérée comme étant une microalgue en raison de sa taille microscopique. Les microalgues peuvent vivre sous forme libre ou en colonie. Leur cellule, unique et indifférenciée, assure toutes les fonctions. Ce sont des microorganismes appartenant à deux groupes : les eucaryotes et les procaryotes. Les microalgues eucaryotes possèdent une structure cellulaire végétale classique, avec ou sans paroi cellulosique par contre les microalgues procaryotes, appelées également Cyanobactéries, ont une structure bactérienne classique sans compartiment (Richmond, 2004).

1.1.1 Microalgues et Cyanobactéries

Les Cyanobactéries sont également appelées Cyanophytes ou Cyanophycées. Bien que connues sous le nom d'algues bleu-vert ou algues bleues, ces dernières sont des bactéries Gram-négatifs photosynthétiques et non des algues. Leur existence date d'environ 3 milliards d'années et elles sont à l'origine de la production de l'oxygène que nous respirons sur terre. Elles sont capables d'assimiler l'azote de l'air. Elles ont ainsi permis la formation de la couche d'ozone qui nous protège contre les rayons nocifs du soleil (Lavoie *et al.*, 2007).

Comme toutes les micro-algues, elles colonisent leur milieu en se divisant par formation d'hormogonies, rapidement et activement, si les conditions physico-chimiques et nutritives sont favorables. Lors de cette reproduction asexuée, leur taille diminue jusqu'à ce qu'elles ne puissent plus se diviser (Vonshak, 2002).

Les Cyanobactéries présentent une organisation relativement simple de procaryote avec une paroi qui entoure un protoplasme au sein duquel on distingue un chromatoplasme pariétal, coloré et un nucléoplasme central, incolore. Au niveau ultrastructural, le chromatoplasme apparaît comme un système membranaire à thylakoïdes et phycobilisomes portant les pigments photosynthétiques (chlorophylle *a*, β -carotène, phycocyanine, phycoérythrine). Le nucléoplasme correspond d'une part à des fibrilles d'acide désoxyribonucléique (ADN)

représentant le génome sans que le mécanisme exact de sa transmission ne soit encore bien connu et d'autre part à des grains d'acide ribonucléique (ribosomes) (Richmond, 2004).

Selon Thomazeau (2006), il existe cinq ordres divisés en vingt-sept familles qui comportent cent soixante-six genres de Cyanobactéries. Ces derniers correspondent à environ 2000 espèces, dont un grand nombre peut se développer en mer (Duy *et al.*, 2000). Le genre *Arthrospira* fait partie des Cyanobactéries qui se trouvent naturellement dans les eaux marines, ainsi que dans les lacs alcalins, contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3), ou du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) (Fox, 1999).

Le genre *Arthrospira* regroupe les microorganismes phototrophes obligatoires, filamenteux à trichomes bleu-vert, peu mobiles, enroulés régulièrement en spires larges et très ouvertes. Ils sont pluricellulaires pourvus de vésicules de gaz pour atteindre la lumière indispensable à leur photosynthèse. Les spires peuvent être espacées régulièrement avec un diamètre constant ou bien relaxées de sorte à former un filament presque droit. Le nombre de spires peut être également faible (une à trois), ou élevé (plus de cent). Le diamètre des cellules varie de 3,5 à 11 μm et celui des spires de 20 à 100 μm . Parfois les spires au centre du trichome sont plus rapprochées qu'aux extrémités, avec un diamètre de spire plus petit au centre et aux extrémités (Fox, 1999).

1.1.2 *Arthrospira platensis* (La spiruline)

1.1.2.1 Historique

Lorsque les Espagnols envahirent l'Amérique Centrale, les Aztèques, peuple originel du Mexique. Ils constatèrent qu'ils se nourrissaient essentiellement de maïs et d'une sorte de boue bleue verte ou le Tecuitlatl à haute valeur nutritive extraite du lac Tex coco. Ce Tecuitlatl considérée par les colons comme d'origine minérale, et consommé par les indigènes après avoir été séchée et broyée, était en fait de la spiruline (Paniagua *et al.*, 1993).

En Afrique, lors d'une expédition franco-belge basée au Tchad (1964-1965), le botaniste belge, J. Leonard avait constaté que les Kanembous (habitants du royaume Kanouris 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-verte. Cette purée était ensuite utilisée dans la

préparation de galèttes vendues dans la région et appelées « Dihé » (Girardin-Andreani, 2005).

Arthrospira platensis communément appelée « Spiruline » et considérée à l'origine comme une algue, a été décrite pour la première fois par Wittrock et Nordsted en 1844 sous le nom de *Spirulina jeneri platensis* Nordsted. En 1960 une claire distinction entre procaryote et eucaryote a été définie, sur la base de la différence d'organisation cellulaire. En 1962, Stanier et Van Niel constataient que cette algue bleu verte était dépourvue de compartiments cellulaires, et donc faisait partie des procaryotes (Stanier, Van Niel., 1962). Ils proposèrent de considérer ce microorganisme comme étant une Cyanobactérie. Cette nouvelle désignation est finalement acceptée et figure pour la première fois au « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology en 1974 » (Castenholz, 1989).

1.1.2.2 Classification et taxonomie confuse

La spiruline est classée selon Ripley Fox (Fox, 1999) comme suit :

Règne : Monera

Sous Règne : Procaryotes

Phylum : Cyanophyta

Classe : Cyanophyceae

Ordre : Nostocales (ou Oscillatoriales)

Famille : Oscillatoriaceae

Genre *Arthrospira*

La distinction de *Arthrospira* et *Spirulina* comme deux genres différents a été officiellement acceptée par Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Castenholz, 1989). Chez le genre *Spirulina*, les trichomes sont régulièrement enroulés en hélice plus ou moins serrée et leurs cloisons sont plus ou moins visibles. Par contre chez le genre *Arthrospira* le trichome est de grande taille et les cloisons sont bien marquées.

La spiruline change de forme en fonction des caractéristiques physiques et chimiques du milieu dans lequel on la trouve. On remarque également que dans un même milieu on trouve des variations des formes (Rich, 1931). Ces deux caractéristiques de la spiruline sont peut-être à l'origine de la confusion quant à l'attribution des termes *Spirulina* et *Arthrospira*. Néanmoins la "vraie" *Spirulina* n'est pas affiliée au genre *Arthrospira* (Nelissen *et al.*, 1994).

Le tableau ci-dessous apporte des précisions sur les amalgames possibles (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Les diverses appellations de la spiruline (Girardin-Andreani, 2005).

| | |
|--------------------|---|
| Spiruline ® | Nom commercial d'une cyanobactérie appartenant toujours au genre <i>Arthrospira</i> . |
| Spirulina ® | Nom commercial anglais de la même cyanobactérie. |
| Spirulina | Nom spécifique et taxonomique d'une autre cyanobactérie fort éloignée des <i>Arthrospira</i> . Aucune à ce jour n'a été étudiée sous l'angle de l'alimentation humaine, et aucune n'est commercialisée à cette fin. |
| Arthrospira | Nom scientifique et taxonomique d'un groupe de Cyanobactéries auxquelles appartient notre spiruline alimentaire. |

1.1.2.3 Morphologie des différentes souches d'*Arthrospira platensis*

La Spiruline a une longueur moyenne de 250 µm lorsqu'elle possède 7 spires. Elle est composée de filaments mobiles (de 10 à 12 µm de diamètre), non ramifiés, enroulés en spirales, qui la font ressembler à un minuscule ressort à boudin, d'où le nom de « Spiruline » (Zarrouk, 1966). La largeur des trichomes, composée de cellules cylindriques plus courts que larges, varie d'environ 6 à 12 µm.

Pour la forme spiralée, la hauteur de l'hélice : h est déterminée par l'équation (1.1) (Vonshak., 2002) :

$$h = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot \cos\alpha \quad (\text{Équation 1.1})$$

Où :

r est le rayon de la surface cylindrique à laquelle appartient l'hélice, α , l'angle formé par l'hélice et les génératrices du cylindre, représente la pente de la courbe en hélice.

Les facteurs environnementaux physiques principalement la température et les conditions chimiques, peuvent affecter la géométrie de l'hélice (Jeeji, 1985).

En effet, en plus de la forme de spiruline spiralée classique, on trouve parfois des formes ondulées ou droites. Selon son origine, de nombreuses souches (Paracas, Lonar... etc.) ont pu être décrites (Figure 1.1).

Selon Jourdan (2011), les souches droites sont génétiquement de vraies spirulines mais elles présentent des inconvénients liés le plus souvent, à la difficulté d'être récoltées. Toutes les souches droites ne sont pas inintéressantes, les "longues" sont faciles à récolter et les "endémiques" qui cohabitent avec les Paracas (souche ondulée) sans les envahir, ce qui ne rend pas la récolte très difficile. Zhou *et al.* (2013) ont caractérisé également différentes souches d'*Arthrospira platensis* présentant différentes formes (Figure 1.2).

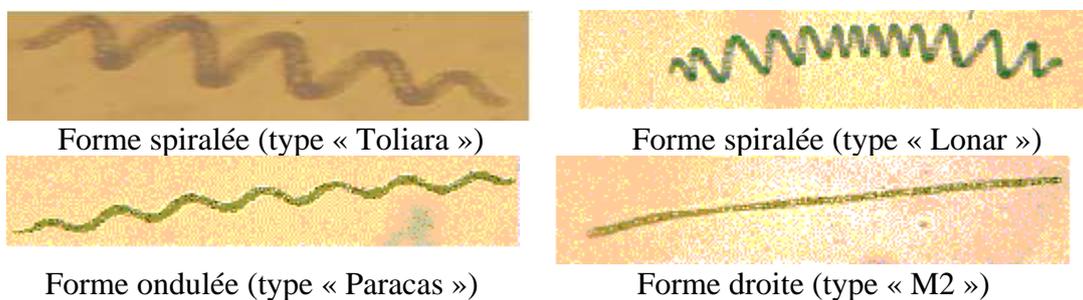


Figure 1.1 : Morphologie typique d'*Arthrospira platensis* (Falquet et Hurni, 2006).

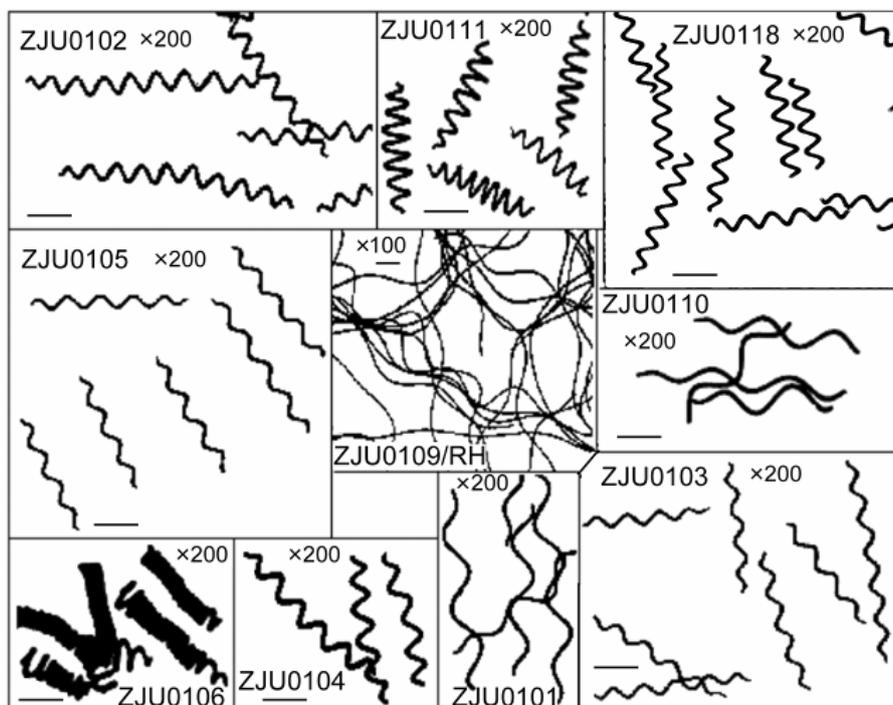


Figure 1.2 : Les morphologies de dix souches d'*A. platensis*. Les barres d'échelle, 100 μ m. (Zhou *et al.*, 2013).

Ces différentes formes dépendent des conditions écologiques dans lesquelles vivent les spirulines. Une étude, basée sur la caractérisation moléculaire de l'ITS (Internally Transcribed Space) de l'opéron ARN ribosomal et portant sur la diversité génétique de 51 souches d'*Arthrospira* provenant de 4 continents, arrive à la conclusion que les génotypes sont très conservés et correspondent au plus à deux espèces génétiques (Wilmotte *et al.*, 2004 dans Wilmotte, 2010).

1.1.2.4 Écologie et biologie

a- Reproduction

Le cycle biologique de la Spiruline a été décrit par Balloni *et al.* (1980). Le filament en maturité forme des cellules spéciales ou nécriides, correspondant à des disques de séparation de formes biconcaves (Figure 1.3). Au niveau de ces cellules le trichome se fragmente pour donner naissance à de nouveaux individus de courtes chaînes (2 à 4 cellules) appelées hormogonies. Par division binaire des cellules, les hormogonies croissent en longueur et prennent la forme typiquement hélicoïdale. Dans les conditions expérimentales, le temps de génération maximal de la spiruline est voisin de 7 heures (Zarrouk, 1966).

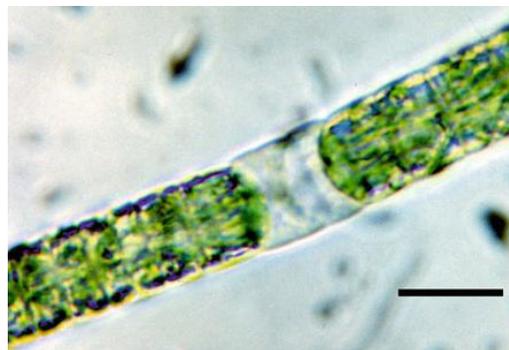


Figure 1.3 : Formation d'une nécriide chez *Arthrospira maxima*. Barre = 10µm. (Sili *et al.* dans Vonshak, 2002).

b- Production de spiruline et influence des conditions de culture

La production de la spiruline se fait à plusieurs échelles : artisanale, semi-industrielle et industrielle. Les éléments de différenciation de ces modes de production sont la surface totale des bassins de culture et leurs surfaces unitaires, les moyens et matériaux utilisés, les degrés de technologie et les objectifs. Le processus de fabrication de la spiruline passe cependant par les mêmes étapes obligatoires à savoir :

- Préparation du milieu de culture,
- Ensemencement,
- Entretien de la culture,
- Récolte,
- Séchage.

Pour ensemer il suffit de transvaser dans du milieu de culture neuf, un certain volume de culture provenant d'un autre bassin en production jusqu'à ce que la couleur devienne verte (Jourdan, 2011).

Huit grands facteurs environnementaux influencent la productivité de la spiruline : la luminosité (généralement une photopériode de 12/12), la température (30 °C), la taille de l'inoculation, la vitesse d'agitation, les matières solides dissoutes (10-60 g/Litre), le pH (8,5 – 10,5), la qualité de l'eau, et la présence de macro et d'oligo-éléments (C, N, P, K, S, Mg, Na, Cl, Ca et Fe, Zn, Cu, Ni, Co, Se) (Ciferri, 1983 ; Habib *et al.*, 2008). Théoriquement, le plan de production annuelle de spiruline se présente comme suit (Figure 1.4).

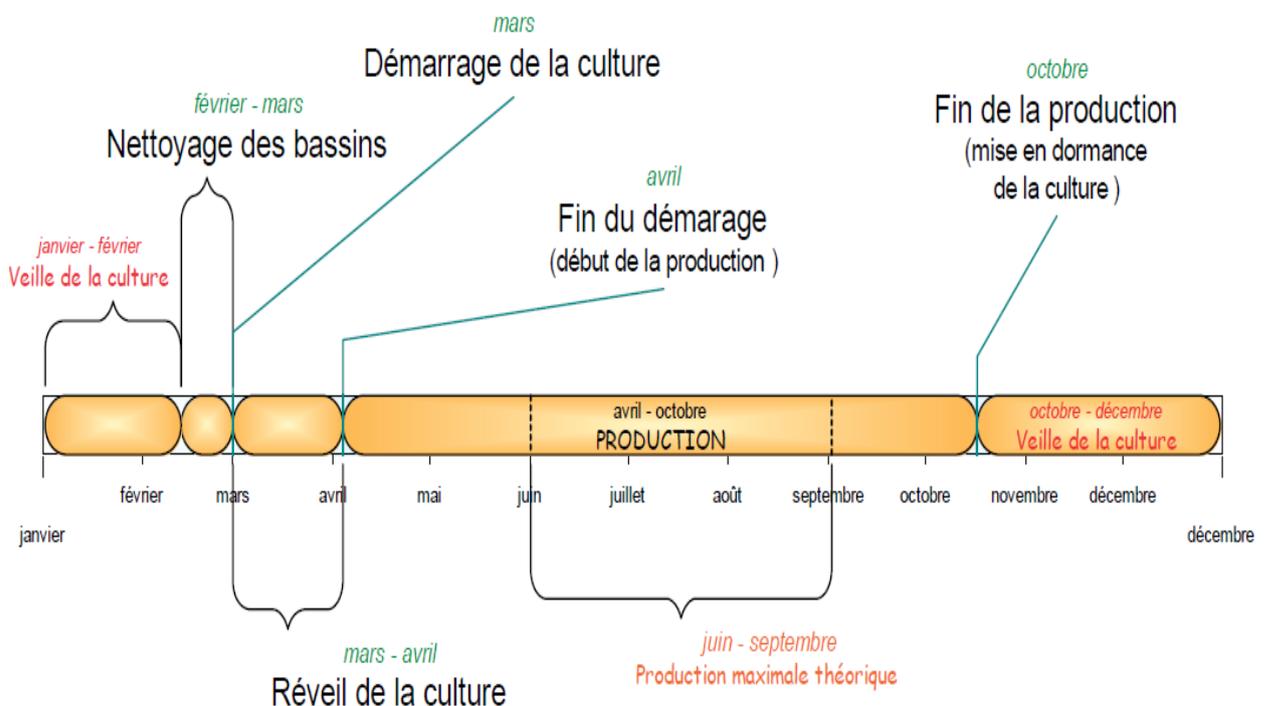


Figure 1.4 : Plan théorique de production annuelle de Spiruline (Anonyme, 2008).

c- Répartition géographique et culture

Les milieux privilégiés pour la croissance de cette microalgue sont alcalins et riches en nutriments azotés et phosphorés. Ils sont de plus bien éclairés et présentent une température élevée. De telles conditions se trouvent naturellement dans de nombreux sites répartis sur la ceinture intertropicale (entre 35°N et 35°S environ) (Fox., 1999). Plus généralement, elle croit dans des eaux légèrement chaudes, très minéralisées (riches en carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et d'autres minéraux) et une source d'azote fixe. C'est pourquoi on peut en trouver aussi dans certains déserts, à l'endroit de ramassage de l'eau provenant occasionnellement des montagnes (Fox., 1999). Ces conditions de développement excluent la prolifération de la plupart des autres microorganismes.

En Algérie vers 1980, lors d'une randonnée dans l'Atakor, (noyau du massif volcanique du Hoggar dans la région de Tamanrasset), le Dr Etienne Boileau, s'est aperçu qu'il y avait la présence d'algues assez particulières dans une guelta (point d'eau en montagne). Il a pensé à la spiruline, mais ne pouvait le confirmer étant donné qu'il n'avait pas l'équipement nécessaire pour le faire. Il préleva un échantillon qu'il remit au Dr R.D. Fox, auteur du livre "Algoculture : la spiruline, un espoir pour le monde de la faim" (Fox, 1986), qui confirma qu'il s'agissait bien de la spiruline. En 2004, suite à la confirmation de Dr Fox, cette souche a été prélevée et cultivée par M. Hiri Adelkader, d'où son nom HTam diminutif de Hiri Tamanrasset. Actuellement, l'Algérie fait partie des rares pays dans le monde où l'on cultive de la spiruline au stade de production semi industrielle.

1.2 Composition nutritionnelle de la spiruline

La composition nutritionnelle de la spiruline est variable d'une ferme à une autre et elle est dépendante du milieu de culture ainsi que des conditions de culture, de récolte et de stockage. Cependant, en moyenne, la spiruline contient en poids sec jusqu'à 70 % de protéines, 15 à 25 % de glucides et 11 % de lipides. Elle contient aussi des vitamines, des minéraux (principalement des oligoéléments), de la chlorophylle et des phycobiliprotéines.

1.2.1 Protéines

La teneur en protéines de la spiruline est élevée. Elle représente 10 à 11 % de la masse humide, soit 60 à 70% de sa matière sèche (Fox, 1999). D'un point de vue quantitatif, la spiruline est donc un aliment de choix pour un apport protéique majeur. D'un point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels que l'organisme ne peut pas synthétiser, seule l'alimentation peut les apporter, y figurent (excepté le tryptophane mais évoqué dans certaines publications tel que Fox (1999)).

Parmi ces acides aminés essentiels, les plus faiblement représentés sont les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) (Bujard *et al.*, 1970 ; Aychunie *et al.*, 1996). En plus de sa qualité nutritionnelle, les cellules de la spiruline ne sont pas protégées par d'épaisses parois cellulosiques, ce qui lui vaut un 'taux de digestibilité de l'ordre de 83 à 90 (Charpy *et al.*, 2008).

1.2.2 Lipides

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

Les lipides représentent généralement de 6 à 8 % du poids sec de la Spiruline mais ce pourcentage peut atteindre 11 % (Hudson et Karis 1974).

On range actuellement les acides gras essentiels en deux groupes (oméga-3 et oméga-6) caractérisés par la position de l'insaturation la plus proche du groupe méthyle terminal. Cette présence est bénéfique car ces acides vont jouer un rôle sur l'activité des fonctions cibles de l'organisme, directement ou indirectement impliqués dans l'état de santé et de bien être de l'homme. Ces AGE contribuent à la synthèse des eicosanoïdes, tels que les prostaglandines, le thromboxane et les leucotriènes, médiateurs impliqués dans le processus immunitaire et inflammatoire. Les eicosanoïdes dérivent des acides gras essentiels de la famille des oméga-6 et de la famille des oméga-3 par l'intermédiaire de dérivés supérieurs (acide arachidonique, acide eicosapentaénoïque (EPA) et acide docosahexaénoïque (DHA) (Jacotot et Campillo, 2003).

Les lipides essentiels (acides gras insaturés) dans la spiruline sont d'environ 1,3 à 15 pour cent des lipides totaux (6 - 6,5 %), et constituent principalement l'acide γ -linoléique ou oméga-6 (GLA : 30 à 35 % des lipides totaux) (Li et Qi, 1997). Ce dernier (GLA) est un acide gras essentiel, rarement disponible dans les ingrédients ou le régime alimentaire. Certains chercheurs ont découvert que les acides gras polyinsaturés (AGPI) peuvent représenter entre 25 et 60 pour cent des acides gras totaux dans la spiruline. Les acides gras essentiels comme l'acide linoléique et l'acide linoléique (ω 6) sont également présents (jusqu'à 1,0 g/100 g de biomasse sèche de la spiruline). Il est regrettable que la spiruline soit dépourvue d'oméga 3 (ω 3) (Kent *et al.* (2015). Les acides gras prédominants sont l'acide palmitique (44,6 à 54,1 pour cent), l'acide oléique (1 à 15,5 pour cent), l'acide linoléique (10,8 à 30,7 %) et l'acide γ -linoléique (environ 8,0 à 31,7 pour cent) (Halawlaw, 2014).

1.2.3 Glucides

Les glucides représentent 13,6 à 25 % de la matière sèche des spirulines (Falquet et Hurni, 2006). La paroi des spirulines, comme les bactéries Gram-négatives, est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides. Ces glucides sont composés principalement de glucose, ainsi que de rhamnose, de mannose, de xylose, de galactose, et de deux sucres inhabituels, à savoir : 2-O-méthyl-L-rhamnose et de 3-O-méthyl-L-rhamnose (Habib *et al.*, 2008 ; Koru, 2009).

D'autres polysaccharides comme le calcium-spirulan (Ca-SP), composés de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, acide glucuronique, acide galacturonique, sulfate et calcium sont également présents dans la spiruline (Hayashi et Hayashi, 1996).

1.2.4 Vitamines

La spiruline contient une large gamme de vitamines. Parmi les vitamines liposolubles, le β -carotène ou provitamine A, représente entre 40 et 80 % des caroténoïdes présents dans la spiruline, le reste est composé principalement de xanthophylle, cryptoxanthine, échinénone, zéaxanthine et lutéine (Palla et Busson, 1969). La spiruline comporte environ 8 % de vitamine E avec une variabilité notamment au regard du séchage. La vitamine E est sensible à l'oxydation. Cette teneur est remarquable car assez proche de celle des germes de blé. Elle représente également une source très intéressante de vitamine hydrosoluble du groupe B,

principalement la vitamine B₁₂, puisqu'elle apporte la quantité recommandée par jour (Charlemagne, 2008 ; Charpy *et al.*, 2008).

1.2.5 Minéraux

La composition en minéraux de la spiruline présente une grande variabilité dans les teneurs qui s'explique par le fait qu'elles concernent les spirulines en milieu naturel et celles cultivées.

La spiruline constitue une excellente source de calcium assimilable pouvant notamment être utilisée dans les cas d'intolérance au lactose ou par des personnes consommant peu de produits laitiers. De plus, le calcium, le phosphore et le magnésium sont présents en quantités comparables à celles trouvées dans le lait (Charlemagne, 2008). Le taux de fer est également élevé dans la spiruline mais dépasse rarement 500 mg/kg, on signalera que certaines valeurs supérieures à 1000 mg/kg ont été trouvées (Campanella *et al.* 1999). Puyfoulhoux (2001) a montré que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande, ce qui est exceptionnel pour un fer non-hémique.

La quantité de zinc présente dans la spiruline varie d'un échantillon à l'autre et est conditionnée par l'apport de zinc dans la solution nutritive apportée dans les bassins de culture. Naturellement, la spiruline en contient des traces (21- 40 µg/g) (Charpy *et al.* 2008), mais un enrichissement de la culture peut en faire une source intéressante. La biodisponibilité du zinc de la spiruline n'est pas encore testée mais on peut soupçonner, au regard de la bonne biodisponibilité du fer et du magnésium, qu'il en sera de même pour le zinc (Charlemagne, 2008).

1.2.6 Pigments

Arthrospira contient de nombreux pigments photosynthétiques : Chlorophylle *a*, β-carotène, phycocyanine, phycoérythrine et environ 11 caroténoïdes. Ces pigments sont activés par la lumière et servent ainsi d'antennes pour recueillir l'énergie lumineuse totale et la transmettre aux centres de réaction de la molécule de chlorophylle (Fox, 1999).

La chlorophylle *a* est le pigment primordial qui participe à la photosynthèse. Les autres pigments sont des pigments accessoires ou antennes qui capturent la lumière aux autres longueurs d'onde que celles de la chlorophylle *a* et qui sont capables de lui transférer cette

énergie lumineuse. Tous les végétaux photosynthétiques possèdent en plus de la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* comme pigment antenne (Richmond, 2004).

Les caroténoïdes sont une autre famille de pigments, qui absorbent vers 450 nm. On les trouve aussi dans tous les végétaux photosynthétiques et certaines bactéries. En plus de servir de pigment antenne, ils servent aussi de protecteurs car ils permettent d'absorber l'excès d'énergie lumineuse (M'baye *et al.*, 2011).

Les Cyanobactéries sont connues pour la présence d'autres pigments antennes en plus de ceux présents chez les végétaux supérieurs (Figure 1.5) : ce sont les phycobiliprotéines. Ces derniers sont constitués de trois pigments : phycocyanine (C-PC), allophycocyanine, (APC) et phycoérythrine (PE) qui peuvent exploiter l'énergie présente tout le long du spectre de la lumière visible (Belay, 1997) (Tableau 1.2). La phycocyanine, principal pigment d'*Arthrospira* est le seul colorant alimentaire bleu et naturel autorisé en Europe (Anonyme, 2015).

Il est intéressant de noter que toutes ces molécules contiennent des liaisons doubles conjuguées qui sont essentielles pour l'absorption et le transport de l'énergie lumineuse (Figure 1.6).

Tableau 1.2 : Composition en pigment de la spiruline (*Arthrospira*) (Belay, 1997).

| Pigments | Teneurs (mg/100g) |
|-----------------------|-------------------|
| Caroténoïdes | 370 |
| Chlorophylle <i>a</i> | 1000 |
| Phycocyanine | 14000 |

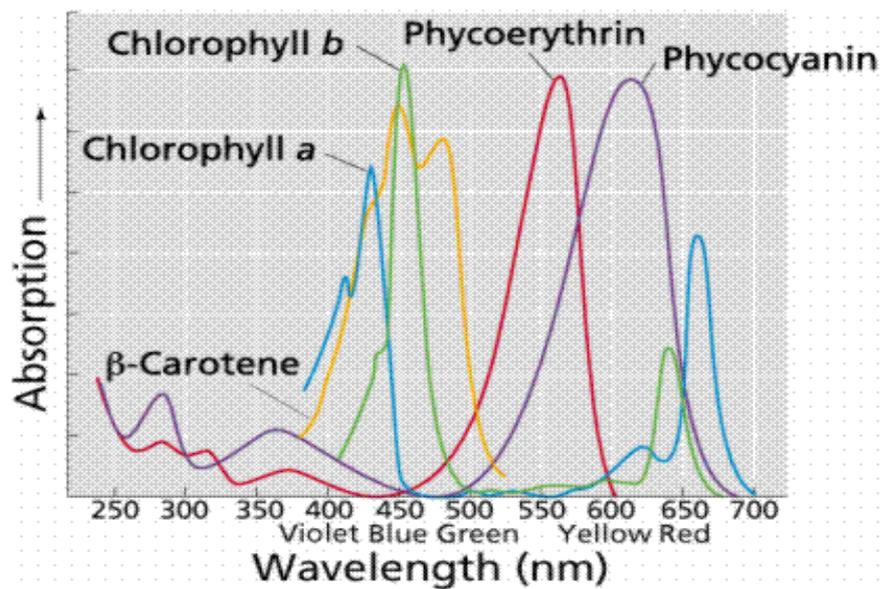
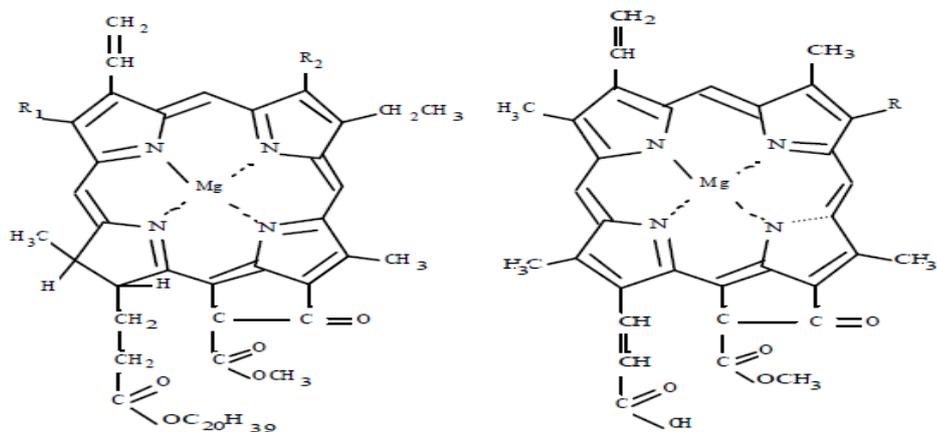


Figure 1.5 : Spectres d'absorption des différents pigments de Cyanobactéries (Wilmotte, 2010).

CHLOROPHYLLES



Chlorophylle a :

R1: CH₃ R2: CH₃

Chlorophylle b :

R1: CH₃ R2: CHO

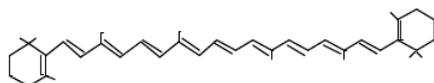
Chlorophylle c₁ :

R: CH₂CH₃

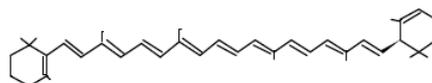
Chlorophylle c₂ :

R: CH=CH₂

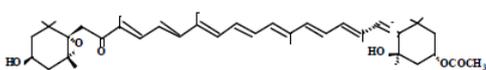
CAROTENES



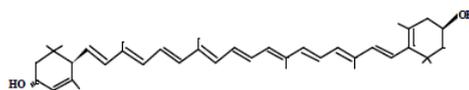
beta-carotène



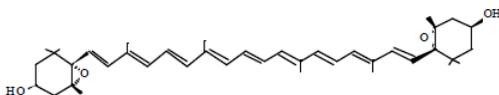
alpha-carotène



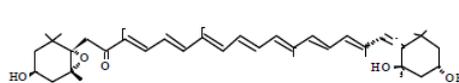
Fucoxanthine



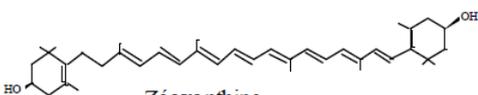
Lutéine



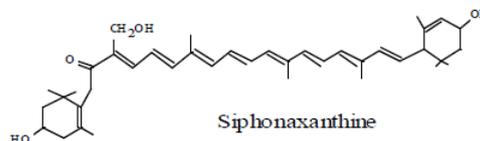
Violaxanthine



Néoxanthine



Zéaxanthine



Siphonaxanthine

Figure 1.6 : Structure de quelques pigments photosynthétiques des algues (Ragan, 1981).

1.3 Composés bioactifs de la spiruline

1.3.1 Définition des composés bioactifs

Les **composés bioactifs** sont des composés chimiques naturels contenus dans un végétal, un animal ou une source marine ou dérivés de ceux-ci et qui apportent des avantages en matière de santé et de bien-être (ex : oméga-3 des huiles de poisson et bêta-glucanes dérivés de l'avoine et de l'orge).

Ces dernières années, plus de 15 000 nouveaux composés biochimiques ont été découverts dans les microalgues. Ces composés, qui révèlent des structures et fonctions particulières, font partie de familles de molécules connues comme les vitamines, les acides gras (oméga 3), les pigments, les antioxydants et les stérols (Microphit, 2016). Voici quelques particularités inhérentes à ces microalgues :

- Les microalgues sont les producteurs primaires d'huiles de qualités supérieures telles que les acides gras oméga-3 et oméga-6. Certaines espèces sont notamment connues pour produire des volumes élevés d'acide docosahexaénoïque (DHA) et d'acide eicosapentaénoïque (EPA) (Kent *et al.*, 2015).
- Les microalgues produisent des niveaux élevés de caroténoïdes. Il s'agit d'un groupe de plus de 600 molécules, qui offre un fort potentiel antioxydant et de nombreux bénéfices fonctionnels pour les industriels de la cosmétique, de l'alimentation et de la santé.
- Les microalgues sont également source de phycobiliprotéines.

1.3.2 Phycobiliprotéines

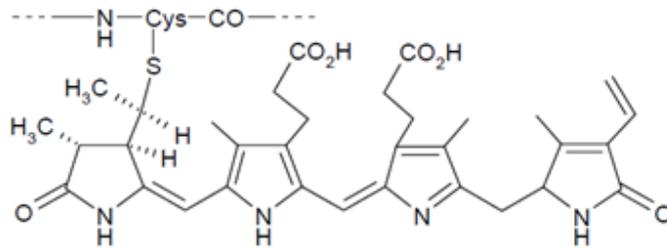
L'absorption des radiations visibles photosynthétiquement est importante chez les Cyanobactéries, entre 500 et 650 nm, dans une zone où l'absorption liée aux pigments chlorophylliens et caroténoïdes est faible. Cette capacité est liée à la présence de phycobiliprotéines, pigments protéiques hydrosolubles pouvant constituer jusqu'à 60 % de la masse des protéines cellulaires totales (Thomas, 1989).

Les méthodes biochimiques classiques (chromatographiques) ont été largement utilisées pour obtenir la purification exhaustive des principales phycobiliprotéines. Les résultats ont montré l'existence de deux espèces pigmentaires bleues différentes (allophycoyanine absorption maximum à 650 nm et phycoyanine à 620 nm), sont synthétisées par chaque espèce de Cyanobactérie ou de Rhodophycée. En revanche, la présence d'un pigment "rouge" (phycoérythrine - $A_{\max} = 565$ nm, ou phycoérythrocyanine - $A_{\max} = 568$ nm) n'est pas constante, la synthèse pouvant n'être jamais observée, ou alors seulement lorsque les souches sont soumises à une certaine qualité d'éclairements, phénomène d'adaptation chromatique complémentaire, est fonction des propriétés physiologiques exclusives des souches Cyanobactériennes (Bogorad, 1975 ; Tandeau de Marsac, 1983).

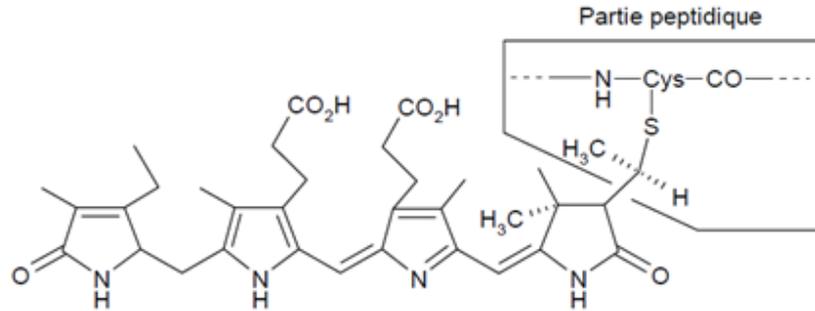
Les phycobiliprotéines sont des molécules hydrosolubles comportant une partie protéique liée de façon covalente (liaison thioether) à des chromophores ou bilines. Ces derniers sont composés de groupes tétra pyrroliques non cyclisés.

On connaît quatre types de chromophores dans les biliprotéines des Cyanobactéries et de Rhodophycées : un chromophore bleu (phycoyanobiline - maximum d'absorption dans le spectre visible à 660 nm), deux chromophores rouges (phycoérythrobyline, à 550 nm, et cryptoviolette ; à 590 nm), ainsi qu'un chromophore orangé (phycourobiline - maximum d'absorption à 495 nm) (Ruiz, 2005). Ces propriétés spectrales sont celles obtenues après clivage chimique de la liaison covalente thioether existant entre le chromophore et la chaîne polypeptidique, ou bien en présence d'urée 8 M à pH acide, condition, totalement dénaturante, dans laquelle les interactions non covalentes chromophore-protéine sont abolies (Glazer, 1982 dans Thoma, 1989). La structure chimique précise de ces bilines est présentée dans les Figure 1.7 et 1.8.

Phycocérythrobiline liée à un peptide (couleur rouge)



Phycocyanobiline liée à un peptide (couleur bleue)



Phycounrobiline liée à un peptide (couleur bleue turquoise)

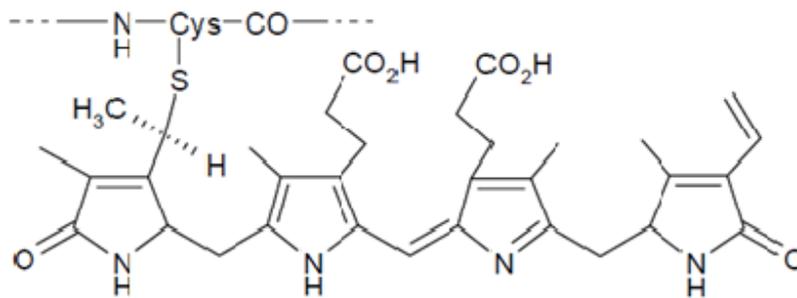


Figure 1.7 : Structure des phycobilines (Chromophores) (Ruiz, 2005).

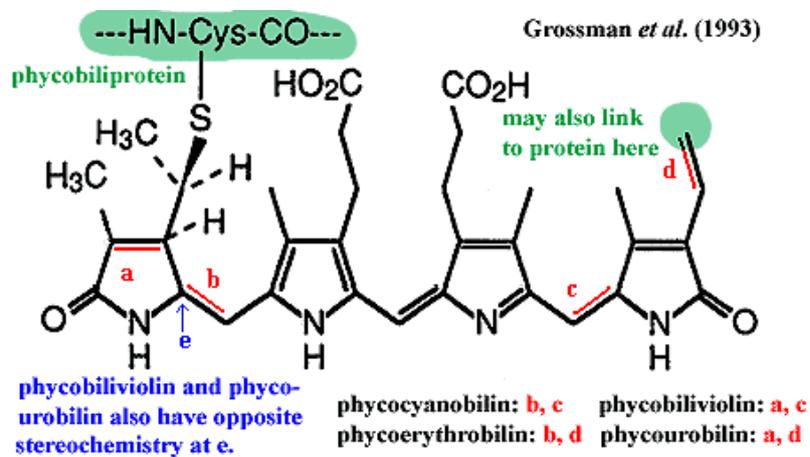


Figure 1.8 : Différence entre les phycobilines.

1.3.3 Phycobilisomes

Les phycobiliprotéines (C-PC, APC et PE) localisées à la surface des thylakoïdes sont assemblées de façon superposée dans une même unité appelée phycobilisomes (Figure 1.9). L'assemblage de façon géométrique des pigments est fait de manière à optimiser la capture de lumière et le transfert d'énergie (Patil et Raghavarao, 2007). Toutes les phycobiliprotéines absorbent directement la lumière incidente, mais elles participent également à une chaîne de transfert d'énergie dans le phycobilisome (le transfert d'énergie provient de la phycoérythrine → phycocyanine → allophycocyanine → chlorophylle) (Manirafasha *et al.*, 2016). Le phycobilisome est le complexe majeur, collecteur d'énergie lumineuse de l'appareil photosynthétique présent chez les Cyanobacteries.

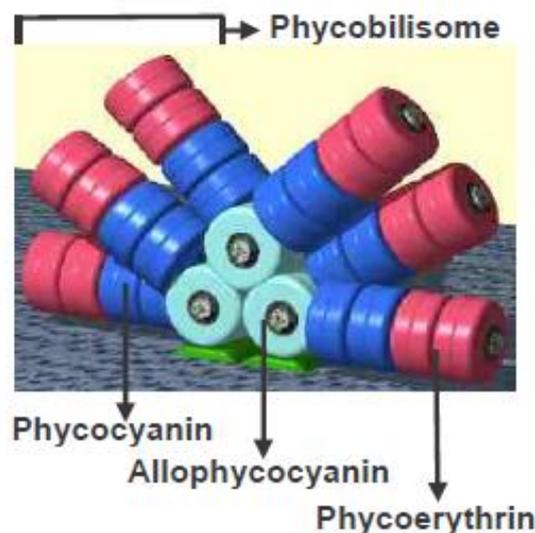


Figure 1.9 : Structure des phycobilisomes (Patil et Raghavarao, 2007).

1.3.4 Phycocyanine

La spiruline est une source considérable de pigments naturels, principalement la phycocyanine et l'allophycocyanine avec un rapport de 10 :1 (Campanella *et al.*, 2000). Le groupe prosthétique de C-PC et APC est appelé phycocyanobiline (PCB) ou chromophore.

En solution, la phycocyanine se présente sous la forme d'un mélange complexe de monomères, de trimères, d'hexamères et d'autres oligomères. Sa masse moléculaire est comprise entre 44 et 260 kDa (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015).

La phycocyanine est habituellement composée de 2 sous-unités protéiques ou apoprotéines (sous-unité α : 20,5 kDa - sous-unité β : 23,5 kDa), et d'un chromophore (molécules de phycocyanobiline constituées du groupe bilin = groupe prosthétique). Ce dernier est constitué du noyau tétra pyrrolique de la chlorophylle, ouvert et sans magnésium. Les molécules de PCB sont reliées à l'apoprotéine par des ponts thioether avec un résidu cystéine. Le monomère $\alpha\beta$ n'est pas la forme stable, ni *in vivo*, ni dans les conditions habituelles d'extraction. Selon le type de phycobiliprotéine, c'est l'état trimérique ($\alpha\beta_3$), ou hexamérique ($\alpha\beta_6$) qui est l'agrégat oligomérique stable. Les propriétés spectrales (absorption, fluorescence) sont liées à la composition chromophorique, aux interactions chromophore-chaînes polypeptidiques, mais aussi aux interactions entre les polypeptides d'un monomère, entre monomères d'un agrégat oligomérique (Thomas, 1989 ; Anamika *et al.*, 2005).

La séquence complète en acides aminés a été déterminée pour les sous-unités (α , β) de l'allophycocyanine et de la phycocyanine des Cyanobactéries. Ces données sont à relier aux études immunologiques antérieures, qui montraient l'absence de réactions croisées entre phycocyanine et allophycocyanine, bien que ces molécules renferment le même chromophore phycocyanobilinique (Thomas, 1989).

La mesure de ces phycobiliprotéines par spectrophotométrie a été évaluée par différents auteurs (Anamika *et al.*, 2005, Chaiklahan *et al.*, 2012).

1.3.5 Purification et stabilité de la phycocyanine

1.3.5.1 Purification

Les phycobiliprotéines purifiées sont nécessaires pour les activités potentielles, ainsi que pour les applications industrielles, biomédicales et pharmaceutiques. Une séquence d'étapes comprenant la précipitation, la dialyse, des colonnes de chromatographie ont été couramment appliquées par les chercheurs mais elles présentent certains inconvénients, notamment un coût élevé, un traitement de longue durée, un faible rendement et un durcissement (Goja *et al.* 2013).

La pureté de la C-PC est généralement évaluée par un rapport d'absorbance (Equation 1.2):

$$\text{Pureté} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (\text{Equation 1.2})$$

Où :

A_{620} représente le pic d'absorbance de la C-PC,

A_{280} est l'absorbance de protéines riches en acides aminés aromatiques (indique la présence d'une contamination).

Plus l'absorbance des contaminants est élevée plus la pureté diminue.

Au cours de la purification de la C-PC, cette molécule doit être séparée de l'APC. Le facteur de séparation (FS) est mesuré par le rapport d'absorbance (Equation 1.3) :

$$FS = \frac{A_{620}}{A_{652}} \quad (\text{Equation 1.3})$$

Où :

A_{652} représente le pic d'absorbance de l'APC.

Plus A_{652} est élevée plus le FS est faible ce qui se traduit par une faible pureté de la C-PC.

Selon la pureté Rito-Palmaraes (2001) a classé la C-PC en trois catégories. Pour une pureté égale à 0,7, la C-PC est de qualité alimentaire. 3,9, la qualité est réactive, tandis que 4 la qualité est analytique. Les fractions qui manifestent une pureté supérieure à 4 sont considérées comme très pures (Boussiba et Richmond, 1979).

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur la purification de la C-PC de la spiruline, dans le but de trouver la méthode la plus fiable.

Nous retiendrons que Minkova *et al.*, (2003) ont purifié l'extrait brut de C-PC par un traitement à plusieurs étapes : du rivanol (avec un rapport 10 :1), suivi d'une saturation à 40% du sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), puis élimination du rivanol par filtration sur du Sephadex G-25. Enfin, ils effectuent une dernière saturation à 70% du sulfate d'ammonium.

Une nouvelle approche, pour la purification de la C-phycoyanine (C-PC), plus simple et plus efficace que les méthodes existantes a été faite par Patil et Raghavarao (2007). Cette méthode comporte deux étapes: l'extraction aqueuse à deux phases et la chromatographie d'échange d'ions.

Silva *et al.*, (2009) ont utilisé un plan expérimental pour l'optimisation de la purification. L'effet de la concentration en sulfate d'ammonium, du volume et du pH de la suspension a été évalué. Chen *et al.*, (2014) ont purifié l'extrait brut de C-PC en ajoutant différentes concentrations de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40, 35, 30%), suivie d'une dialyse et d'une chromatographie.

Selon Chaiklahan *et al.*, (2012), la pureté de la C-PC joue un rôle significatif dans les applications commerciales et médicinales. Ces dernières années, de nouvelles techniques de purification telles que l'ultrafiltration, le procédé d'extraction en deux phases, la chromatographie échangeuse d'ions ont été utilisées. Si ces nouvelles méthodes présentent plus d'avantages que les procédés traditionnels, elles ont encore de nombreux obstacles à surmonter (Goja *et al.* 2013).

1.3.5.2 Stabilité

La phycocyanine a un grand pouvoir de piégeage des radicaux libres. Par conséquent, l'utilisation thérapeutique de cette molécule semble prometteuse puisque de nombreuses maladies sont liées à une formation excessive de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), en anglais ROS (reactive oxygen species), (Romay *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation de C-PC dans les aliments et dans d'autres applications est limitée en raison de sa sensibilité au traitement thermique, ce qui entraîne une précipitation et une décoloration de la couleur bleue. L'azotate de sodium et le dithiothreitol sont couramment utilisés comme conservateurs pour la phycocyanine à des fins analytiques, mais ils sont toxiques et ne peuvent donc pas être utilisés pour la production de phycocyanine de qualité alimentaire. En revanche, les sucres et les alcools polyhydriques (sans danger pour la consommation) ont été utilisés pour stabiliser les protéines (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015).

Du fait que la phycocyanine sous forme aqueuse se dégrade rapidement en cas de contamination bactérienne. Elle doit donc être conservée sous forme stérile ou au froid (congélation), ce qui entraîne des surcoûts importants. Toutefois, il est connu qu'en milieu aqueux, la stérilisation par la chaleur ou les ultraviolets dégrade la molécule de phycocyanine qui perd toute son efficacité après ouverture du conditionnement, impliquant de ce fait un conditionnement en monodose (Pottecher, 2014).

Les conservateurs chimiques présentent une toxicité qui les rend incompatibles pour un usage alimentaire. Seuls des essais avec des huiles essentielles, ont donné des résultats

acceptables. L'huile essentielle de Ravintsara (*Cinnomomum camphora*) retarde le développement bactérien tout en restant compatible avec un usage alimentaire, mais ce traitement ne convient que pour une préservation à court terme de la phycocyanine car les développements bactériens sont freinés mais pas annihilés. Il n'est pas possible non plus d'acidifier fortement le milieu pour empêcher le développement de bactéries car la phycocyanine est très sensible au pH et toute variation importante entraîne une précipitation des molécules. La phycocyanine devient instable et précipite en dessous de pH 5 et au-delà de pH 7,5 (Pottecher, 2014).

La congélation est une solution simple à mettre en œuvre, mais elle rend le transport très compliqué et très coûteux en raison de la nécessité de préserver la chaîne du froid.

L'alcool (éthanol) à forte concentration permet de stabiliser la phycocyanine, mais altère une grande partie de ses propriétés antioxydantes. De plus, l'alcool est problématique en raison des multiples interdictions religieuses auquel il est soumis (Pottecher, 2014).

1.3.6 Activités thérapeutiques de la phycocyanine

La littérature a montré que la phycocyanine joue un rôle bénéfique pour la santé humaine grâce à ses propriétés pharmacologiques et biologiques potentielles. Nous avons tenté de regrouper, une partie des travaux les plus récents dans le tableau (1.3).

Illustrés dans des crèmes de beauté en jouant un rôle dans la stimulation de la synthèse de collagène, ces pigments peuvent avoir des applications dans l'industrie cosmétique (Christaki *et al.*, 2016). Au repos, la phycocyanine a une couleur bleue et est pourvue d'une fluorescence rouge. Elle présente une absorption maximum à 620 nm et une radiation d'émission à 635 nm. Cette qualité en fait un produit fluorescent naturel qui est un marqueur de choix dans les diagnostics biomédicaux (Pottecher, 2014).

Tableau 1.3 : Propriétés pharmacologiques et biologiques des phycocyanines.

| Espèce de micro algue étudiée | Propriété physiologique | Références |
|--|----------------------------|--|
| <i>Spirulina platensis</i> , <i>Aphanizomenon flos aquae</i> | Antioxydante | Romay <i>et al</i> 2003 ; Guan <i>et al.</i> 2009 ; Shalaby et Shanab, 2013; Chen <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Spirulina platensis</i> ; <i>Arthrospira maxima</i> | Anti inflammatoire | Romay <i>et al</i> 2003 ; Gonzalez, <i>et al.</i> , 1999 ; Chen <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Neuroprotective | Romay <i>et al.</i> , 2003 ; Penton-Rol et 2011 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Néphroprotectrice | Rodriguez-Sanchez <i>et al.</i> , 2012, Rodriguez-Salgueiro <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Arthronema africanum</i> (Cyanophyceae) | Anti tumorale, Anti cancer | Gardeva <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Anti radicalaire | Bhat et Madyastha, 2000; Shalaby et Shanab, 2013 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Anti cataractogène | Kumari <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Anti diabétique | Ou <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Immunomodulatrice | Chen <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Cicatrisante des plaies | Gur <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Atheroprotective | Strasky <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Spirulina</i> | Hepatoprotective | Romay <i>et al</i> 2003 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Anti hyperalgique | Shih <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Spirulina platensis</i> (<i>Arthrospira</i>) | Antivirale | Ayehunie <i>et al.</i> , 1998; Shalaby <i>et al.</i> , 2010 ; Murugan, 2011 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Antifongique | Murugan, 2011 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Cosmétique | Christaki <i>et al.</i> , 2016 |

1.3.7 Intérêt de l'extraction de la phycocyanine

La phycocyanine est une molécule de grand intérêt notamment en raison de ses propriétés bénéfiques pour la santé humaine (Tableau 1.3). Elle est consommée notamment pour ses propriétés antioxydantes et aussi pour sa capacité à favoriser la production de cellules souches (Pottecher , 2014).

La forte teneur de ce pigment a un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique. La production de la C-PC dépend de plusieurs paramètres à savoir : la souche de spiruline, l'intensité de l'éclairage, la composition du milieu de culture...etc. Selon Walter *et al.*, (2011) l'utilisation d'une lumière rouge pour l'éclairage de la culture à la place d'une lumière ordinaire augmente la teneur et la pureté de C-PC. Il existe des spirulines de haute qualité particulièrement riche en phycocyanine (environ 20 % du poids sec au lieu de 10 à 11 % qui représente la teneur minimale dans la spiruline de base) (Jourdan, 2011).

Cependant, il s'agit d'une molécule coûteuse et compliquée à extraire. Après extraction et en cas de contamination bactérienne, cette molécule se dégrade très rapidement, ce qui surenchérit les coûts. Sous forme liquide, dans l'eau, cette molécule doit être extraite dans des conditions stériles et de préférence conditionnée en mono-doses (par exemple des ampoules en verre) car après ouverture le milieu n'est plus stérile et la phycocyanine est détruite (Pottecher, 2014 et Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015).

Ainsi, le développement de méthodes de bio-séparation efficaces, respectueuses de l'environnement et économiques à grande échelle, est souhaitable tout en préservant les propriétés de la phycobiliprotéine. Bien ajustées, ces méthodes doivent assurer un rendement, une qualité et une pureté élevés. Pour cela il faut suivre les étapes décrites par Manirafasha *et al.*, (2016) dans la figure (1.10).

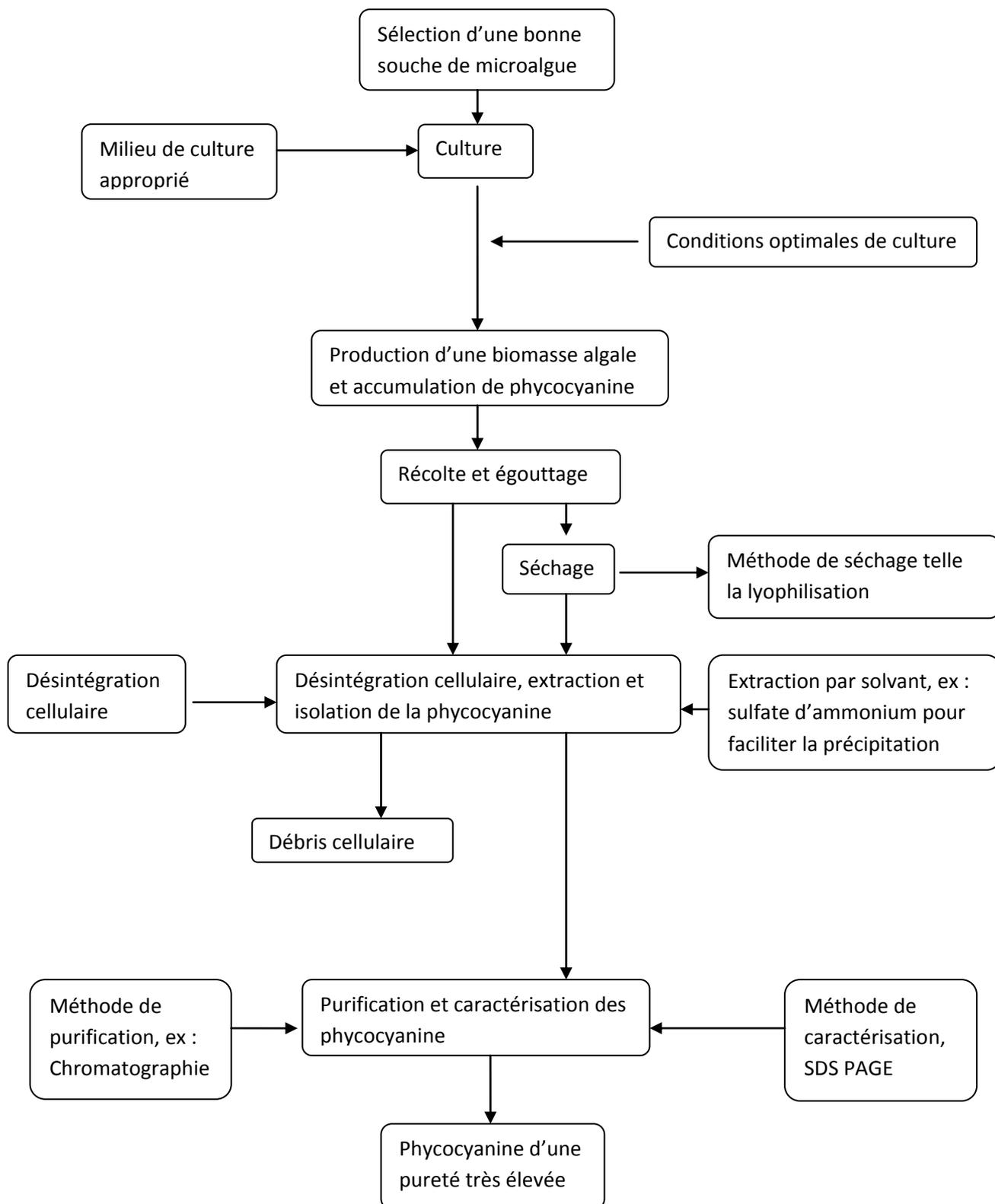


Figure 1.10 : Diagramme du processus de production de phycocyanine (Manirafasha *et al.*,2016).

1.4 Extraction des composés bioactifs à partir des microalgues

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape de l'extraction (qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale), est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites. Elle assurera, par conséquent, le succès des étapes suivantes, à savoir l'élaboration de produits nutraceutiques et/ou d'aliments fonctionnels. Ces derniers peuvent être définis selon (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2015) comme suit:

- Un produit « nutraceutique » ou « produit de santé naturel » est isolé ou purifié à partir d'aliments, mais vendu en général sous des formes médicinales qui ne sont pas d'habitude associées aux aliments (gélules, pilules, poudre, ampoules contenant un liquide...etc.). L'effet physiologique bénéfique ou la capacité de protéger contre les maladies chroniques de ces produits nutraceutiques est prouvé.
- Les aliments fonctionnels sont semblables en apparence aux aliments conventionnels. Ils font partie de l'alimentation normale et procurent des bienfaits physiologiques démontrés et/ou réduisent le risque de maladie chronique au-delà des fonctions nutritionnelles de base (par exemple l'ajout d'ingrédients bioactifs de spiruline dans les pâtes alimentaires).

Différentes méthodes d'extraction ont été proposées, parmi lesquelles la filtration tangentielle, l'extraction accélérée par solvant, la lyse cellulaire et l'extraction aqueuse en deux phases. Les méthodes conventionnelles ou traditionnelles, était jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels. Cependant, ces procédés s'avèrent être généralement longs tout en nécessitant l'utilisation massive de solvant organique (Manirafasha *et al.*, 2016) (Tableau 1.4).

Ainsi, la demande croissante pour des produits possédant d'excellentes propriétés nutritionnelles et organoleptiques, couplée à l'importance de la réduction de l'impact énergétique et environnemental de ces procédés classiques, ont poussé les chercheurs et les professionnels de l'alimentation à faire de plus en plus appel à des techniques innovatrices alternatives pour pallier à ces inconvénients.

Nous traiterons dans cette partie les différentes méthodes d'extraction (conventionnelles et innovatrices) des composés bioactifs (ex phycocyanine).

Tableau 1.4 : Avantages et inconvénients des méthodes conventionnelles d'extraction des phycobiliprotéines (Manirafasha *et al.*, 2016).

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

1.4.1 Méthodes conventionnelles d'extraction

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

1.4.1.1 Méthodes mécaniques

- L'extraction à l'eau : elle permet de briser les cellules fragiles avec un minimum de dommages. Les cellules, incubées dans une solution hypotonique, cherchent à rétablir l'équilibre osmotique. L'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique. La biomasse de spiruline suspendue dans l'eau distillée permet l'extraction de la phycocyanine qui sera dosée par spectrophotométrie (Siegelman et Kycia, 1978).

- Homogénéisation des cellules : le broyage se fait à l'aide d'un mortier et un pilon en présence de sable neutre lavé à l'acide tout en utilisant un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,8. L'extrait est ensuite centrifugé et le surnageant obtenu contient de la phycocyanine (Prabakaran et Ravindran, 2013). D'après les auteurs, cette méthode présente le meilleur rendement d'extraction comparée à la congélation/décongélation.

- Congélation/décongélation (Sarada *et al.*, 1999): La phycocyanine a été extraite par des étapes de congélation suivie d'une décongélation répétées des cellules, dans du tampon phosphate (50 mM, pH 6,8). Ces chercheurs ont également utilisé une autre méthode à savoir : l'homogénéisation dans un Virtimixer (The Virtis Company, Gardiner NY 12525) à différentes vitesses. La biomasse humide récoltée mise en suspension dans du tampon phosphate a été soumise à 5, 10, 20 et 1000 tr / min pendant une durée d'intermittence de 10 minutes.

- Le « bead beating », aussi connu sous le nom de « bead mill » ou broyeur à perles, est une technique très simple de dégradation cellulaire. Cette technique consiste en une très forte agitation du milieu comprenant la solution de microalgues à traiter, additionnée de solvant (une concentration de l'ordre de 100 à 200 g/L) et des perles de quartz ou de métal (Mercer et Armenta, 2011). La collision et la friction de ces perles avec les cellules entraînent une déstructuration de ces dernières.

1.4.1.2 Méthodes chimiques

- Extraction par solvant : L'extraction de la phycocyanine a été évaluée en utilisant de l'eau distillée et une solution de CaCl_2 à 1 % (Prabuthas *et al.*, 2011). La macération, en utilisant l'hexane, a été également utilisée par Seo *et al.* (2013). Malheureusement ces solvants posent un problème crucial : l'hexane et l'éther de pétrole sont toxiques. L'éthanol permet l'extraction la plus efficace, mais pose de nombreux problèmes : toxicité, interdiction dans certaines religions et perte de l'activité antioxydante.

- Extraction acide (Sarada *et al.*, 1999) et (Prabakaran et Ravindran, 2013) : La biomasse humide a été traitée avec différentes concentrations d'acide chlorhydrique (2, 4, 6, 8 et 10 N) à température ambiante. À des intervalles de temps différents (2, 4, 24 heures), les échantillons ont été centrifugés et les surnageants ont été prélevés pour une estimation de la phycocyanine.

- Extraction enzymatique : Seo *et al.*, (2013) ont réalisé la désintégration enzymatique de la paroi cellulaire en plaçant la poudre de *A. platensis* dans un bain d'agitation à 30 °C pendant 24 heures en présence d'un lysozyme. Les enzymes lytiques comme les cellulases, pectinases, xylanases, protéases, etc., peuvent être employées pour rompre les parois de ces cellules.

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

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

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

1.4.2 Méthodes innovatrices d'extraction

Diverses techniques ou « technologies innovatrices » sont actuellement proposées Il s'agit, essentiellement, de techniques telles que l'extraction assistée par ultrasons (UAE, Ultrasound Assisted Extraction), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE, Microwave Assisted Extraction), l'extraction assistée par champ électrique pulsé (PEF, Pulsed Electric

Field), l'extraction à haute pression (HPE, High-Pressure Extraction), l'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) et enfin l'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction).

Ces nouvelles technologies font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches, à la fois fondamentales et appliquées. Si certaines d'entre elles ont même été développées à l'échelle industrielle, d'autres sont encore au stade du laboratoire. Des essais portant sur des tentatives d'introduction des techniques d'irradiation, et plus récemment des OGM, ont échoué. De ce fait les industries alimentaires restent très prudentes vis-à-vis de l'introduction de ce type de technologies.

1.4.2.1 Extraction assistée par les ultrasons

Un ultrason est une vibration de même nature que le son, mais de fréquence supérieure à la plus haute fréquence audible pour un homme. Ces vibrations sont produites dans la matière à une fréquence supérieure à 20 000 Hz (entre 20 et 100 kHz). Il existe en effet quatre types de sons différents suivant une fréquence donnée (Tableau 1.5).

Tableau 1.5 : Les types de fréquences de sons (Luque et De Castro 2003).

| Fréquence | Sons |
|-------------------|--------------------------------------|
| 0 à 20 Hz | Infrasons inaudibles pour l'homme |
| 20 Hz à 20 kHz | Sons audibles par l'homme |
| 20 kHz à 1 GHz | Ultrasons (peu audible pour l'homme) |
| Séquences à 1 GHz | Hyper sons (inaudible pour l'homme) |

a- Principe :

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 kHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de dépression (basse pression) (Wang et Weller, 2006). Selon Pétrier *et al.*, (2008), cette action génère des millions de bulles microscopiques qui se propagent pendant la phase de pression négative, et qui implosent violemment pendant la phase de pression positive (Figure 1.11).

Ce phénomène, appelé « cavitation », dissipe une énergie considérable au niveau du point d'implosion. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et

produit un jet de liquide à grande vitesse. Le jet liquide a un fort impact sur la surface solide. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (Luque et De Castro 2003 et Wang et Weller, 2006).

L'efficacité du traitement par ultrasons provient de la cavitation, dans laquelle les points chauds locaux et les pressions élevées peuvent faciliter la rupture de la paroi cellulaire (Mäki-Arvela *et al.*, 2014).

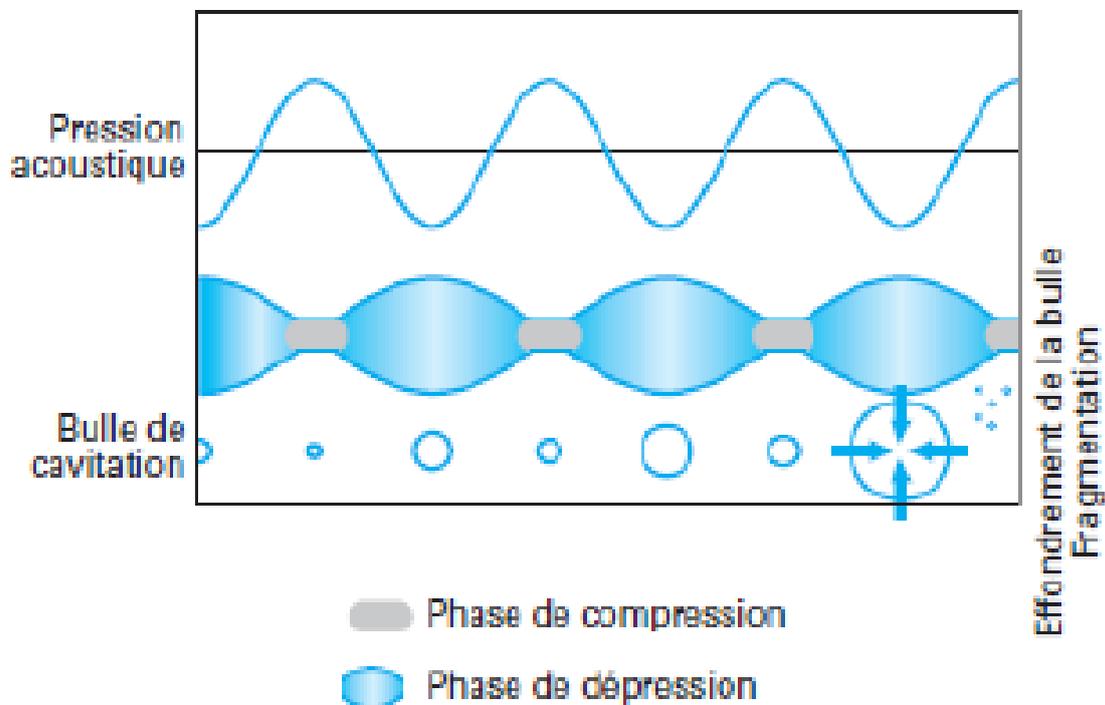


Figure 1.11 : Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Pétrier *et al.*, 2008).

En outre, beaucoup de facteurs régissent l'action des ultrasons à savoir la fréquence, la pression, la température et le temps de traitement.

Les micrographies électroniques à balayage (MEB) ont montré l'évidence des effets mécaniques des ultrasons, principalement par la destruction des parois cellulaires et la libération du contenu cellulaire. Contrairement aux extractions conventionnelles, les extraits de plantes vont diffuser à travers des parois cellulaires, fragilisées par les Ultrasons du fait d'une rupture rapide des parois cellulaires (Chemat *et al.*, 2004).

Les ultrasons sont étudiés dans le cadre d'opérations de stabilisation ou d'extraction. Deux types d'effets sont recherchés : des effets physiques ou des effets chimiques :

- Concernant les effets physiques, les ultrasons accélèrent ou favorisent la cristallisation des matières grasses ou des sucres, le dégazage et la destruction de mousses ou d'émulsions, l'extraction de composés d'intérêt ou d'arômes, la filtration, la cristallisation de l'eau ou des solutés lors de la congélation, le mélange ou l'homogénéisation, la précipitation, l'attendrissement des viandes... etc.
- Les effets chimiques et biologiques portent sur la catalyse de certaines réactions chimiques, la décontamination microbiologique ou l'inactivation de certaines enzymes.

b- Applications sur les microalgues

L'efficacité des ultrasons dans le domaine de l'extraction des produits naturels n'est plus à démontrer. Dans le domaine des microalgues, les ultrasons ont montré leur efficacité sur la souche *Nannochloropsis* sp. Dans la littérature, plusieurs articles sur l'extraction assistée par ultrasons des composés bioactifs tel la phycocyanine ainsi que d'autres composés de microalgues ont été publiés (Plaza *et al.*, 2008, Macias-Sanchez *et al.*, 2009 ; Hemlata *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2013).

Concernant l'extraction des lipides, Prabakaram et Ravindram (2011) ont réalisé une étude sur trois espèces de microalgues sur lesquelles différentes méthodes de destructuration ont été testées (autoclave, bead beating, micro-ondes, choc osmotique et ultrasons). Les ultrasons apparaissent comme être la technique de choix permettant d'obtenir le meilleur rendement lipidique. Les ultrasons se sont révélés très pertinents pour l'extraction des lipides à partir des microalgues et ce jusqu'à une certaine puissance. Au-delà de celle-ci, il a été observé une oxydation des lipides.

c- Avantages et inconvénients

Les ultrasons ont les avantages suivants :

- Augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction,

- Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles,
- Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes,
- Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant, ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.

1.4.2.2 Extraction assistée par les hautes pressions

a- Principe

Le procédé des hautes pressions consiste à soumettre un produit alimentaire liquide ou solide, avec ou sans emballage, à des pressions comprises entre 100 et 800 MPa, à température ambiante ou inférieure à 50 °C. La durée de traitement est généralement comprise entre 5 et 30 minutes (Devlieghere *et al.*, 2004).

La pression élevée raccourcit typiquement le temps d'extraction et la quantité de solvant utilisé.

b- Application sur les microalgues

L'extraction des liquides pressurisés de la spiruline a été étudiée de manière intensive par Plaza *et al.*, (2008), Shang *et al.*, (2011), Koo *et al.*, (2012) et autres. Pour l'extraction de la phycocyanine, Seo *et al.*, (2013) ont appliqué une pression hydrostatique de 5000 bars à 20 °C pendant 15 minutes. Le traitement sous haute pression a été effectué sur un sac plastique spécial scellé hermétiquement et contenant une suspension de poudre de *S. platensis* dans de l'eau distillée. Par la suite l'échantillon a été immergé dans de l'eau à 4 °C pendant 12 heures, suivie d'une filtration sous vide en utilisant du papier-filtre.

c- Avantages et inconvénients

L'extraction sous hautes pressions est vivement recommandée chez les algues en raison des avantages suivants :

- Possibilité d'éviter la chaleur excessive, l'oxygène et la lumière qui causent la dégradation des composés sensibles,

- Utilisation d'une plus faible quantité de solvant,
- Sélectivité plus élevée par rapport au Soxhlet et extraction assistée par ultrasons,
- Diminution du temps nécessaire pour l'extraction.

Ce procédé, également connu sous le terme de « Pascalisation », peut être utilisé pour améliorer la durée de vie des aliments ou être appliqué aux matières premières et aux ingrédients pour modifier certains aspects de leur fonctionnalité. La mise en œuvre de ce procédé reste aujourd'hui limitée en raison de son coût. Des applications industrielles existent toutefois pour les jus de fruits en France et dans divers pays d'Europe, les confitures, le riz cuit au Japon et le guacamole aux États-Unis.

1.4.2.3 Extraction assistée par micro-ondes

a- Principe :

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Néanmoins, dans le but d'éviter des interférences avec les radiocommunications et les radars, les micro-ondes domestiques et industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2,45 GHz (Camel, 2001). Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infrarouges et les radiofréquences, avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm (Figure 1.12).

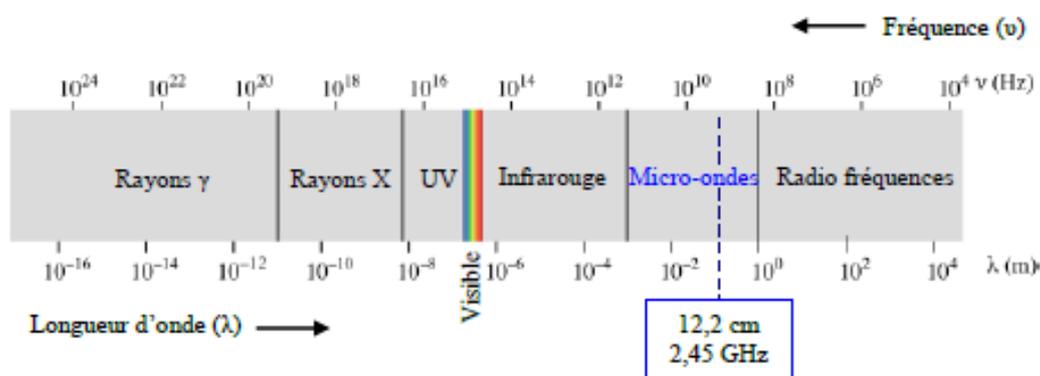


Figure 1.12 : Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques (Michel, 2011).

b- Application sur les microalgues

Les micro-ondes ont la particularité de chauffer instantanément et préférentiellement des molécules polaires et notamment les molécules d'eau. Les cellules de microalgues étant constituées de 65-85 % d'eau, et suite à une exposition aux micro-ondes, la cellule est sujette à des contraintes importantes qui entraînent une déstructuration des cellules favorisant ainsi la libération des molécules d'intérêts. Le phénomène peut donc conduire à augmenter l'efficacité des procédures d'extraction de lipides des micro-algues. Une étude récente publiée par Balasubramanian *et al.* (2011) a montré que l'extraction assistée par micro-ondes de *Scenedesmus obliquus* a permis d'obtenir 77 % de lipides alors que l'extraction au Soxhlet n'a conduit qu'à 47 % de lipides. Par ailleurs, avec le procédé micro-ondes, le temps d'extraction a été considérablement réduit (30 minutes pour les micro-ondes contre 10 heures pour le Soxhlet). L'huile extraite présentait une meilleure qualité et contenait davantage d'oméga-3 et d'oméga-6. L'étude de l'équipe de Lee *et al* (2010) a par ailleurs mis en évidence l'efficacité des micro-ondes par rapport à d'autres techniques (ultrasons, « bead beating », choc osmotique, autoclave) sur différentes microalgues telles que *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus*. Seule contrainte, les micro-ondes imposent de travailler à partir d'une biomasse humide

c- Avantages et inconvénients

- Par rapport aux techniques d'extraction classiques, les principaux avantages de l'extraction assistée par micro-ondes sont sa rapidité, la réduction du volume de solvant utilisé, tout en ayant un rendement d'extraction amélioré. De plus, elle est simple d'utilisation et peu onéreuse.
- Néanmoins, c'est une technique d'extraction qui nécessite une étape de filtration et/ou de centrifugation pour éliminer les particules solides après extraction. Par ailleurs, de faibles rendements d'extraction peuvent être obtenus lorsque des solvants apolaires ou volatils sont utilisés (Wang et Weller, 2006).

1.4.2.4 Extraction par fluide supercritique

a- Principe

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le fluide à l'état supercritique. L'état supercritique d'un fluide est obtenu en menant le gaz au-dessus de sa

température critique T_c ou en comprimant le liquide au-delà de sa pression critique P_c . La température critique est la température au-delà de laquelle la phase liquide de la substance ne peut pas exister, quelle que soit la pression. La pression de vapeur à la température critique est la pression critique (Benaissi, 2013) (Figure 1.13). Selon l'auteur, les fluides supercritiques comparés aux solvants liquides, ont plusieurs avantages, dont les principaux sont :

- La puissance de dissolution d'un solvant liquide supercritique dépend de sa densité, qui est fortement réglable en changeant la pression ou/et la température.

- Le fluide supercritique a un coefficient de diffusion plus élevé et une tension superficielle plus faible ainsi qu'une viscosité inférieure à celle d'un solvant liquide, menant ainsi à un transfert de masse plus favorable.

Le CO_2 est le fluide supercritique le plus utilisé car il présente des avantages notables : non toxique, non polluant, non inflammable, largement disponible à de très hauts degrés de pureté (jusqu'à 99,9999 %) et à des coûts modérés (de l'ordre de 1 €/kg). De plus ses paramètres critiques sont faibles ($T_c = 31 \text{ °C}$, $P_c = 73,8 \text{ bars}$) ce qui en fait un solvant « vert » ayant des applications industrielles tout à fait innovantes (Benaissi, 2013).

En revanche, c'est une technologie au coût élevé et requérant des pressions importantes, la technologie nécessite un environnement sécurisé ; on ne compte qu'environ 250 installations industrielles dans le monde. Néanmoins, les recherches se poursuivent, par exemple pour extraire de nouvelles molécules avec des pressions plus élevées, jusqu'à 700 bars. Par ailleurs, se sont développées récemment des méthodes d'extraction par de l'eau supercritique, qui permet d'isoler des composés solubles dans l'eau, alors que le CO_2 dissout plutôt des composés lipophiles (Déniel, 2010).

b- Application sur les microalgues

Le CO_2 supercritique a été utilisé par Valderrama *et al.*, (2003) pour l'extraction de l'astaxantine à partir de *Haematococcus pluvialis* et la phycocyanine à partir de *Spirulina maxima*. Également l'effet de la pression et de la température sur l'extraction supercritique des caroténoïdes a été intensément étudié (Macias-Sanchez *et al.*, 2009 ; Kitada *et al.*, 2009 Cardoso *et al.*, 2012).

c- Avantages et inconvénients

La technologie au CO₂ supercritique apparaît comme adaptée à l'extraction de lipides à partir de microalgues pour les raisons suivantes (Benaissi, 2013):

- Un pouvoir solvant à géométrie variable : la solubilité d'une substance dans le CO₂ supercritique dépend de la masse volumique du fluide. Compte tenu de la compressibilité de ce fluide supercritique, la température et la pression de travail influencent la masse volumique, et par conséquent la solubilité des composés. Ce changement de masse volumique du fluide supercritique est à l'origine du pouvoir solvant à géométrie variable.
- Un transfert de matière favorisé : comme le fluide supercritique possède des propriétés intermédiaires entre l'état liquide et l'état gazeux, celles-ci lui permettent ainsi de pénétrer très rapidement dans les cellules des micro-algues.
- L'obtention d'extrait sans résidus de solvant : l'extrait lipidique obtenu à partir d'une extraction au CO₂ supercritique est exempt de solvant. Ainsi aucune énergie n'est dépensée pour l'élimination de celui-ci.
- Le seul inconvénient de cette technique est le coût d'extraction. Sensiblement plus élevé que celui des autres méthodes, il compense en regard de la qualité, de la sécurité et de la performance.

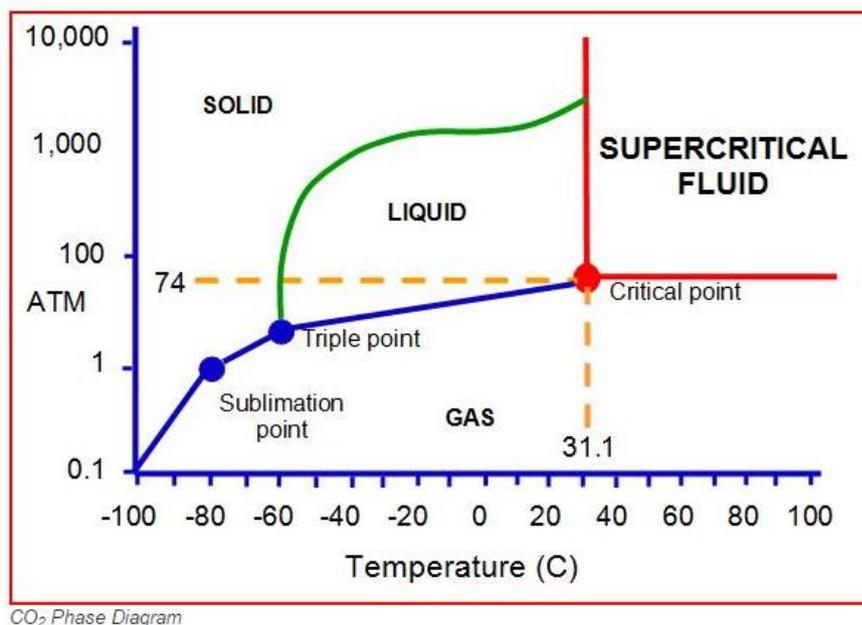


Figure 1.13 : Diagramme de phase pour le CO₂ (Anonyme, 2016).

1.4.2.5 Extraction par le champ électrique pulsé

Les champs électriques pulsés (CEP) sont depuis longtemps utilisés en génie génétique, pour l'hybridation cellulaire (incorporation de l'ADN) et l'électrofusion (Jeyamkondan *et al.*, 1999). La particularité du CEP réside dans sa sélectivité vis - à - vis des membranes cellulaires en provoquant un déséquilibre de charges ioniques qui se traduit par une compression électromécanique au niveau de celles-ci. La tension induite par le champ électrique entraîne la création de pores. L'ouverture des pores peut être réversible ou irréversible selon l'intensité du champ électrique appliqué (Zimmermann, 1986).

Dans ce contexte dans les parties qui suivent, nous allons décrire en détail le procédé du CEP, ainsi que les applications que nous serions susceptibles de développer au laboratoire.

1.5 Champ électrique pulsé

1.5.1 Approche historique

Le pionnier de l'application des champs électriques pulsés dans le domaine alimentaire est Heinz Doevenspeck. Il a décrit l'efficacité des champs électriques pulsés pour l'amélioration de la séparation des phases dans le matériel alimentaire (Doevenspeck 1960, 1961). Au cours des 10 années, la technologie des champs électriques pulsés a été développée par Doevenspeck et étendue à l'inactivation microbienne. Grâce à un traitement par le CEP, la croissance des microorganismes et la détérioration des échantillons de bière a été empêchée.

Les premières études systématiques sur l'effet létal non thermique des champs électriques pulsés sur des microorganismes ont été réalisées à l'Unilever Research Centre au Royaume-Uni (Sale et Hamilton, 1967).

Une application similaire est donnée dans un brevet American (Dunn et Pearlman 1989) qui décrit des procédés et appareils pour prolonger la durée de conservation des produits alimentaires liquides, en soumettant les produits alimentaires fluides tels que les produits laitiers, les jus de fruits et les produits d'œufs fluides à un traitement par CEP.

Au début des années 1990, un grand nombre de chercheurs dans les universités se sont focalisés sur l'intérêt de l'application du CEP dans le domaine alimentaire.

En 1995, la Food and Drug Administration (FDA) a publié une lettre de non-objection pour l'utilisation de la technologie CEP ou PEF (Pulsed electric field) dans la préservation des aliments.

Les applications envisageables des puissances pulsées sont reportées par Kristiansen (1993) dans la figure (1.14).

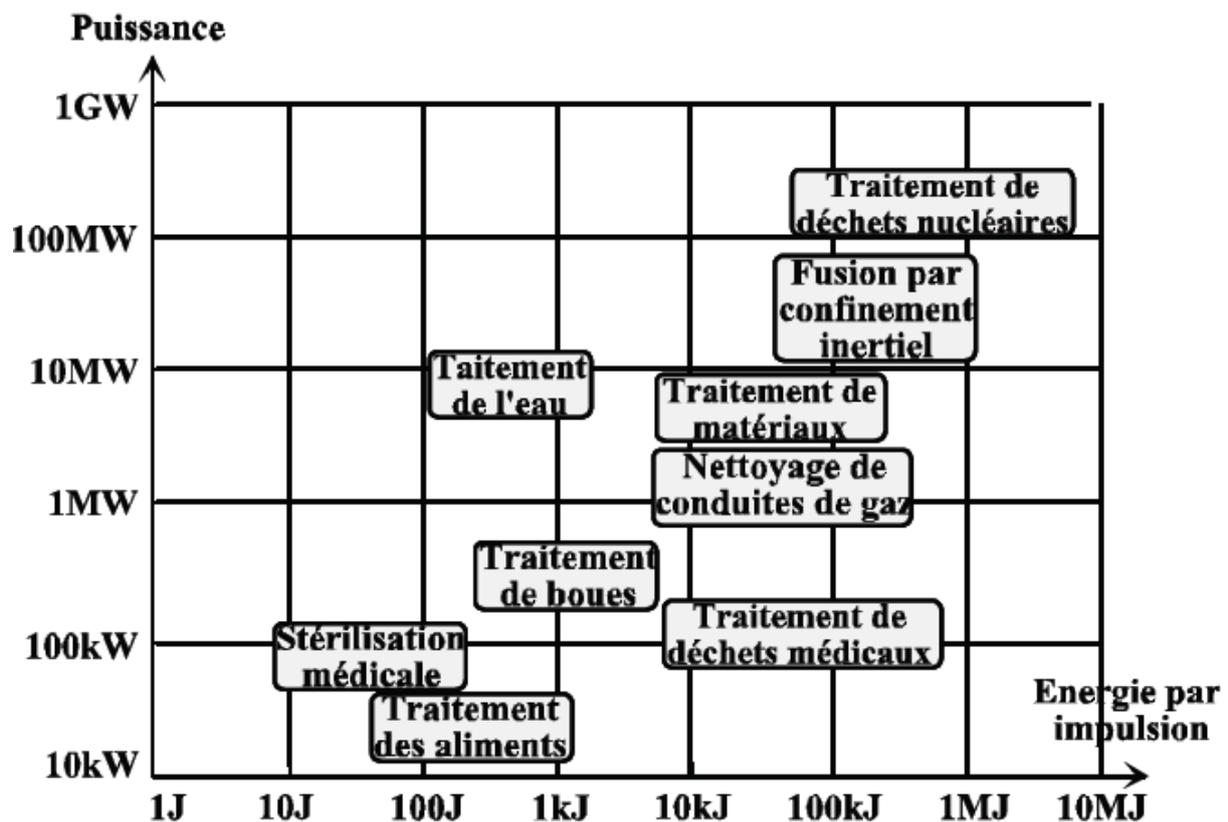


Figure 1.14: Quelques applications des puissances pulsées d'après Kristiansen (1993).

Actuellement, deux principales applications des champs électriques pulsés sont bien abordées. Il s'agit essentiellement de la réduction microbienne des aliments à basse température (Barbosa-Canovas, 1999 ; Knorr *et al.*, 2001 ; Heinz *et al.*, 2002 ; Amiali, 2005) en utilisant des CEP de hautes intensités ($E > 10$ kV/cm) et de l'extraction des métabolites ou de composés intracellulaires à partir de cellules végétales en utilisant des CEP de moyennes intensités (0,1 à 5 kV/cm) (Bazhal et Vorobiev, 2000 ; Bazhal., 2001 ; Vorobiev et Lebovka, 2008 ; Grimi *et al.*, 2009 ; Grimi *et al.*, 2010 ; Ben ammar, 2011).

Selon Jaeger *et al.*, (2008) les travaux de recherche portent plus sur l'inactivation microbienne et enzymatique avec les applications de CEP comme technique de désintégration

et l'induction de la réponse au stress dans les cellules biologiques. Bien que les recherches sur la technologie des champs pulsés soient nombreuses, il n'existe qu'une quantité limitée de prototypes à l'échelle technique ou industrielle et/ou d'applications commerciales. À l'heure actuelle, environ 25 groupes de recherche travaillent sur des applications de CEP pour la production alimentaire.

1.5.2 Mécanisme d'action du CEP

Le procédé du champ électrique pulsé, appliqué au domaine alimentaire, consiste à soumettre les aliments à des champs électriques de très forte intensité de l'ordre de 2 à 80 kV/cm, de manière répétée (pulsée), pendant des temps très courts (micro ou millisecondes), dans le but de détruire les microorganismes ou d'extraire les composés intracellulaires (Zimmermann 1986).

Un générateur à haute tension est utilisé pour charger des condensateurs. À l'aide d'un switch haute tension, l'énergie stockée dans le condensateur est déchargée rapidement sous forme de pulsation dans une chambre de traitement à l'intérieur de laquelle se trouve l'aliment placé entre deux électrodes (Goñgora-Nieto *et al.*, 2002). La distance séparant les deux électrodes vaut quelques centaines de micromètres, ce qui permet de générer des champs de plusieurs dizaines de kV/cm. Si la membrane cellulaire est perturbée, le contenu intracellulaire s'écoule et les activités métaboliques des cellules s'arrêtent (Barbosa-Canovas *et al.*, 1999).

Il existe différentes théories expliquant la perte temporaire de la semi-perméabilité d'une cellule et la lyse des membranes cellulaires sous l'influence du CEP à haute tension. Les deux théories les plus acceptées sont : « **la rupture diélectrique** » et « **l'électroporation** ».

1.5.2.1 Rupture diélectrique

Le phénomène de rupture membranaire n'étant pas totalement connu à ce jour, la théorie de Zimmermann semble être la plus acceptée par la communauté scientifique. Dans cette théorie, la membrane peut être considérée comme un condensateur (Zimmermann 1986). Des charges opposées existent de part et d'autre de la membrane à l'état naturel, ce qui induit un potentiel transmembranaire initial.

Le potentiel transmembranaire (PTM ou V) est le résultat de mouvements ioniques transmembranaires. Ces mouvements sont la conséquence d'une distribution inégale, de part et d'autre de la membrane, des ions et macromolécules chargées (Golovanov, 1995). Dans le milieu intracellulaire le potentiel électrique (φ_c) est négatif, contrairement au potentiel de l'espace extra-cellulaire (φ_e), qui est positif (Figure 1.15).

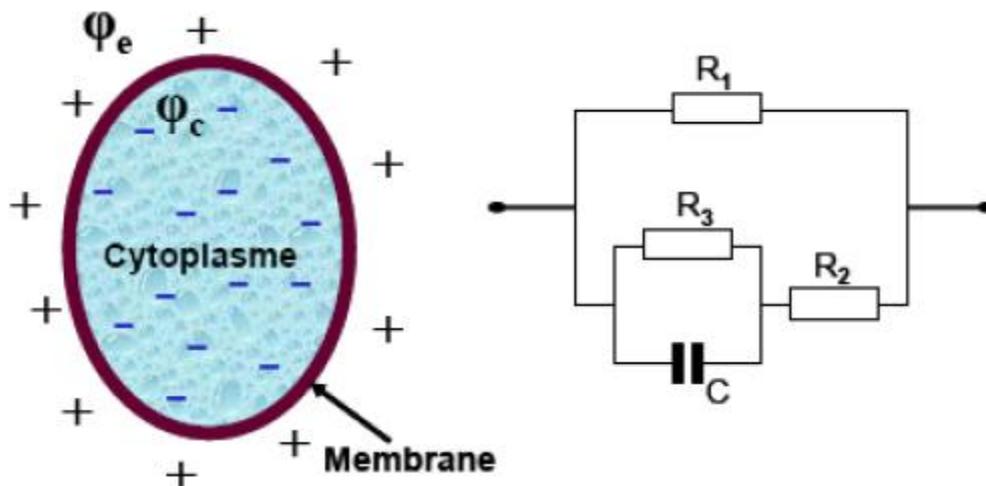


Figure 1.15 : Modèle électrique d'une cellule biologique (Ciobanu, 1987). Avec R_1 la résistance de l'espace extracellulaire ; R_2 la résistance du cytoplasme ; R_3 la résistance de la membrane cellulaire et C la capacité électrique de la membrane cellulaire.

L'exposition de la membrane à un champ électrique entraîne une accumulation des charges en surface de la membrane, ce qui augmente le PTM. Le PTM est représenté par l'équation (2.4), (Barbosa-Canovas *et al.*, 1999):

$$V_t = 1.5 \times f \times R_c \times E_r \times \cos \theta \left[1 - \left(\exp \frac{-t}{\tau_r} \right) \right] \quad \text{Equation 1.4}$$

Où

V_t est le potentiel transmembranaire induit (V),

f est un facteur qui dépend de la forme de la cellule ($f = 1$ pour les cellules sphériques).

R_c est le rayon de la cellule (mm),

τ_r est le temps de relaxation

t est le temps après que le champ constant est activé

E_r est le champ électrique de rupture (V/mm),

θ est l'angle défini par la direction du champ électrique et le rayon au niveau duquel le potentiel a été mesuré.

Lorsque $\theta = 0^\circ$ ou 180° (au pôle de la cellule), $\cos \theta = 1$, donc une valeur maximale du potentiel transmembranaire V_t

Selon Knorr *et al.* (2005), les membranes cellulaires sont stables aux faibles valeurs de V_t mais lorsque celui-ci dépasse une valeur seuil (de l'ordre 0,2 à 1 V), elles deviennent perméables, puis au-delà d'une valeur critique (comprise entre 0,7 et 2,2 V pour les cellules végétales et animales respectivement) les membranes sont complètement endommagées. Un potentiel électrique V_t d'environ 1 V correspond à un champ électrique $E_m = 200$ V/cm pour les cellules végétales (de diamètre $d = 50$ μm) et un $E_m = 10$ kV/cm pour les cellules microbiennes ($d = 1$ μm) (Markov, 2010). L'intensité du champ électrique concentré à la membrane (E_m) est estimée par l'équation (2.5).

$$E_m = \frac{V_t}{d} = \frac{ER_c}{h_m} \quad \text{Equation 1.5}$$

Ainsi: V_t est le potentiel électrique transmembranaire (V); d est le diamètre de la cellule (cm). La largeur d'une membrane h_m (≈ 5 nm) est très faible par rapport à une cellule végétale rayon R_c (≈ 100 μm).

Si on considère le 2^{ème} rapport: $E_m = 2 \times 10^4$ E = 200 V/cm pour la cellule végétale et $E_m = 10^4$ E = 10 kV/cm pour la cellule animale ($d = 1$ μm).

L'accumulation des charges, de signes opposés, provoque une compression de la membrane et donc son amincissement, qui à son tour augmente l'attraction entre les deux faces. À un moment donné, une rupture localisée de la membrane a lieu : il y a formation de pores. Le potentiel transmembranaire est alors appelé « potentiel de rupture » et sa valeur est proche de 1V (Castro, 1994 ; Knorr *et al.*, 1994).

Lorsque l'intensité du champ électrique E est nettement supérieure au champ électrique de rupture (E_r ou bien E_m), la formation des pores devient irréversible (Figure 1.16).

Les mécanismes d'électroporation microbienne ou cellulaire ne sont pas complètement élucidés, mais on a postulé que les lipides se réarrangent dans la bicouche en raison d'interactions électrostatiques, formant des pores qui provoquent cette augmentation de la perméabilité (Zbinden *et al.*, 2013). L'application du champ électrique provoque la réorientation des molécules lipidiques, créant ainsi des pores hydrophiles.

Selon Castro *et al.*, (1993), une membrane cellulaire est pourvue de canaux protéiques, de pores et de pompes. L'ouverture et la fermeture de ces nombreux canaux constitués par des protéines dépendent du PTM (le potentiel de passage à travers les canaux protéiques est environ 50 mV). Lorsque le CEP est appliqué, de nombreux canaux protéiques sensibles à la tension s'ouvrent. Les canaux protéiques, une fois ouverts, connaîtront un courant beaucoup plus important que le courant normalement connu pendant les activités métaboliques. En conséquence, les canaux protéiques sont dénaturés de façon irréversible (la dénaturation d'une molécule de protéine est la perturbation de sa forme tridimensionnelle qui élimine ses activités enzymatiques). Ainsi, l'électroporation dans la membrane cellulaire se produit à la fois dans les canaux protéiques et dans la bicouche lipidique, ce qui entraîne l'inactivation de la cellule. La figure (1.17) montre les trois étapes de destruction de la membrane par champ électrique.

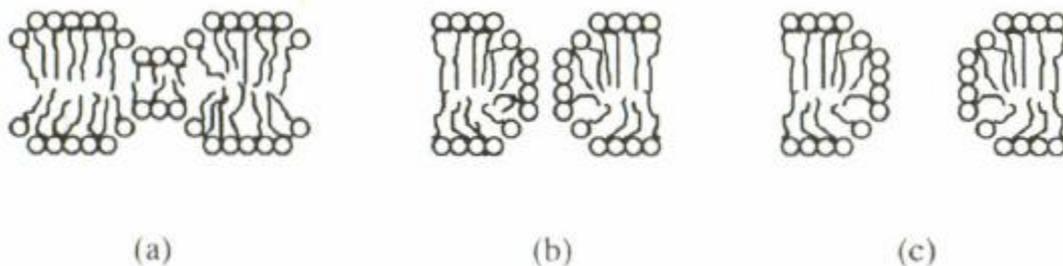


Figure 1.17 : Electroporation de la membrane cellulaire basée sur un modèle viscoélastique: (a) augmentation de la fluctuation membranaires, (b) des réarrangements moléculaires conduisant à une discontinuité, et (c) une expansion du pore conduisant à une rupture mécanique de la membrane (Dimitrov, 1984).

Selon Golberg (2016) l'exposition des cellules aux champs électriques conduit à une perméabilité accrue de la membrane cellulaire due à l'électroporation. Ce phénomène peut être utilisé pour la destruction des cellules, la fusion des cellules, l'extraction ou l'introduction de petites et grandes molécules dans les cellules. Les résultats possibles dépendent du protocole de champ électrique pulsé (amplitude, forme, nombre et durée des pulsations).

1.5.3 Différents composants du système

Un système de traitement de champ électrique pulsé comprend une source d'alimentation à haute tension, un condensateur de stockage d'énergie, une résistance pour limiter la charge de courant, un commutateur pour décharger l'énergie du condensateur à travers l'aliment et une chambre de traitement, ainsi que d'autres éléments (Maged *et al.*, 2012). La tension maximale à travers le condensateur est égale à la tension à travers le générateur. Un commutateur électrique (switch) est utilisé pour décharger de l'énergie (instantanément en millionième de seconde) stockée dans le condensateur à travers l'aliment contenu dans la chambre de traitement (Figure 1.18).

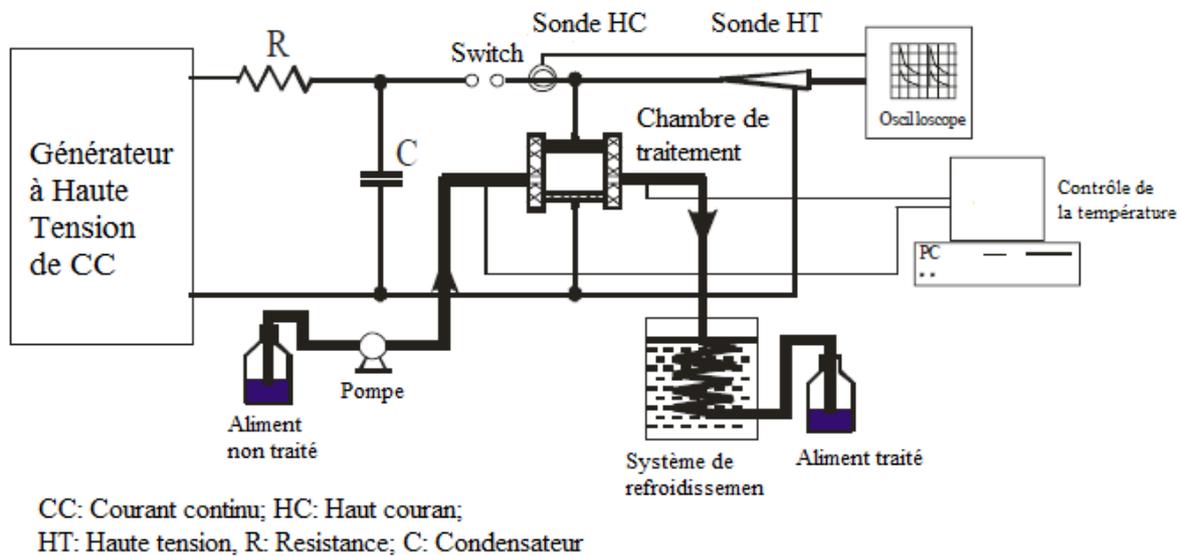


Figure 1.18 : Composants majeurs d'une installation de CEP (Amiali, 2005).

1.5.3.1 Générateur à haute tension

La source d'énergie, est un générateur de courant continu à haute tension, il convertit la tension d'une ligne d'alimentation de courant alternatif faible (220 V) en une haute tension de courant continu (Qin *et al.*, 2014). L'énergie provenant du générateur est stockée dans le condensateur et est déchargée à travers la chambre de traitement pour générer un champ électrique dans le produit traité.

En général, le générateur à haute tension est utilisé pour charger et stocker l'énergie dans le condensateur. Il fournit au système de CEP, des pulsations d'une intensité, d'une forme et d'une durée requises par l'opérateur (Qin *et al.*, 1998). Ce dernier utilise un réseau de formation de pulsations plus ou moins complexe constitué de plusieurs composants: une ou

plusieurs alimentations en courant continu, une résistance, une batterie de condensateurs formée par deux ou plusieurs unités connectées en parallèle, un ou plusieurs commutateurs et des inductances de mise en forme de pulsations (Maged *et al.*, 2012).

1.5.3.2 Condensateurs à haute puissance

Le principe de la production des puissances pulsées consiste à emmagasiner, lentement, de l'énergie électrique dans un condensateur ou une inductance de stockage et de la restituer à une charge en un temps très bref, à l'aide d'un commutateur (Touya, 2005) . La figure suivante illustre bien ce principe :

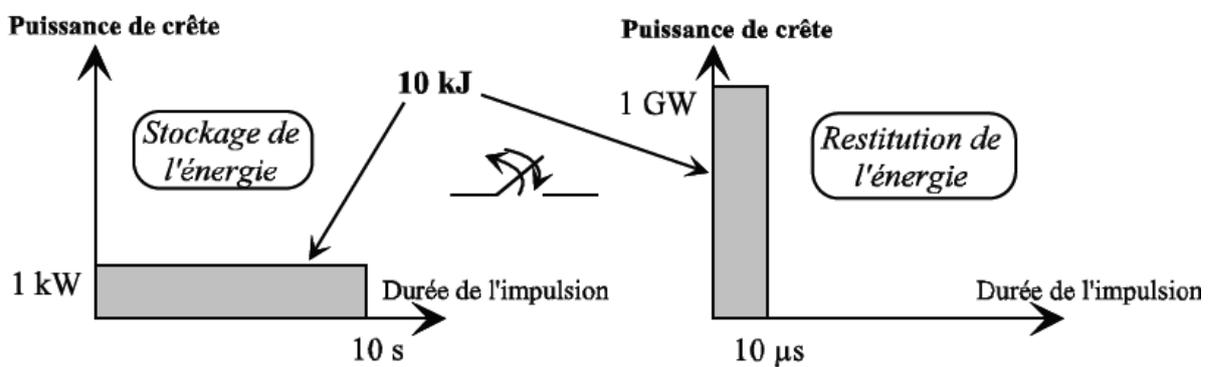


Figure 1.19 : Principe du condensateur (Touya, 2005).

Ainsi, par exemple, partant d'une source d'énergie électrique délivrant 1 kW, on peut emmagasiner pendant 10 secondes une énergie de 10 kJ dans des condensateurs ou des inductances de stockage. Si l'on sait restituer cette énergie en 10 µs, on délivrera, durant ce laps de temps, une puissance de 1GW (Touya, 2005).

a- Transfert d'énergie

L'énergie délivrée à un produit est fonction du rapport résistivité/conductivité, de la température et des caractéristiques de la pulsation (la forme d'onde, largeur du pic de voltage et le courant). Elle est donnée selon (Barbosa-Canovas *et al.*, 1999) par la formule suivante (Equation 1.6, 1.7 et 1.8):

$$W = \int P_{(t)} d(t) \tag{Equation 1.6}$$

On a également :

$$P_{(t)} = V_{(t)} \times I_{(t)} \tag{Equation 1.7}$$

Donc :

$$W = \int V_{(t)} \times I_{(t)} \times d_{(t)} \quad \text{Equation 1.8}$$

Où,

W est l'énergie (J),

I est le courant (A),

P est la puissance (W),

V est la tension de pulsation (V),

d est la durée de traitement (sec).

b- Energie stockée dans les condensateurs

L'énergie provenant d'une haute tension est stockée dans le condensateur d'une capacitance donnée puis déchargée vers le produit à traiter. La capacitance C_0 (F), de l'énergie de stockage est donnée par la formule suivante :

$$C_0 = \frac{\tau}{R} = \frac{\tau \sigma A}{d} \quad \text{Equation 1.9}$$

Où,

A : Surface de l'électrode (m^2)

R : Résistance (Ω)

d : Distance entre les deux électrodes (m)

σ : Conductivité électrique de l'aliment (Sm^{-1})

τ : Durée de la pulsation (sec)

L'énergie stockée dans le condensateur Q (Joule) est donnée par la formule suivante:

$$Q = \frac{1}{2} C_0 V^2 \quad \text{Equation 1.10}$$

Où,

V : Voltage de chargement (V) et C_0 est la capacitance (F).

Cette énergie peut être déchargée instantanément à un haut niveau de puissance

c- Densité d'énergie

La densité d'énergie peut être exprimée sous différentes formes, dépendant du type de générateur de pulsation. La densité d'énergie (Q_e , Joule/m³) d'un générateur qui délivre une pulsation de type exponentiel est donnée par l'équation suivante :

$$Q_e = \frac{V_0^2 C_0 n}{2v} = \frac{V_0^2 t}{2Rv} \quad \text{Equation 1.11}$$

Où,

V_0 est le voltage de chargement initial,

C_0 est la capacitance (F),

n est le nombre de pulsation,

t est le temps de traitement (sec),

R est la résistance de l'aliment (Ω),

v est le volume de la chambre de traitement (m³).

Selon Ho *et al.* (1995), le traitement par CEP pourrait être plus efficace sur le plan énergétique que le traitement thermique. Dans le traitement thermique, comme le traitement à court temps à haute température (HTST), l'énergie nécessaire pour chauffer 49,5 mL d'eau de 20 °C à 71,1 °C est de 12 kJ, tandis que l'énergie requise par le CEP pour traiter la même quantité de fluide est seulement 10,7 kJ.

1.5.3.3 Commutateur à fermeture

L'énergie emmagasinée dans les condensateurs est commutée à l'aide d'un commutateur ou d'un « Switch ». Suivant la nature du stockage, capacitif ou inductif, on utilise soit des commutateurs à fermeture (stockage capacitif), soit des commutateurs ouverture (stockage inductif) (Touya, 2005).

Du point de vue technologique, il existe un choix beaucoup plus important de commutateurs à fermeture (ex : les commutateurs à gaz, les commutateurs magnétiques et les commutateurs à diélectrique liquide) que de commutateurs à ouverture (les commutateurs à semi-conducteurs, les commutateurs à plasma). De plus, les commutateurs à fermeture sont beaucoup plus simples à réaliser, donc beaucoup plus fiables et bien moins chers, que ceux à ouverture (Touya, 2005).

Un commutateur à gaz (éclateur à air) est un dispositif électrique utilisé pour réaliser des courts-circuits ultrarapides par un arc électrique provoqué par l'ionisation d'un gaz. L'éclateur à air est constitué de deux électrodes, placées face à face, dans un milieu qui est l'air. Au-delà d'une certaine valeur de tension entre les bornes, donc d'un certain champ électrique entre les électrodes, un amorçage se produit et un courant s'établit entre les deux électrodes formant un arc électrique à travers le gaz qui sépare les électrodes. En général une des électrodes est reliée à une phase, et l'autre à la terre (Barbosa-Canovas *et al.*, 1999).

Durant ce travail, nous avons exclusivement utilisé un générateur à stockage capacitif associé à un commutateur à fermeture de type gaz spark.

1.5.3.4 Chambre de traitement

La chambre de traitement est l'élément fondamental d'une installation de CEP. Sa fonction majeure est de transférer le champ électrique au produit ou à l'aliment. Elle est composée de deux électrodes maintenues dans une position qui permet de former une enceinte englobant le produit (Qin *et al.*, 1998).

Plusieurs designs de chambre statique ou continue ont été suggérés. (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999). La chambre statique, la première à être conçue ne pouvait traiter qu'un petit volume à la fois. Elle n'était destinée que pour les applications expérimentales. Par contre, les chambres continues, permettent un traitement en continu, en accord avec les exigences d'une application industrielle.

Actuellement, 3 types de chambre prédominent (Figure 1.20) :

- Parallèles plates,
- Cofield,
- Coaxiale.

La principale limitation des chambres parallèles plates est la nature discontinue du procédé. A l'inverse, alors que les chambres cofield et coaxiales permettent un traitement continu mais les champs électriques n'y sont pas aussi homogènes que dans le cas de chambres parallèles (Go'ngora-Nieto *et al.*, 2002). Les électrodes de chambre, ainsi que les composants isolants, doivent être faits de matériaux inertes chimiquement inorganiques pour

éviter la contamination des aliments. En outre, les matériaux des chambres de traitement devraient être lavables et autoclavables (Huang et Wang, 2009).

La conception des chambres statiques destinées à la pasteurisation d'aliments liquides diffère selon la taille, la capacité de la chambre et la forme de l'électrode. Les électrodes circulaires à plaques parallèles offrent une répartition uniforme du champ électrique le long de l'écart d'axes et de la surface de l'électrode, mais créent un problème d'amélioration du champ aux bords des électrodes (Huang et Wang, 2009). Ce problème peut être évité en utilisant des électrodes de surface arrondie en contact avec la zone de traitement. Pour une opération de pasteurisation d'aliments liquides à grande échelle par CEP, on utilise des chambres continues.

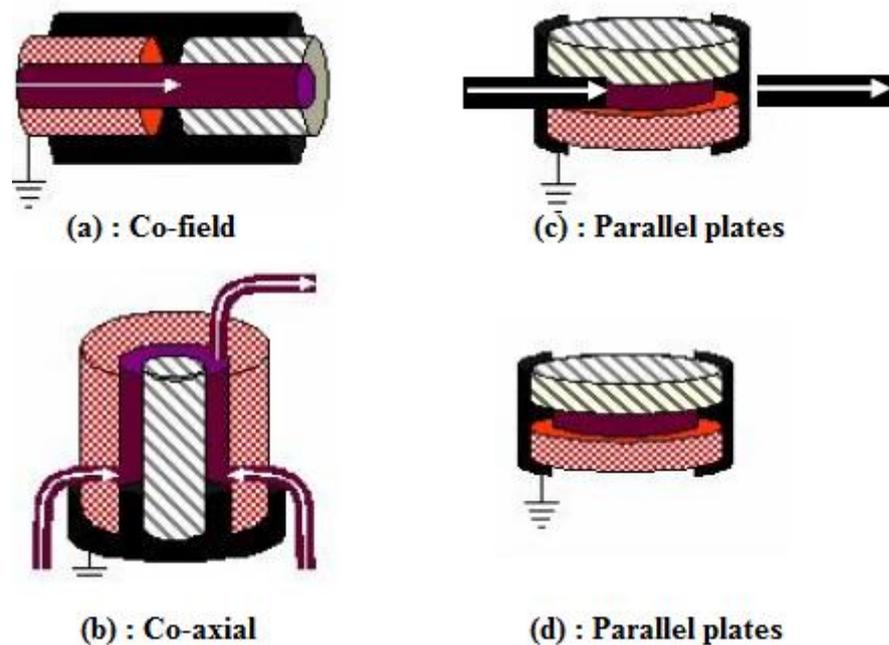


Figure 1.20 : Chambres de traitement continues (a), (b), (c) et Statique (d). (FDA, 2000).

1.5.3.5 Appareils de contrôle

En dehors de ces composants majeurs, certaines parties complémentaires sont également nécessaires. Un oscilloscope est utilisé pour observer la forme d'onde et relever les données des composantes nécessaires pour les analyses. Dans le cas de systèmes continus, une pompe est utilisée pour transporter les aliments à travers la chambre de traitement. Un système de refroidissement de chambre peut être utilisé pour diminuer l'effet de chauffage ohmique et contrôler la température des aliments pendant le traitement. Des sondes à haut

courant et à haute tension sont utilisées pour mesurer la tension et le courant délivrés dans la chambre.

1.5.4 Paramètres influençant l'efficacité du traitement

Les principaux facteurs qui affectent l'efficacité du CEP au cours de la transformation des aliments peuvent être regroupés en trois types :

- Facteurs technologiques liés au processus (intensité du champ électrique, type d'impulsion, durée du traitement et température de traitement) (Goñgora-Nieto *et al.*, 2002),
- Facteurs physico-chimiques du produit traité (pH, force ionique, conductivité électrique et constituants des aliments). (Amiali, 2005)
- Facteurs biologiques (type, taille des cellules et leurs concentrations, largeur de la membrane et stade de croissance des microorganismes).

1.5.4.1 Facteurs technologiques

a- Intensité du champ électrique

L'intensité du champ électrique est l'un des principaux facteurs qui influencent l'inactivation microbienne et l'extraction. D'après Lebovka *et al.* (2002) l'augmentation de l'intensité des CEP favorise l'électroporation des cellules.

Selon la théorie de l'électroporation (voir principe du CEP), l'intensité du champ électrique doit atteindre une valeur critique pour perméabiliser la membrane cellulaire. Elle est définie comme la différence de potentiel électrique V entre deux points donnés de l'espace, divisé par la distance d entre eux (équation 2.12) :

$$E = \frac{V}{d} \quad \text{Equation 1.12}$$

Plusieurs études ont porté sur l'effet de l'intensité des CEP sur l'inactivation microbienne. Hulsheger *et al.* (1983) ont proposé une formule qui met en relation le rapport de survivants en microorganismes ($S = N/N_0$) et l'intensité de CEP (E), elle est définie par l'équation suivante:

$$\ln(S) = -b_E (E - E_c)$$

Equation 1.13

Où,

N et N_0 étant respectivement le nombre de bactéries après et avant traitement,

b_E est le coefficient de régression (cm/kV),

E est le champ électrique appliqué,

E_c est le champ électrique critique obtenu après extrapolation de la valeur de E à 100 % de survivants.

Une étude portant sur l'effet des champs électriques pulsés sur la congélation des produits végétaux réalisée par Ben ammar (2011) a également prouvé l'importance de l'intensité de CEP sur la perméabilisation des cellules.

Selon Aguilo'-Aguayo *et al.*, (2008) ; Giner-Seguí *et al.*, (2009), l'efficacité de l'inactivation enzymatique par le CEP est plus élevée lorsque l'intensité du champ électrique et le temps de traitement augmentent.

b- Type de pulsation

Un aspect important qui différencie le traitement par CEP des autres technologies est que celui-ci est délivré par pulsation. Il existe plusieurs types de pulsation (Figure 1.21). Celles habituellement utilisées dans les traitements par CEP sont de type exponentiel ou carré (Jeyamkondan *et al.*, 1999). Les pulsations varient entre les formes carrées et exponentielles (monopolaire, bipolaire). En ce qui concerne la polarisation par impulsion, les pulsations bipolaires sont plus efficaces que les pulsations monopolaires concernant l'inhibition des microorganismes (Elez-Martínez *et al.*, 2004, 2005, 2007).

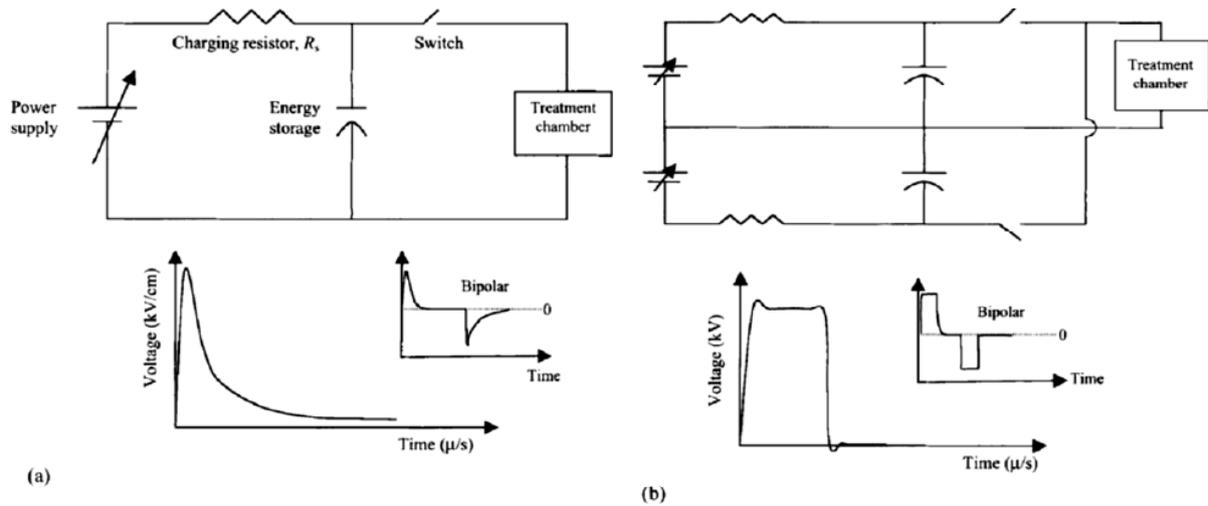


Figure 1.21 : Les formes d'onde d'impulsion couramment utilisées et les circuits électriques génériques: (a) onde exponentielle monopolaire et bipolaire ; (b) onde carrée monopolaire et bipolaire (Maged *et al.*, 2012).

Des études comparatives portant sur l'efficacité des pulsations de type exponentiel et carré sur l'inactivation microbienne, ont indiqué que les deux formes agissent avec le même impact. Néanmoins, les pulsations d'onde carrée économisent plus d'énergie et nécessitent moins d'effort de refroidissement (De Haan et Willcock, 2002 ; Kotnik *et al.*, 2003).

c- Durée et fréquence de traitement

L'inactivation des microorganismes par le CEP est fonction du nombre de pulsations (Sale et Hamilton, 1967). Toutefois, l'effet de la durée et de la fréquence de traitement par CEP sur l'inactivation des microorganismes n'est pas encore complètement élucidé. Dans le cas de raisins traités par CEP, Grimi *et al.*, (2009) indiquent que les pulsations longues (1000 μ s) favorisent la perméabilisation cellulaire. Alors que d'autres auteurs stipulent que plusieurs pulsations courtes sont plus efficaces (Elez-Martínez *et al.*, 2004).

Le temps de traitement du CEP est calculé en multipliant le nombre de pulsations par la durée d'impulsion. Une augmentation de l'une de ces variables augmente l'inactivation microbienne (Sale et Hamilton, 1967).

Selon El-Belghiti (2008); Grimi *et al.*, (2009) l'augmentation du nombre de pulsations et, par conséquent, la hausse du temps total de traitement par CEP favorise l'extraction des bio molécules, du moins, jusqu'à une durée de traitement optimale au-delà de laquelle le taux

d'extraction se stabilise. Ainsi, les durées de traitements supérieures à celle de la durée optimale contribuent seulement à l'augmentation des coûts énergétiques.

d- Température de traitement

La température a un effet considérable sur l'efficacité du traitement par champ électrique et la perméabilisation cellulaire. Selon Lindgren *et al.*, (2002) une augmentation de la température de traitement par CEP conduit à des niveaux d'inactivation microbienne plus élevés.

La température du milieu dans lequel les cellules bactériennes sont en suspension a une influence significative dans la détermination de la fluidité de la membrane. La bicouche lipidique des membranes cellulaires peut présenter différentes phases (Zbinden *et al.*, 2013).

À basses températures, un état de gel bien ordonné se produit, les chaînes grasses latérales adoptent une conformation étendue et se pelotonnent entre elles avec un maximum de liaisons Van der Waals. Les phospholipides sont ainsi supposés être étroitement emballés dans une "structure de gel" rigide. A des températures plus élevées, les groupes acyle gras sont moins ordonnés et l'épaisseur de la membrane diminue d'environ 15 %. Les phospholipides sont moins ordonnés et la membrane présente une structure "cristalline liquide". Par conséquent, la transition de phase des phospholipides qui se produit avec des changements de température (la température de transition de phase est inférieure d'environ 10 °C à la température de culture) peut affecter la stabilité physique de la membrane cellulaire (Russell, 2002).

Les traitements de CEP à température modérée (50 à 60 °C) ont montré un effet synergique sur l'inactivation des microorganismes (Rastogi, 2003). A basse température, une intensité de champ électrique plus élevée est nécessaire pour induire une rupture de membrane. L'effet de l'augmentation de l'efficacité de l'application du CEP à des températures élevées a été rapporté dans plusieurs études (Li *et al.*, 2005 ; Toepfl *et al.* 2007).

1.5.4.2 Facteurs physico-chimiques du milieu

L'influence de la composition du milieu sur l'inactivation microbienne par le CEP n'est pas bien connue. L'efficacité du traitement par champ électrique (CEP), sur un produit

liquide, dépend des propriétés physiques du produit (pH, force ionique...), y compris la conductivité électrique, la densité et la viscosité (Ruhlman *et al.*, 2001).

a- pH et force ionique

Des facteurs environnementaux semblent aussi jouer un rôle important: la force ionique du milieu, le pH, l'activité de l'eau, la viscosité, la présence de particules solides ou de gouttes d'huile. En effet, une faible force ionique du milieu pourrait augmenter l'efficacité du traitement (Zbinden *et al.*, 2013).

Certains chercheurs ont indiqué que l'effet de l'inactivation du CEP sur les enzymes est affecté par le pH des milieux. La pepsine est plus stable au CEP à un pH optimal de 2,0 (Yang *et al.*, 2004). Aguilo'-Aguayo *et al.*, (2009) ont suggéré un effet interactif entre les paramètres de traitement du CEP et le pH de l'aliment sur l'inactivation des enzymes pectolytiques.

b- Conductivité électrique

D'après Ngadi *et al.*, (2010), la conductivité électrique (CE) d'un milieu, définie comme étant la capacité à conduire le courant électrique, est d'une importance capitale dans le traitement par CEP. La conductivité électrique du milieu σ ($S m^{-1}$) est mesurée par l'équation 2.14 :

$$\sigma = \frac{d}{R \times A} = \frac{1}{\rho} \quad \text{Equation 1.14}$$

Où :

R est la résistance du milieu (Ω),

A est l'aire de la surface d'électrode (m^2),

d est l'écart entre les électrodes (m),

ρ est la résistivité ($\Omega\cdot m$).

Selon Turk (2010), le potentiel transmembranaire induit peut être influencé par le rapport σ_e/σ_c (σ_e et σ_c correspondent respectivement aux conductivités du milieu extracellulaire et du cytoplasme). Un tissu biologique non endommagé est habituellement un milieu à faible conductivité, donc $\sigma_e / \sigma_c \ll 1$. Mais, on peut supposer que la valeur σ_e / σ_c

augmente avec la dénaturation induite par le traitement CEP, et que $\sigma_e / \sigma_c \approx 1$ dans le cas d'un tissu hautement dénaturé.

La conductivité électrique d'un fluide dépend également de la température de traitement elle est définie par l'équation 2.15:

$$\sigma = \alpha T + \beta \quad \text{Equation 1.15}$$

Où α et β sont des constantes qui dépendent de la composition et la concentration du milieu. L'augmentation de la température du produit augmente la conductivité électrique.

Les travaux de Amiali *et al.* (2006), réalisés sur des œufs liquides et des jus de fruits exposés à un CEP, ont montré que la CE des échantillons dépend fortement de la température. La connaissance des relations entre CE- température permet de déterminer la variation de température (ΔT) lors d'un traitement assurant ainsi un meilleur contrôle du processus de traitement des denrées alimentaires.

Dans des conditions de température constante, les aliments à haute conductivité électrique (faible résistivité) présentent des petits champs électriques à travers la chambre de traitement et sont par conséquent difficiles à traiter avec le processus CEP. Une augmentation de la conductivité électrique augmente la force ionique de l'aliment, ce qui entraîne une diminution du taux d'inactivation. Par ailleurs, une augmentation de la différence entre la conductivité électrique du milieu et du cytoplasme microbien affaiblit la structure de la membrane en raison d'une augmentation du flux de la substance ionique à travers la membrane (Jayaram *et al.*, 1992).

Les travaux réalisés par Ruhlman *et al.*, (2001), ont montré qu'une augmentation de la température conduit à une augmentation de la conductivité. Par contre, elle conduit à une diminution de la densité et de la viscosité.

Alvarez *et al.* (2000) ont étudié l'influence de la conductivité du milieu de traitement sur l'inactivation de *Salmonella. senftenberg* par CEP. Les auteurs ont constaté que l'intensité du champ électrique obtenue dans la chambre de traitement dépendait de la conductivité du milieu. Pour une même intensité du champ électrique, la conductivité n'influence pas l'inactivation de *S. senftenberg*.

Un phénomène particulier peut se produire, lorsque l'on soumet un aliment à un champ électrique pulsé : c'est le claquage diélectrique. Il résulte de la brutale modification des propriétés conductrices d'un matériau, sous l'effet d'un champ électrique intense et se matérialise sous la forme d'une étincelle. Il est, là aussi, nécessaire de contrôler ce phénomène (Petit *et al.*, 2002).

c- Composition du milieu

Les aliments soumis à un champ électrique ont des caractéristiques particulières qui doivent être prises en compte afin de développer un procédé de traitement spécifique à ces aliments. Beaucoup d'aliments ont une structure hétérogène, de sorte que leurs caractéristiques électriques varient. De ce fait leur modélisation en tant que composant électrique peut présenter des difficultés. La conception des installations à champs électriques pulsés doit prendre en compte ces caractéristiques électriques, selon l'usage pour lequel elles sont destinées.

Ainsi, l'augmentation de la concentration en protéines et lipides permet une plus grande résistance microbienne. A titre d'exemple, les protéines contenues dans le lait absorberaient les radicaux libres ainsi que les ions nécessaires à la destruction des cellules. Les lipides contenus dans du lait pourraient quant à eux modifier la conductivité du milieu, et protégeant ainsi les microorganismes des CEP (Barsotti et Cheftel, 1999).

L'influence de la composition du milieu sur l'efficacité de l'inactivation des enzymes par CEP n'est pas encore claire. Certains auteurs ont indiqué que la teneur en matières grasses du milieu affecte l'inactivation des enzymes par le CEP (Bendicho *et al.*, 2003). Aguilo'-Aguayo *et al.*, (2009) ont rapporté qu'une augmentation de la concentration en solides solubles des aliments a conduit à des niveaux plus élevés d'inactivation des enzymes pectolytiques traitées au CEP. Selon Barsotti *et al.*, (1998), la résistivité des aliments est très variable et s'étend de $0,4 \Omega.m^{-1}$, pour les aliments à forte teneur en sels et en eau, à plus de $100 \Omega.m^{-1}$, pour les matières grasses et les huiles.

1.5.4.3 Facteurs biologiques

a- Type et taille de la cellule

Grahl et Märkl (1996) ont constaté que la valeur critique du champ électrique (E_r) permettant la rupture des membranes est fonction de la taille des cellules. Ils ont attribué ce phénomène au potentiel transmembranaire de la cellule, qui est proportionnel à la taille de la cellule. Précédemment, Hülshager *et al.* (1983) avaient remarqué que le champ électrique critique pour les bactéries Gram négatives était plus faible que celui des bactéries Gram positives, ce qui peut s'expliquer par la plus faible résistance des premiers.

La valeur du potentiel transmembranaire $V_{(t)}$ est proportionnelle au rayon r de la cellule voir (Equation 1.4). La plus forte baisse du potentiel se produit aux pôles de la cellule, et diminue à 0 pour $\theta = \pm \pi/2$. Ainsi, les grandes cellules (cellules végétales) sont endommagées avant les petites cellules (cellules microbiennes) et l'endommagement est maximal au niveau des pôles cellulaires (Turk, 2010). L'intensité du champ électrique concentré à la membrane (E_m) est fonction de la largeur de la membrane h_m et du rayon R_c d'une cellule (voir ultérieurement l'équation 2.5).

En plus de la taille des cellules, la géométrie cellulaire revet une grande importance en permettant d'appliquer une intensité de traitement efficace afin d'induire un potentiel transmembranaire suffisant pour une électropéabilisation (Jaeger *et al.*, 2008).

L'orientation des cellules par rapport aux lignes des champs électriques est également un paramètre à prendre en compte lors du traitement des tissus par CEP. En effet pour que le traitement des produits végétaux soit efficace (toutes les cellules perméabilisées) il est indispensable de définir les paramètres du traitement en considérant que toutes les cellules sont traitées dans le sens perpendiculaire aux lignes des champs et ainsi augmenter l'intensité du traitement ou sa durée (Ben ammar, 2011). Selon le même auteur, les résultats obtenus par l'effet du CEP sur des fruits et légumes différents (pomme de terre, oignon, épinard, haricot vert, pomme, orange... etc.) révèlent une sensibilité variable d'un produit à un autre. Cette différence entre les produits peut être expliquée par la nature du tissu, sa composition ainsi que la structure de l'échantillon traité.

Concernant les facteurs traitant de la résistance des microorganismes envers le traitement par CEP, les spores bactériennes sont généralement les structures les plus résistantes (Amilai *et al.*, 2005).

b- Concentration et stade de croissance

L'efficacité des CEP dépend de l'état physiologique des cellules, de leur phase de croissance et de leur concentration. En effet, les cellules en phase de croissance semblent être les formes les plus sensibles aux CEP (Elez-Martínez *et al.*, 2012). Egalement, l'inactivation d'*E. coli* dans un aliment par le CEP ($E=70$ kV/cm, 16 pulsations d'une durée de $2 \mu\text{s}$) n'est pas efficace lorsque sa concentration varie de 10^3 à 10^8 UFC/mL (Zhang *et al.*, 1995).

Les propriétés de la cellule et de la membrane plasmique varient en fonction des différents stades de croissance des microorganismes. Pendant la phase exponentielle de croissance les cellules sont plus sensibles que pendant la phase stationnaire et de déclin (Pothakamury *et al.*, 1996). La phase de croissance est caractérisée par un nombre élevé de cellules en état de prolifération. La superficie entre la cellule-mère et la cellule-fille est tellement négligeable que la membrane cellulaire devient sensible et par conséquent, plus susceptible au traitement par CEP. Ainsi, durant cette phase de croissance, la membrane cellulaire devient plus tendre et acquière une grande sensibilité au CEP.

Alvarez *et al.* (2000) ont étudié l'influence de l'âge cellulaire sur la résistance au CEP en traitant *Salmonella senftenberg* à différents stades de croissance avec 200 pulsations de $2 \mu\text{s}$ chacune et une intensité de champ électrique de 19 kV cm^{-1} . Ils ont constaté qu'entre la phase stationnaire et le début de la phase exponentielle de croissance, les cellules étaient plus résistantes au CEP que les cellules en phase exponentielle de croissance.

1.5.5 Consommation énergétique et rentabilité du CEP

Pour évaluer les avantages et les inconvénients des différentes technologies, les paramètres de consommation énergétique sont essentiels à déterminer. L'apport d'énergie électrique et l'intensité du champ doivent être choisis en fonction des différentes applications et les organismes ciblés. De plus, l'efficacité des différentes techniques doit être soigneusement étudiée au regard des risques liés à l'utilisation du champ électrique pulsé.

Selon Jeager *et al.*, (2008), le niveau désiré de perméabilisation cellulaire peut aller de quelques pour cent de cellules perméabilisées de manière réversible (pour l'induction de la réponse au stress) à plus de 90 % pour l'amélioration du transfert de masse dans le tissu végétal et jusqu'à 8 cycles log- d'inactivation pour une décontamination microbienne sûre. L'intensité du champ influence de prime abord les coûts d'investissement car elle dépend principalement de l'équipement d'alimentation haute tension. La typologie et les composantes du modulateur d'impulsions, le fournisseur ainsi que les paramètres de traitement et de produit conduisent à un large éventail de coûts d'investissement obtenus. Les besoins en énergie pour la désintégration cellulaire peuvent être estimés entre 1 et 3 kWh/t et pour la conservation des aliments liquides dans la plage de 30 à 50 kWh/t.

L'apport d'énergie détermine principalement les coûts d'exploitation car elle nécessite une certaine consommation d'énergie électrique. Selon Barbosa-Canovas *et al.*, (1999); Vorobiev et Lebovka, (2008) la faible consommation énergétique des traitements électriques augmente leur attractivité en agroalimentaire pour améliorer les procédés de séchage, de pressage, d'extraction et de déshydratation osmotique. Selon la source du conseil national de l'alimentation (CNA, 2009), la rapidité de traitement couplée à une faible consommation énergétique (estimée à 10 % de celle d'un procédé thermique équivalent) représente un atout majeur.

Le tableau 1.6, montre les principaux appareils de CEP destinés aux traitements des aliments ainsi que leurs caractéristiques et leurs coûts approximatifs.

Tableau 1.6 : Appareils de CEP pour le traitement d'aliments, recensement réalisé par (Barsotti *et al.*, 1998).

| Caractéristiques | Pure Pulse Technologie (USA) | | Thomson CSF/AGIR Bordeaux | Ohio State University | CENTRAL/Universit é de Montpellier II |
|--|---|--|---|---|---|
| | Appareil industriel | Appareil de laboratoire | | | |
| Puissance (kW) | 50-200 | 0,28 | 25 | 2 | 2,5 |
| Chambre de traitement | Continue (1 ou 2 chambres en série pour fluides alimentaires pompables) | Continue (pour fluides alimentaires pompables) | 2 chambres continues en série (pour fluides alimentaires pompables) | 2 à 8 chambres (pour fluides alimentaires pompables) | Discontinue (pour aliments solides ou liquides) |
| Volume chambre (cm ³) | Variable | 1 | Faible | 50 à 200 | 5 à 20 |
| Débit de fluide (l.h ⁻¹) | 1000-6000 | 10 | 100 | 1.8-28 | - |
| Tension max. aux électrodes (kV) | 20 | 12 | 20 | 10 | 20 |
| Forme des électrodes (acier inox.) | Verticales coaxiales ou colinéaires | Colinéaires | Diverses | NI | Disques plats horizontaux parallèles 5-20 |
| Distance interélectrodes (mm) | 4-10 | 3 | 5 | 2-3 | |
| Champ électrique max. (kV.cm ⁻¹) | 45 | 35 | 35 | 50 | 40 |
| Forme des impulsions | Carrée monopolaire | Carrée monopolaire | Carrée monopolaire | Carrée monopolaire ou bipolaire 0,5-10 | A décroissance exponentielle |
| Durée d'une impulsion (µs) | 1-5 | 1-5 | 1-20 | | 0,8-5 |
| Vitesse de montée en tension aux électrodes (ns) | NI" | NI | 500-5000 | NI | 100-200 |
| Fréquence max. de répétition (Hz) | 100 | 500-1000 | 80 | 3000 | 100 |
| Circuit de refroidissement | Oui | NI | Oui entre les deux cellules | Oui | Par contact avec plaque de cuivre 50-600 |
| Résistivité des aliments (ohm. Cm) | NI | 35-400 | 125-250 | >100 | |
| Prix (kF) | >3000 | >600 | 3000 | 240-300 | 600 |
| | selon puissance, avec système de pompage et de refroidissement des fluides alimentaires | sans chambre de traitement, ni pompe ni appareil de mesure | avec système de pompage et de refroidissement des fluides alimentaires | sans oscilloscope | avec oscilloscope et sonde de température à fibre optique |

Selon Toepfl *et al.* (2007), l'investissement requis pour l'installation d'un générateur de pulsations de 30 kW basé sur une typologie à l'état solide fournissant des pulsations bipolaires rectangulaires avec une tension de crête allant jusqu'à 30 kV et des fréquences de répétition jusqu'à 1000 Hz est actuellement estimé à 125 000 euros. Dans ce cas, la capacité de traitement peut aller jusqu'à 10 t/h pour la désintégration cellulaire ou 1 t/h pour la décontamination des milieux liquides.

Une étude réalisée par Turk (2010), portant sur l'introduction des champs électriques pulsés à l'échelle industrielle pour la transformation de la pomme en jus a montré que la consommation énergétique du traitement électrique (mesurée sur le secteur = 3,5 Wh/kg râpure) est inférieure à l'économie d'énergie réalisée lors du séchage du marc (12,1 Wh/kg râpure), prouvant que l'investissement dans un pilote de CEP à l'échelle industrielle est rentable. Selon l'auteur, le délai de récupération de son investissement est inférieur à deux ans et qu'un investissement qui mérite d'être entrepris correspond à un projet dont le seuil de rentabilité est atteint en moins de trois ans.

Pour conclure, l'application du CEP dans la transformation des aliments constitue un bon potentiel en raison de sa faible consommation d'énergie pour remplacer les différentes techniques classiques de désintégration cellulaire.

1.6 Applications du champ électrique sur les microalgues

Actuellement l'humanité, en constante augmentation, a de plus en plus besoin d'énergie, d'aliments et de médicaments, ce qui entraîne une forte demande de combustibles fossiles, de produits chimiques anthropiques, de terres et de stocks d'animaux. Tous ces facteurs contribuent à une augmentation rapide de la pollution couplée à une diminution de la faune et la flore. Pour tenter de résoudre ce double problème, la dernière décennie a sensibilisé les gouvernements en attirant leur attention sur la rareté des ressources en eau et plus particulièrement sur l'intérêt des microalgues (Richmond, 2004).

Durant de nombreux siècles, les microalgues ont représenté une importante source de nourriture (voir partie spiruline). Durant ces dernières décennies, le recours à l'utilisation des microalgues se justifiait par un potentiel beaucoup plus élevé dans le domaine de la biotechnologie. Depuis lors, l'industrie des microalgues s'est multipliée dans différentes applications à savoir l'alimentation, l'aquaculture, le cosmétique, le bio fuel et bien d'autres.

L'application du CEP comme procédé de stérilisation des denrées alimentaires et d'extraction du contenu interne des cellules végétales a été largement étudiée et n'est plus considérée comme une technique nouvelle. En effet il a été prouvé que le traitement par CEP est efficace pour la destruction des microorganismes pathogènes provoquant l'altération des différents aliments liquides mais intervenant dans l'amélioration de l'extraction du contenu intracellulaire. Aujourd'hui, ces applications ont quitté le laboratoire et sont passées à l'échelle industrielle (Singh et Kumar, 2011).

En revanche, ces dernières années, son utilisation sur les microalgues et pour divers objectifs a fait l'objet de plusieurs études. C'est ce thème qui sera traité dans la partie suivante.

1.6.1 Extraction des composés cellulaires

L'électroextraction constitue une approche prometteuse pour la biotechnologie, y compris les technologies utilisant des microalgues. Ces microorganismes photosynthétiques sont très intéressants pour la production de composés de grande valeur.

1.6.1.1 Extraction des pigments

Qin *et al.* (2014) ont étudié l'inactivation de *Spirulina* en utilisant la technique du CEP. Les résultats indiquent que la Spiruline peut être lysée à des intensités de champ de 33,3 kV/cm et des pulsations de 100 à 500. L'augmentation de l'intensité de champ jusqu'à 66,7 kV/cm diminuera le nombre de pulsations à 50. Ainsi, le nombre de pulsations est inversement proportionnel à la force du champ électrique. *Spirulina* possède une grande taille (\approx de 0,5 mm) comparée à celle de *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp. et *Isocrysis* sp.

Les travaux de Luengo *et al.* (2014) portant sur l'extraction des pigments à partir de *Chlorella vulgaris* ont montré que le traitement par CEP de 10 kV/cm avec 50 pulsations d'une durée de 3 μ s a causé un état d'électroporation réversible chez *C. vulgaris*. Par contre, en augmentant l'intensité du champ de 20 à 25 kV/cm et en réduisant le nombre de pulsations à 5, pour la même durée, provoquait un état d'électroporation irréversible. La distance entre les électrodes utilisée dans leur travail était de 2,5 mm.

D'autres travaux réalisés par Luengo *et al.* (2015) ont montré que la température de traitement a un effet positif sur l'extraction des lutéines assistée par champ électrique pulsé à partir de *C. vulgaris*. Ainsi, un traitement par CEP à une température de 10 °C, une intensité de 25 kV/cm et une durée de 100 μ s a permis une électroporation totale des cellules de *C. vulgaris*. En conservant la même intensité mais en augmentant la température de traitement (passant de 10 à 40 °C) la teneur des lutéines est passée de 400 à 700 μ g/g de MS.

1.6.1.2 Extraction des nutriments

Selon Coustets *et al.*, (2014), les méthodes classiques utilisées pour des traitements à grande échelle tels que des extractions mécaniques ou chimiques, affectent l'intégrité de la protéine cytosolique entraînant la libération des protéases contenues dans les vacuoles. Des

travaux antérieurs à celui-ci, sur les processus d'écoulement électroextraction entrepris sur les levures, ont prouvé que la technologie du champ électrique pulsé permet de préserver l'intégrité des protéines cytosoliques libérées, en n'altérant pas les membranes des vacuoles. Sur la base de ces connaissances, les chercheurs ont développé un nouveau protocole afin d'extraire par le CEP, les protéines cytoplasmiques totales des microalgues (*Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris* et *Haematococcus pluvialis*).

Grimi *et al.*, (2014) ont étudié l'extraction sélective des composés intracellulaires d'une microalgue *Nannochloropsis sp.*, en utilisant différentes méthodes de désintégration des cellules (incluant le CEP). Ils ont trouvé qu'un traitement à 20 kV/cm d'intensité et d'une durée de 1 – 4 μ s, constituait un moyen efficace pour l'extraction des molécules de faible poids moléculaire et les protéines hydrosolubles, mais ne permettait pas d'extraire les pigments tels que les chlorophylles et les caroténoïdes.

Une étude réalisée par Parniakov *et al.*, (2015 b) a montré l'efficacité du traitement par CEP pour l'extraction des composés intracellulaires à savoir les pigments, les protéines, les carbohydrates et les composés phénoliques à partir de *Nannochloropsis*. Ils ont également étudié l'effet du pH sur l'efficacité d'un traitement par CEP. Les chercheurs ont prouvé qu'un meilleur rendement de cette application du CEP s'obtenait dans un milieu à pH = 8,5. Bien plus, en milieu basique (pH = 11). Il s'agit d'une extraction sélective des différents composants intracellulaires.

1.6.2 Contrôle des contaminants dans les cultures des microalgues

Rares sont les informations concernant l'utilisation des champs électriques pulsés dans le contrôle des contaminants des cultures de microalgues. Néanmoins, le CEP semble approprié pour être mis en œuvre à l'échelle industrielle sachant que ce procédé agit sélectivement sur divers organismes en fonction de leur taille et de leurs propriétés membranaires. Les travaux de Rego *et al.*, (2015) ont montré que le CEP peut être utilisé de manière sélective pour influencer les contaminants et non pas les microalgues dans la production. Une culture dans un bio-réacteur industriel de microalgues contaminée a été traitée par CEP pendant 6 heures avec une moyenne de 900 V/cm et une durée de 65 μ s avec une fréquence de 50 Hz. Les résultats montrent une réduction de la population active de protozoaires de 87 % après 6 heures de traitement et 100 % après quelques jours de régime de culture normal. Parallèlement, le taux de croissance des microalgues n'a pas été affecté.

1.6.3 Augmentation de la croissance des algues par champ électrique pulsé ultracourt

En raison de leur capacité à accumuler des quantités considérables de triglycérides, les microalgues sont considérées comme la biomasse la plus prometteuse pour la production de bio fuel.

Une étude a été réalisée par Gusbeth *et al.*, (2013) sur l'application d'un traitement par CEP sur deux types de microalgues (*Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella vulgaris*), dans le but de stimuler leur croissance et d'augmenter les rendements de culture afin de réduire les coûts de production de biomasse. Les résultats ont montré que dans le cas de *C. vulgaris*, le traitement par CEP de 30 minutes avec une dose non létale (40 kV/cm et une durée de 25 nano-second) pendant la phase exponentielle de croissance a conduit à une augmentation du rendement en biomasse de 10 à 20 %. Cette augmentation était significative vers la fin de la culture après 5 jours.

D'autre part, Qin *et al.* (2014) ont réalisé une étude cette fois-ci dans le but de confirmer l'efficacité du traitement par CEP et d'évaluer les dommages structurels potentiels causés à la microalgue *Spirulina*. Les résultats ont montré que la croissance de la microalgue peut être arrêtée après une application d'un traitement de 100 et 500 pulsations d'une durée d'une 1 μ s à 33,3 kV/cm ou 50 pulsations à 66,7 kV/cm.

1.6.4 Production de biocarburants à partir des microalgues

L'extraction des lipides à partir de microalgues par le CEP a suscité une attention particulière au cours de ces dernières années. Plusieurs travaux ont porté sur l'application de la technologie des champs électriques pulsés comme méthode potentielle pour extraire les lipides des microalgues (Lee *et al.*, 2012; Zbinden *et al.*, 2013 ; Eing *et al.*, 2013; Lai *et al* 2014 ; Flisar *et al.*, 2014 ; Daghbir *et al.*, 2014 ; Joannes *et al.*, 2015). De nombreuses espèces de microalgues telles que *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Auxenochlorella protothecoides*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Isocrysis* sp. et *Synechocystis* PCC 6803 ont été utilisées dans les différentes études.

Le traitement par CEP associé à une extraction classique, tel qu'une extraction par solvant, est important pour améliorer l'efficacité de l'extraction des lipides et d'autres composants intracellulaires précieux à partir des microalgues.

Le tableau (1.7), montre les avantages et les limites de l'utilisation du CEP comme méthode d'extraction des lipides à partir des microalgues.

Tableau 1.7 : Avantages et limites de l'extraction des lipides des microalgues par CEP (Joannes *et al.*, 2015).

| Avantages | Limites |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • CEP seul moyen d'extraction: <ol style="list-style-type: none"> 1. Ne nécessite ni une déshydratation ni séchage du produit traité, réduisent ainsi le coût. 2. Aucun ajout de produits chimiques, par conséquent, réduction de coût opérationnel. 3. Aucun chauffage (équipement non thermique), donc, utiliser moins d'énergie. 4. Convient pour traiter les microalgues humides ou sèches. 5. N'affecte pas la qualité du produit. 6. Moins de temps (temps de traitement de l'ordre de microseconde ou seconde). 7. Grande évolutivité. <ul style="list-style-type: none"> • CEP comme prétraitement: <ol style="list-style-type: none"> 1. Grande combinaison avec le solvant d'extraction et augmentent l'efficacité d'extraction des lipides. 2. Avec le traitement par CEP, la quantité du solvant peut être réduite. | <ol style="list-style-type: none"> 1. La rupture diélectrique peut être affectée par l'existence de bulles d'air dans la chambre de traitement, ce qui rend le traitement par CEP moins uniforme. 2. la destruction des membranes cellulaires peut être réversible ou irréversible pendant le mécanisme d'électroporation en fonction de l'intensité du champ électrique appliquée. 3. L'efficacité du CEP dépend de l'intensité du champ électrique et de l'écart entre électrodes. Pour une production à grande échelle, le débit de production dépend du diamètre du tuyau, donc une intensité de champ plus élevée est nécessaire pour maintenir la même quantité de distribution. |

2.1 Résumé

L'algue bleue vert *Arthrospira platensis* communément appelée spiruline est largement connue dans le domaine nutritionnel et thérapeutique et ce en raison de sa richesse en éléments nutritifs (principalement les protéines) ainsi qu'une large gamme de composés bioactifs à propriétés fonctionnelles (oméga 6, phycobiliprotéines). Dans le but d'identifier et de caractériser de nouvelles souches plus riches en nutriments et composés bioactifs, une analyse comparée de la composition biochimique de différentes souches provenant de trois pays (Algérie, Tchad et États-Unis d'Amérique) a été réalisée. Les résultats obtenus font ressortir une différence notable de leur composition. La spiruline HSP (USA) présente les teneurs les plus élevées en lipides, protéines, phycocyanine et chlorophylles *a* comparé aux autres souches. La souche Algérienne (HTam) est très riche en caroténoïdes (5,50 mg/g). Pour toutes les souches, le principal acide gras présent est l'acide palmitique pouvant atteindre une concentration de 71,15 % chez la spiruline du Tchad. Toutes les souches de *Spirulina* testées contiennent de grandes quantités d'acides gras ω -6 (24% en moyenne), exception chez la spiruline du Tchad, qui n'en présente que 10,59 %. Toutes les souches de *Spirulina* étudiées sont riches en polyphénols avec une valeur plus élevée (67,52 mg GAE/g) observée dans la souche algérienne HTam. Les souches HSP des États-Unis et HTam de l'Algérie, cultivées en milieu contrôlé, ont plus de potentiel à être utilisées dans les aliments fonctionnels et dans le nutraceutiques, car très riches en composés bioactifs.

Mots clés : *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), composition biochimique, composés phytochimiques, phycobiliprotéines.

2.2 Introduction

Arthrospira platensis (nom commercial 'Spirulina'), appartenant au phylum des Cyanobactéries est une microalgue filamenteuse et multicellulaire de couleur bleu-vert. Grâce à sa particularité phototrophique, elle convertit la lumière du soleil, l'eau et le dioxyde de carbone en biomasse algale riche en éléments nutritifs. C'est une source importante de nutriments tels que les protéines, les minéraux, les hydrates de carbone et de nombreux phytopigments qui peuvent être utilisés comme compléments alimentaires. En raison de sa richesse en éléments nutritifs principalement les protéines, elle est largement utilisée dans le domaine nutritionnel comme complément alimentaire pour lutter contre la malnutrition du jeune enfant, des personnes âgées ou malades. Elle présente, en outre, une forte digestibilité en raison de l'absence de paroi cellulosique, ce qui facilite son utilisation pour la consommation des humains (Fox, 1999 ; Richmond, 2004 et Habib *et al.* 2008). Les espèces les plus importantes utilisées pour la consommation des humains sont *Spirulina maxima* et *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) (Vonshak, 2002 ; Abu Affan *et al.*, 2015).

La spiruline croît naturellement dans les eaux alcalines des lacs volcaniques et des eaux saumâtres et chaudes. Cependant, d'après plusieurs auteurs (Richmond, 2004 ; Kumar *et al.*, 2011 et Vo *et al.*, 2015), cette algue pourrait également être cultivée pour une production massive de biomasse, dans des conditions contrôlées, à savoir : la salinité (≈ 30 g/L), le pH (entre 8,5 à 11,0), l'éclairage (≥ 2500 Lux) et la température (35 à 39 °C).

La production actuelle de *Spirulina* dans le monde est estimée à 3000 tonnes, dont plus de 70 % est commercialisée comme aliments naturels pour la consommation humaine (Vo *et al.*, 2015). Elle est principalement consommée sous forme de comprimés, capsules et poudre ou ajoutée comme suppléments nutritionnels ou alors comme colorants naturels pour divers types d'aliments tels que les pâtes, les gâteaux et les boissons (Priyadarshani et Rath, 2012).

Cette microalgue est très prisée pour sa teneur élevée en protéines (60-70 %), en vitamines telles que la vitamine B₁₂ (8 ppm) et la provitamine A (0,2 %), en minéraux tels que le fer (0,1 %), et en acides gras polyinsaturés en particulier les ω -6- (jusqu'à 29,4 à 31,5 % des acides gras totaux) (Vonshak, 2002; Mühling *et al.*, 2005 ; Sguera, 2008 et Koru, 2012). En plus de sa richesse en nutriments, elle est également une source de phytopigments, comme les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines qui interviennent dans la

photosynthèse. Les phycobiliprotéines sont constituées de trois sous-unités: allophycocyanine (APC), phycocyanine (C-PC) et phycoérythrine (PE), localisés à la surface des thylakoïdes et assemblés de façon superposée dans une même unité appelée phycobilisomes. La spiruline est une source considérable de phycocyanine et l'allophycocyanine avec un rapport de 10 :1 (Campanella *et al.*, 2000). La C-PC est un pigment important car il représente environ la moitié du poids des phycobiliprotéines et représente jusqu'à 20 % du poids sec de la spiruline (Boussiba et Richmond, 1979 ; Brejc *et al.*, 1995; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2012).

Ces phytopygents jouent un rôle important dans le métabolisme photosynthétique de la spiruline et dans la santé humaine. Sur l'homme, ils ont des effets antioxydants, et sont également utilisés comme agents thérapeutiques dans les maladies induites par le stress oxydatifs. Ils sont dotés de propriétés anti-obésité, anti-inflammatoire, anti-cancérogène et neuroprotectrice...etc.) (Eriksen, 2008 ; Penton-Rol *et al.*, 2011 et Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015). Ces effets ont été attribués à la présence de composants tels que les phycobiliprotéines, les composés phénoliques, la bêta-carotène et les acides gras polyinsaturés (AGPI) (Dartsh, 2008; Ou *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2013 et Vo *et al.*, 2015).

Mühling *et al.* (2005) ont signalé une différence significative dans la composition des acides gras, en particulier dans la fraction des AGPI, parmi les souches de *Spirulina*. Cette différence dans la composition des acides gras est due aux différences des conditions de culture qui influent sur la teneur en acides gras des souches de spiruline. De plus, de nombreux auteurs considèrent que cette microalgue est l'une des meilleures sources alimentaires pour les acides gras ω -6 (Vo *et al.*, 2015). La spiruline constitue également une source importante d'éléments minéraux. Selon Falquet et Hurni (2006), la teneur en fer est très élevée, soit 10 fois plus que le fer contenu dans les céréales complètes pourtant classées parmi les meilleures sources de fer. Des études ont montré que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande (Puyfouloux, 2001).

Actuellement, de nombreuses souches d'*Arthrospira platensis* ont été identifiées. Elles se présentent sous différentes formes (spiralées, droites ou ondulées) selon leur origine et les différentes conditions de culture (Tomaselli, 1997). Cependant, seules quelques-unes de ces souches sont commercialement exploitables, compte tenu de leurs productivités et de leurs qualités. De plus, les données disponibles sur la composition nutritive et les composés bioactifs de la spiruline sont très variées et leurs valeurs dépendent des conditions de

croissance, de récolte et de séchage de la microalgue. Pour ces diverses raisons, les connaissances sur la composition phytochimique et biochimique de la spiruline sont importantes afin de permettre leur utilisation en tant que compléments alimentaires.

De ce fait, cette étude est entreprise dans le but de caractériser et de comparer, du point de vue composition biochimique et phytochimique, diverses souches d'*A. platensis* en provenance d'Algérie, des États-Unis et du Tchad. De plus elle permettra de contrôler et de maîtriser les conditions de culture afin de sélectionner la souche riche en composés bioactifs qui sera utilisée dans les travaux ultérieurs.

2.3 Matériel et méthodes

2.3.1 Matériel biologique

L'étude a été réalisée sur 5 souches d'*Arthrospira platensis* originaires de trois pays différents. Trois d'entre elles nous ont été fournies sous forme sèche (spiruline 1, 2, 3) et les deux autres sous forme fraîche (spiruline 4 et 5). Ces dernières ont été cultivées, récoltées puis séchées au sein du laboratoire de technologie alimentaire et nutrition humaine. La morphologie des spirulines fraîches (4 et 5), a été observée avec des grossissements de 10 et 40 à l'aide d'un microscope optique (Optech Linear Biostar B4, München, Allemagne). Le tableau (2.1) présente les caractéristiques de toutes les souches de Spiruline étudiées.

L'aspect des spirulines sèches et leurs couleurs sont représentés dans la figure (2.1)

Tableau 2.1 : Caractéristiques des souches étudiées.

| Désignation | Nom | Origine– milieu de culture | Souche | Forme |
|--------------------------------|--------------------------------------|--|---------|----------|
| Spirulina1 (Sèche) | Hawaiian Spirulina Pacifica (HSP) | Cyanothec Corporation Hawaii, USA– Pacific océan | Lonar | Spiralée |
| Spirulina2 (sèche) | Hiri-Tamenrasset (HTAM) | Tamanrasset, Algerie– milieu Hiri | Paracas | Ondulée |
| Spirulina3 (sèche) | Dihé | Tchad – lac Tchad milieu naturel | Lonar | Spiralée |
| Spirulina4 (Fraîche) | M2 | Université des Sciences et Technologies (Ouargla, Algérie) – milieu Zarrouk (cultivée au laboratoire) | M2 | Droite |
| Spirulina5 (Fraîche) | Hiri-Tamenrasset (HTAM) | Tamanrasset, Algérie – milieu Zarrouk (cultivée au laboratoire) | Paracas | Ondulée |

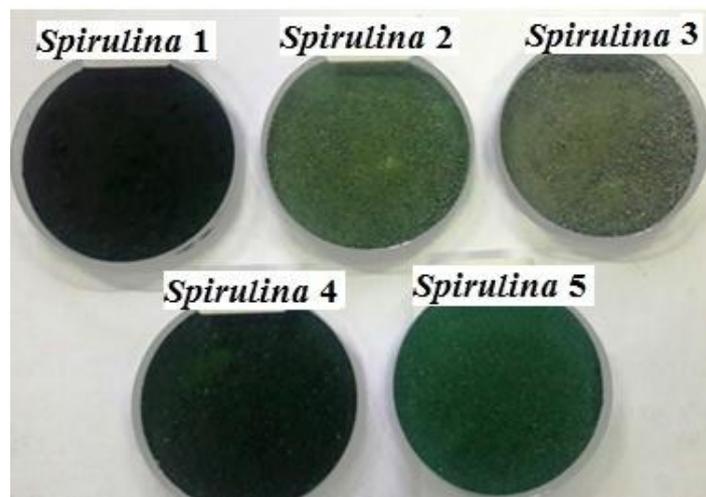


Figure 2.1 : Aspect et couleur des la poudre des différentes souches étudiées.

2.3.2 Conditions et contrôle de la culture

Les spirulines étudiées ont été cultivées dans différents milieux. Les spirulines (1, 2, 3) ont été cultivées dans des milieux naturel et synthétique (eau de mer, milieu Hiri et lac Tchad) respectivement. Pour les souches fournies sous forme fraîche (spiruline 4 et 5), la culture a été réalisée au sein de dans notre laboratoire dans le milieu Zarrouk (Zarrouk, 1966) (voir en annexe I composition du milieu Zarrouk et Hiri).

Les souches 4 et 5 ont été inoculées séparément dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant le milieu de culture synthétique Zarrouk. Ce dernier a été préalablement stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes. Les cultures ont été contrôlées sous les conditions suivantes :

- Une température de $(30 \pm 2,0 \text{ } ^\circ\text{C})$
- Un pH entre 9 et 10. Mesuré à l'aide d'un pH mètre (WTW, 315i/SET, Allemagne), il permet la vérification de la stabilité de la culture et doit être supérieur à 8,5.
- Une salinité d'environ $16 \pm 2 \text{ g/L}$. La salinité a été mesurée par un conductimètre électrique (WTW, 197i, Allemagne). La salinité est un facteur limitant dans la culture de la spiruline. Au-delà de 30 g/litre la croissance s'arrête.
- Un flux lumineux d'une intensité de 2500 Lux ($35 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) assuré par des tubes fluorescents. L'intervalle entre l'éclairage et l'obscurité est de 12 heures. Le flux lumineux a été déterminé grâce à un luxmètre portable (marque KIMO, modèle LX 200, Canada), avec une précision de lecture allant de 0,1 à 200 000 Lux.
- Une agitation à l'aide d'une pompe à air d'un débit de 25 mL/min, assurant une exposition uniforme des cellules à la lumière, pour une croissance optimale et une meilleure valeur nutritive.

L'identification de la pureté de la culture et la mesure de la densité des cellules ont été déterminées à l'aide d'un microscope optique (Optech Linear Biostar B4, München, Allemagne) en utilisant la cellule de Nageotte. Après trois semaines de culture, les cellules d'algues ont été récoltées par filtration sur toile sérigraphie, lavées avec de l'eau distillée et finalement séchées pendant 3 jours à l'ombre et à température ambiante ($\sim 20 \text{ } ^\circ\text{C}$).

Tous les produits chimiques utilisés pour la préparation du milieu de culture et pour les analyses physico-chimiques et phytochimiques sont de qualité analytique obtenue auprès de Biochem Chemopharma (France).

La croissance a été déterminée par la méthode du poids sec selon Madkour *et al.* (2012). Dix millilitres d'échantillons d'algues ont été filtrés à travers une membrane de filtre Wathman (\varnothing 47 mm et une taille des pores de 0,45 μ m) séchés (2 heures à 100 °C) et prépesés. Ils sont ensuite lavés deux fois avec de l'eau distillée, séchés pendant 4 heures à 80 °C, refroidis dans le dessiccateur avant de les peser à nouveau. La différence entre les deux pesées permet de calculer le poids sec.

2.3.3 Analyses biochimiques et physico-chimiques

2.3.3.1 Détermination du taux d'humidité

La teneur en eau a été déterminée en utilisant 2 g d'échantillon de poudre d'algues qui sont séchés à 105 °C dans une étuve et ce, jusqu'à obtention d'un poids constant. La différence entre les deux pesées avant et après séchage permet de calculer la teneur en eau.

2.3.3.2 Détermination de la teneur en fibres

La teneur en fibres alimentaires a été déterminée à l'aide de la méthode décrite par Van Soest (1963), (Annexe 2).

2.3.3.3 Détermination du taux de cendres

Les cendres totales ont été déterminées en incinérant 5 g d'échantillon à 550 °C pendant 3 heures en utilisant un four à moufle (Linn Electro Therm, modèle, Allemagne). Cette méthode consiste à mesurer le poids des échantillons avant et après l'incinération.

2.3.3.4 Détermination du taux de glucides

La teneur totale en glucides a été déterminée selon la méthodologie décrite par Dubois *et al.* (1956). Le principe consiste à réaliser une hydrolyse acide avec de l'acide sulfurique concentré puis à provoquer une réaction colorimétrique en utilisant le phénol. En présence de ces deux réactifs, les oses donnent une couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, la densité optique est déterminée entre 450 à

550 nm. La teneur en sucres est mesurée en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec le glucose comme standard (Annexe 3).

2.3.3.5 Détermination du taux de protéines

La concentration totale en protéines a été déterminée à l'aide de la méthode Kjeldahl (1883) selon la norme française NFV 03 050:1970 (Anonyme, 1970). Le principe consiste en la transformation de l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral ainsi que le titrage de l'ammoniaque par un dosage acido-basique.

Par convention, la teneur en protéines de l'échantillon est alors obtenue en multipliant la teneur en azote total par un facteur de conversion empirique. Ce coefficient prend en compte la masse molaire moyenne des acides aminés composant les protéines à quantifier. Il est fixé à 6,25 dans notre cas.

Noté P, la teneur en protéines est exprimée en pourcentage et est égale à :

$$P (\%) = 6,25 \cdot \frac{14,007 \cdot N \cdot (V_1 - V_0)}{m \cdot MS\%} \quad \text{Equation 2.1}$$

14,007 g/mol est la masse molaire de l'azote

N est la normalité de la solution d'acide chlorhydrique (0,1 N)

V_0 : est le volume utilisé de la solution d'acide chlorhydrique sur un échantillon blanc (en mL)

V_1 : est le volume utilisé de la solution d'acide chlorhydrique (en mL)

M. : est la masse de l'échantillon (1 g)

MS : est la teneur en matière sèche (%) de l'échantillon.

2.3.3.6 Détermination de la teneur en matière grasse

Les lipides ont été extraits selon la méthode modifiée de Xu *et al.* (1998), en utilisant un mélange de solvant de chloroforme:méthanol (2:1, v/v). Après avoir réchauffé l'échantillon dans un appareil Soxhlet, le solvant est ensuite évaporé sous pression à l'aide d'un évaporateur à vide rotatif (Rotavapor, Heidolph G1, Allemagne). Après 5 heures d'extraction, la procédure est répétée trois fois jusqu'à ce que la totalité des lipides soit extraite. Ensuite les résidus ont été séchés et pondérés. Les résultats sont exprimés comme suit :

$$L_t (\%) = (M_1 - M_0) 100 / P \quad \text{Equation 2.2}$$

L_t : est la teneur en lipides totaux

M_0 : masse en gramme du ballon vide.

P : la prise d'essai avant dessiccation

M_1 : masse en gramme du ballon avec l'échantillon après évaporation

2.3.3.7 Détermination du profil en acides gras

Le profil en acides gras des échantillons d'algues a été déterminé en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (GC, Chrompack CP 9002, Pays-Bas) selon la méthodologie décrite par Tokus, Oglu et Ünal (2003). Les acides gras ne sont pas analysés à l'état libre mais sont préalablement transformés en esters méthyliques d'acides gras correspondants (FAME) par méthylation selon la méthode de Wolf, (1968). Le procédé de la méthylation consiste à mettre 0,2 g de matière grasse extraite précédemment dans des tubes à sceller, ajouter 0,5 mL de méthanol à 0,5 % d'acide sulfurique, sceller les tubes puis les porter à 140°C dans un bain à sec pendant 2 heures.

Le principe de la CPG consiste à entraîner à haute température les esters méthyliques des acides gras à travers une colonne contenant un liquide inerte, de telle sorte que selon le partage entre le gaz entraîneur et le liquide, les divers esters sortent de la colonne à des moments différents. Une solution standard contenant un mélange d'acide gras connu a été utilisée pour identifier les acides gras de nos échantillons en comparant leurs temps de rétention. Les conditions opératoires sont détaillées dans l'annexe 4.

2.3.3.8 Dosage des éléments minéraux et des métaux lourds

Ce dosage a été réalisé selon la méthode décrite par Pinta (1973). Le mode de minéralisation décrit dans cette méthode est utilisable pour les dosages de plusieurs éléments (K, Na, Ca, Mg) et des oligo-éléments (Fe, Mn, Cu, Zn). Les réactifs utilisés pour cette analyse sont l'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,19$), l'acide fluorhydrique et l'eau bidistillée. Le mode opératoire se présente comme suit :

- a- Homogénéiser la poudre végétale finement broyée et la sécher 24 heures à 105 °C. refroidir 30 minutes au dessiccateur puis peser 2 g d'échantillon en capsule de platine.

- b- Disposer les capsules au four froid, élever la température à 450 °C en deux heures et la maintenir deux heures, refroidir. Les cendres obtenues sont généralement claires.
- c- Humecter les cendres avec 2 à 3 mL d'eau et 1 mL d'acide chlorhydrique concentré, lentement ajouté.
- d- Chauffer ensemble sur plaque chauffante jusqu'à apparition des premières vapeurs, ajouter quelques ml d'eau.
- e- Filtrer sur filtre sans cendre, dans une fiole jaugée de 100 mL, rincer 3 ou 4 fois à l'eau tiède.
- f- Incinérer le papier filtre et son contenu pendant une demi-heure à 550 °C au maximum, puis reprendre par 5 mL d'acide fluorhydrique.
- g- Aller à sec sur plaque chauffante ou bain-marie sans dépasser 100 °C; reprendre par 1 mL de HCl concentré.
- h- Laver à l'eau tiède puis filtrer. Amener à 100 mL, compléter au trait de jauge après refroidissement.

Les solutions obtenues ont été analysées au niveau du laboratoire central de la police scientifique (LCPS, Château neuf, Alger). Les sels Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Cr, Co, Cd, Ni, Pb ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique à flamme type Perkin Elmer Analyst 800, USA (figure 2.2.a). Les sels minéraux Ca, Na et K ont été dosés par une chromatographie ionique de type Dionex ICS-3000, USA (Figure 2.2.b).

La concentration C des éléments minéraux exprimée en mg /L de MS est calculée par la formule suivante :

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{T \times F}{P} \quad \text{Equation 2.3}$$

Où :

C : la concentration en éléments minéraux exprimée en mg/L.

T : la teneur de l'élément dosé par l'appareil.

F : le facteur de dilution (x100).

P : prise d'essai (2 g).

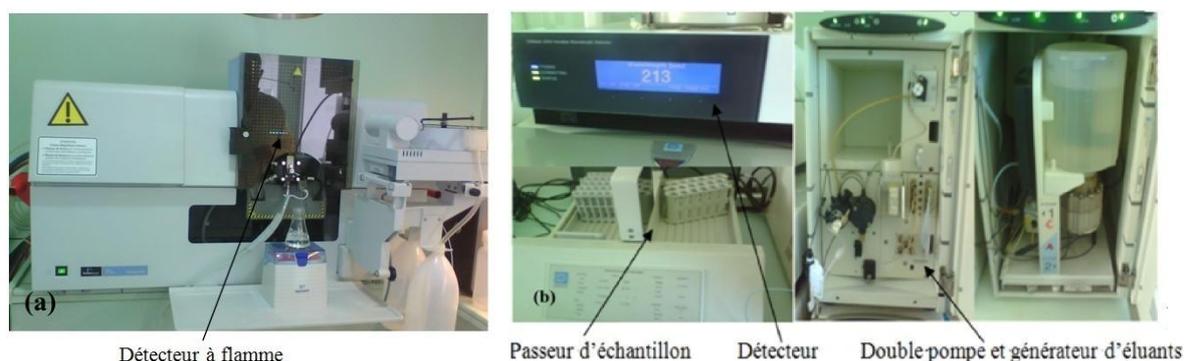


Figure 2.2 : (a) : Spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à flamme type Perkin Elmer Analyst 800. (b) : Chromatographie ionique de type Dionex ICS-3000 (Laboratoire central de la police scientifique, LCPS, Alger).

2.3.3.9 Calcul de la valeur énergétique

Le pouvoir calorifique totale des spirulines étudiées a été déterminé en multipliant les valeurs totales des lipides, des protéines et des glucides par 9, 4 et 4 Kcal respectivement, puis en additionnant les résultats obtenus.

2.3.4 Analyses phytochimiques

2.3.4.1 Dosage de la chlorophylle *a*, *b* et des caroténoïdes

La chlorophylle *a*, *b* et les caroténoïdes ont été déterminés selon la méthode modifiée décrite par El-Sheekh et Fathy (2009). Dans ce procédé, un gramme de chaque échantillon de spiruline est mis en suspension dans 50 mL d'acétone à 90% et agité vigoureusement avec un agitateur magnétique (Stuart stir SB161, UK). Les solutions ont ensuite été placées dans l'obscurité à 4 °C et centrifugées à 4000 (x g) pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Kseroa Monaco, n °4222). Les surnageants obtenus ont été utilisés pour déterminer la concentration de chlorophylle *a* (*Chl_a*), de chlorophylle *b* (*Chl_b*) et des caroténoïdes totaux (*Car*) en mesurant l'absorbance aux longueurs d'onde 649, 664 et 470 nm. La densité optique est lue au spectrophotomètre UV / Visible (Jenway Genova plus, Staffordshire, Royaume-Uni). Le contenu en (mg/g) de chaque pigment a été quantifié à l'aide d'équations (2.4-2.6) (Lichtenthaler et Wellburn, 1985) :

$$Chl_a = 13.75 \cdot A_{664} - 5.19 \cdot A_{649} ; \quad \text{Equation 2.4}$$

$$Chl_b = 27.43 \cdot A_{649} - 8.12 \cdot A_{664} ; \quad \text{Equation 2.5}$$

$$Car = (1000 \cdot A_{470} - 2.13 \cdot Chl_a - 97.64 \cdot Chl_b) / 209 \quad . \quad \text{Equation 2.6}$$

Où : A_{664} , A_{649} et A_{470} sont les absorbances respectives de l'échantillon aux longueurs d'onde à 664, 649 et 470 nm.

2.3.4.2 Dosage des pigments solubles dans l'eau (phycobiliprotéines)

L'extraction et l'estimation des composants des phycobiliprotéines, y compris la phycocyanine (C-PC), l'allophycocyanine (APC) et la phycoérythrine (PE), ont été déterminées en utilisant un spectrophotomètre avec des longueurs d'onde 620, 652 et 562 nm respectivement selon la méthode décrite par Anamika *et al.* (2005). Le contenu de chaque composante a été mesuré en utilisant les équations (2.7- 2.9).

$$C - PC = [A_{620} - (0.474 \cdot A_{652})] / 5.34 \quad \text{Equation 2.7}$$

$$APC = [A_{652} - (0.208 \cdot A_{620})] / 5.09 \quad \text{Equation 2.8}$$

$$PE = [A_{562} - (2.41 \cdot C - PC) - (0.849 \cdot APC)] / 9.62 \quad \text{Equation 2.9}$$

Où : A_{620} , A_{652} et A_{562} sont les absorbances respectives de l'échantillon aux longueurs d'onde 620, 652 et 562 nm.

Le pourcentage de phycocyanine brute a été estimé en utilisant la méthode décrite par Jourdan (2011) et calculé en utilisant l'équation (2.10). L'expérience consiste à dissoudre 4 g de spiruline dans 100 mL d'eau distillée.

$$\% PC = 1.873 \cdot [A_{615} - (0.474 \cdot A_{652})] \cdot DIL / C \quad \text{Equation 2.10}$$

Où : DIL est le facteur de dilution et C représente le pourcentage de poudre sèche.

2.3.4.3 Dosage des phénols totaux

Les échantillons d'algues sèches ont été broyés en fine poudre. Une quantité de poudre (0,5 g) a été utilisée pour l'extraction des phénols en utilisant 10 mL de méthanol (80%) à 35 °C pendant 24 heures selon le procédé décrit par Cai *et al.* (2004). Les échantillons de méthanol ont ensuite été refroidis à température ambiante puis centrifugés à 4000 (x g) pendant 10 minutes en utilisant une centrifugeuse (Kseroa Monaco, n°4222). Le surnageant obtenu a été utilisé pour l'estimation de la teneur phénolique totale.

Le contenu phénolique total présent dans les microalgues a été déterminé en utilisant le réactif Folin Ciocalteu (Singleton et Rossi 1965). Les résultats ont été exprimés en équivalent acide gallique (EAG)/g de poids sec de microalgues. La courbe d'étalonnage de l'absorbance à 765 nm en fonction de la concentration en acide gallique (phenol standard) est représentée en annexe 5.

2.3.5 Analyses microbiologiques

Pour l'élaboration de la suspension mère, nous avons préparé de façon aseptique, une solution ayant une dilution de 1/10 (1 g d'échantillon auquel 9 mL d'eau physiologique ont été ajoutés). Différentes dilutions décimales sont retenues (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) pour les analyses.

2.3.5.1 Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) selon la norme NF V08-051 (Anonyme, 1992)

Pour cela, on transfère 0,1 mL des différentes dilutions décimales retenues (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) dans les boîtes de Pétri et on ajoute 15 mL environ de milieu de Plate Count Agar (PCA). Après solidification, une deuxième couche de gélose est déposée en surface. Après l'incubation des boîtes de Pétri à 30 °C pendant 72 heures, seules les colonies blanchâtres situées entre les 2 couches de PCA sont prises en compte. On retient pour le dénombrement, les boîtes de Pétri contenant un nombre compris entre 30 et 300 colonies.

2.3.5.2 Dénombrement de la flore fongique (FF)

Il concerne les levures et les moisissures. Le milieu utilisé et le mode opératoire font référence à la norme française NF XP-OS-059-octobre 1996 (Anonyme, 1996). Le milieu utilisé pour le dénombrement des levures et des moisissures est l'Oxytetracycline Glucose Agar (O.G.A.). Le milieu O.G.A est coulé et refroidi dans des boîtes de Pétri. 0,1 mL des dilutions sont étalés à la surface de la gélose. Après 5 jours d'incubation à 25 °C, on retient les boîtes contenant moins de 150 colonies.

2.3.5.3 Dénombrement des coliformes totaux (CT)

Selon la NF V08-050 (Anonyme, 2009), le milieu désoxycholate lactose agar (1%) a été utilisé. 1 mL d'une dilution est prélevé et ensemencé dans la gélose en surfusion. Les

incubations sont faites à 30 °C et les lectures après 48 heures. Le nombre total de germes exprimé en unité formant des colonies UFC/g de produit.

2.3.6 Analyse statistique

Les analyses ont été effectuées en triplicata et les valeurs sont présentées et exprimées en valeur moyenne \pm écart-type (moyenne \pm E-type). Les comparaisons multiples des moyennes de chaque analyse ont été déterminées en utilisant le test de différence le moins significatif (LSD) au niveau de confiance de 95% et la différence entre les valeurs moyennes supérieures au LSD (0,95) a été déterminée comme significative. L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée en utilisant les modèles linéaires généraux du logiciel STATGRAPHICS Centurion XVI.II (STATPOINT Technologies, Inc. www.STATGRAPHICS.com).

2.4 Résultats et discussion

2.4.1 Morphologie des souches étudiées et leurs croissances

Les cellules des souches *Spirulina* fraîches (4 et 5) observées au microscope (figure 2.3) ont montré une structure multicellulaire et filamenteuse avec des trichomes cylindriques bleu-vert, formant une hélice plus au moins ouverte qui est la caractéristique du genre *Arthrospira* (Fox, 1999). Cependant, ces spirulines présentent des formes différentes. La spiruline 4 est un filament droit, tandis que pour la spiruline 5 (B et B', Fig. 3.3), l'inoculum présentait au départ une forme ondulée puis prenait, petit à petit, une forme droite.

D'après Tomaselli, (1997), le degré de spiralisation montre une grande variation et les cellules de *Spirulina* apparaissent parfois comme des trichomes droits dans la culture. En outre, Scheldeman *et al* (1999), ont montré que les spirulines présentaient une morphologie variable sous l'effet des changements des conditions environnementales ou de culture. Selon Jourdan, (2011), les droites sont génétiquement de vraies spirulines mais possèdent l'inconvénient d'être difficiles à récolter.

La spiruline B' a changé de forme (ondulée à droite), ce qui est probablement dû au changement du milieu de culture (milieu Hiri vers Zarrouk). Plusieurs auteurs ont étudié les raisons de ce changement de morphologie. Kumar *et al.*, (2011) rapportent que les conditions

physiques et chimiques du milieu de croissance pourraient être la cause des modifications de la forme filamenteuse des souches de *Spirulina*.

Selon Dhiab *et al.*, (2007), la modification de la morphologie du trichome de spiruline (de la forme hélicoïdale à la forme droite) est due à la variation des concentrations de NaCl du milieu de croissance.

Concernant la productivité de la biomasse, différents auteurs ont signalé que, dans les cultures de microalgues, l'état nutritionnel est le principal facteur pouvant affecter la croissance et la productivité (Zarrouk, 1966; Fox, 1999; Kumar *et al.*, 2011; Jourdan, 2011; Madkour *et al.*, 2012; Shalaby et Shanab, 2013 et Ould Bellahcenet *et al.*, 2013). Dans cette étude, la spiruline a été cultivée pendant plus de trois semaines. Le taux de croissance est exprimé en (g/L) de poids sec (Figure 2.4). Pour les deux souches fraîches (*Spirulina* 4 et 5), la concentration maximale de la biomasse et la densité cellulaire sont, respectivement, de 0,60 g/L et de $2,16 \times 10^7$ cellules/mL. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Kumar *et al.*, (2011).

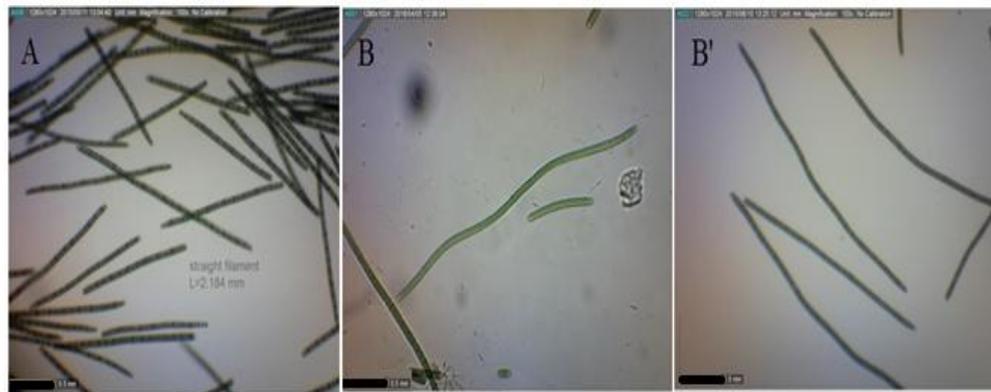


Figure 2.3 : Variabilité morphologique d'*A. platensis*. **A:** filament droit (spiruline 4); **B et B ':** forme ondulée (spiruline 5). Bar représente 500 μm .

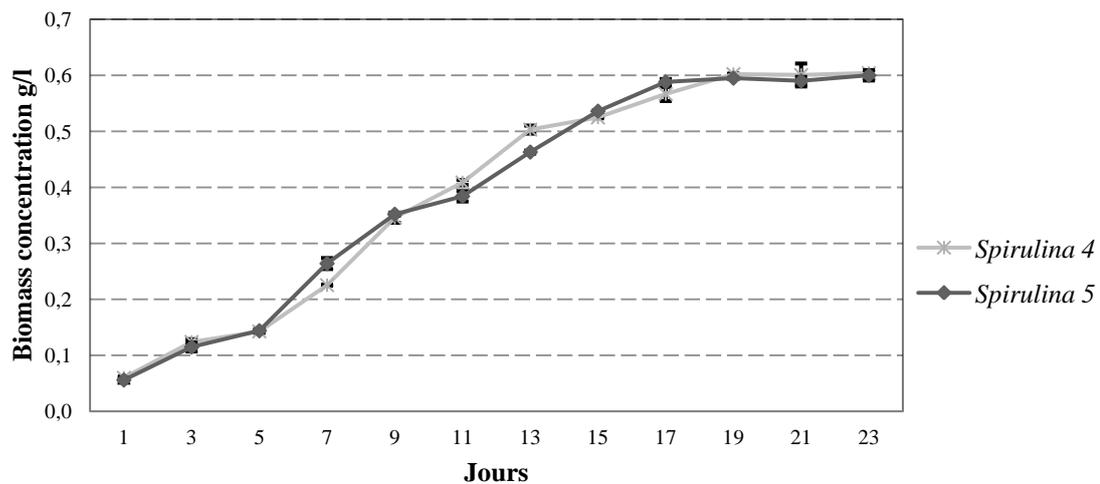


Figure 2.4 : Concentration de la biomasse (g/L) des souches 4 et 5 cultivées en milieu Zarrouk.

2.4.2 Composition nutritionnelle et microbiologique

2.4.2.1 Composition physico-chimique

Le tableau 2.2 représente la composition biochimique des cinq poudres de spiruline.

Tableau 2.2 : Composition physico-chimique des différentes souches étudiées.

| Paramètres | <i>Spirulina 1</i> | <i>Spirulina 2</i> | <i>Spirulina 3</i> | <i>Spirulina 4</i> | <i>Spirulina 5</i> |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Humidité (%) | 4,70 ± 0,025 ^a | 5,17 ± 0,072 ^b | 8,40 ± 0,054 ^c | 8,63 ± 0,028 ^d | 9,77 ± 0,011 ^e |
| Cendres (%) | 9,20 ± 0,113 ^b | 9,30 ± 0,028 ^c | 18,11 ± 0,076 ^e | 8,23 ± 0,006 ^a | 11,10 ± 0,092 ^d |
| Glucides (%) | 15,63 ± 0,024 ^c | 15,82 ± 0,087 ^c | 13,64 ± 0,052 ^a | 13,68 ± 0,091 ^b | 15,26 ± 0,056 ^c |
| Protéines (%) | 62,86 ± 0,009 ^c | 59,23 ± 0,103 ^b | 53,78 ± 0,027 ^a | 59,80 ± 0,037 ^{bc} | 59,35 ± 0,013 ^{bc} |
| Lipides (%) | 8,08 ± 0,056 ^e | 2,38 ± 0,027 ^b | 1,50 ± 0,34 ^a | 2,95 ± 0,064 ^c | 4,79 ± 0,075 ^d |
| Fibres (%) | 3,05 ± 0,025 ^a | 3,58 ± 0,047 ^c | 3,54 ± 0,075 ^{bc} | 3,79 ± 0,058 ^d | 3,52 ± 0,048 ^b |
| Énergie (kJ) | 1602,59 ± 2,25 ^d | 1329,93 ± 1,85 ^b | 1185,61 ± 2,48 ^a | 1327,34 ± 3,51 ^b | 1413,1 ± 2,35 ^c |

Les exposants avec différentes lettres sont significativement différents à $p < 0,05$.

Le taux d'humidité des échantillons est, respectivement, de 4,70 ; 5,17 ; 8,40 ; 8,63 et 9,77% pour les souches 1, 2, 3, 4 et 5. On montrera que pour tous les échantillons de spiruline étudiés, la teneur en humidité est inférieure à 10%, condition recommandée pour le stockage à long terme des poudres de cette microalgue (Becker, 1995).

Le contenu total en cendres de la spiruline étudiée varie significativement ($p < 0,05$) et se situe entre 8,23 et 18,11%. Pour toutes les souches, à l'exception de *Spirulina* 3, le contenu en cendres est compris entre les teneurs 7 et 10 %, (valeurs recommandées par Jourdan, 2011). Ces résultats sont similaires à ceux reportés par Tokus, Oglu et Ünal (2003). La teneur élevée en cendres dans les cellules *Spirulina* 3 peut être attribuée à la présence de sable et de certaines impuretés résultant du processus traditionnel de récolte et de séchage de la spiruline du Tchad appelée «Dihé» (Sorto et Gonnet, 2007). Récemment, Bensehaila *et al.* (2015), ont annoncé un taux de 6,88 % de cendres dans la souche d'*A. platensis* de Tamanrasset (sud de l'Algérie). Dans notre étude, pour la même souche (*Spirulina* 2), nous avons trouvé 9,3% de cendres. Cette différence de résultat est probablement due à la différence des conditions de culture.

La teneur en glucides totaux des échantillons de spiruline est presque la même pour toutes les souches (environ 15%) à l'exception de l'échantillon de *Spirulina* 3 ou "Dihé" qui a une concentration plus faible (13,64%). Les teneurs en glucides de *Spirulina* 1, 2, 4 et 5 sont presque dans l'intervalle des valeurs (15 à 25%) rapportées par Quillet (1975).

Les teneurs en protéines des souches de spiruline étudiées varient de manière significative. Les échantillons présentent des concentrations très élevées en protéines (environ 60%), sauf pour *Spirulina* 3, qui ne contient que 53,78% de protéines. Cela pourrait être attribué aux mauvaises conditions de croissance (Lac Tchad), sachant que le milieu naturel est un environnement impossible à contrôler. Les autres souches ont été cultivées dans des conditions étroitement contrôlées (cultures d'étangs ou en laboratoire).

Selon Sorto et Gonnet (2007), la présence de sable (plus de 30%), de vers, de débris de plantes, d'animaux et d'insectes dans le lac Tchad affecte les qualités nutritionnelles et hygiéniques du dihé.

Pour la même souche (*Spirulina* 2), Bensehaila *et al.* (2015) ont mesuré une teneur en protéines de 60,32%, taux proche de celui de 59,33% observés dans cette étude. On constate que cette légère différence pourrait être due à la différence dans les conditions d'analyse.

Néanmoins, la teneur en protéines des souches de spiruline étudiées présente une valeur bien supérieure à celle de nombreuses autres sources de protéines alimentaires (légumes: 22%, viande: 25%, poisson: 20%).

Plusieurs auteurs ont confirmé que la teneur en protéines de la spiruline est très élevée et représente 10 à 11% de la masse humide, soit 60 à 70% de sa matière sèche (Fox, 1999 ;

Kent *et al.*, 2015). Les teneurs en protéines d'*A. platensis* ont montré une digestibilité très élevée (75-83%) en raison du manque de parois cellulosiques dans la spiruline. Par conséquent, c'est une source privilégiée de nutriment, en considérant l'importance de son apport protéique (Sguera, 2008).

La teneur maximale en lipides totale a été observée pour la spiruline 1 (8,08 %). Les concentrations pour les autres souches sont de 2,38 ; 1,5 ; 2,95 et 4,79 %, respectivement pour les spirulines 2, 3, 4 et 5 (Tableau 2.2). Pour la même souche *Spirulina* 2 (Bensehaila *et al.*, 2015) ont trouvé une teneur en lipides de 7,28 %, ce qui est très élevé par rapport au résultat observé dans notre étude (2,38 %). Cette différence est étroitement liée aux différences de pH, de température et d'éclairage dans les conditions de culture (Kumar *et al.*, 2011).

Parmi les différentes espèces de microalgues sélectionnées par Franke *et al.* (1994), les Cyanophytes contiennent une très faible teneur en matières grasses (4,4-7,4 %), ce qui correspond à nos résultats. Selon Tokus, Oglu et Ünal (2003), Capelli et Cysewski (2010), la teneur en lipides de *Spirulina* varie entre 5 % et 8 %. Tornabene *et al.* (1985), ont trouvé une teneur plus élevée en lipides dans *S. platensis* (16,6% de la matière sèche).

Cependant, Hudson et Karis (1974), ont déclaré 11% de lipides dans *Spirulina maxima*. Dans différentes conditions de croissance, la teneur en lipides de *Spirulina* est significativement différente. Par exemple, les intensités lumineuses élevées et une température de 38 °C n'influent pas sur la composition en acides gras, mais ont un effet drastique sur la teneur en lipides, ce qui la réduit de 46% (Cohen *et al.* 1987). En outre, lorsqu'il existe une déficience en nutriments en termes d'azote et de phosphore, l'accumulation de lipides dans la spiruline augmente (Bhakar et Pabb, 1987). Par conséquent, selon Orcutt et Patterson (1974), les paramètres de la lumière et du pH peuvent également affecter le métabolisme lipidique. La teneur totale en lipides augmente à faible pH et diminue à pH élevé chez *Chlamydomonas* sp. (Tatsuzawa *et al.* 1996). Cependant, Richmond (2004) a rapporté que la production de lipides dans les microalgues dépend de l'espèce et des conditions de culture, telles que les nutriments, la salinité, l'intensité lumineuse, la température, le pH et même l'association avec d'autres microorganismes.

La teneur en fibres dans nos échantillons de spiruline est environ 3%. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Koru (2012), qui a trouvé également 3% de fibres dans cette microalgue. Ces résultats confirment que la teneur inférieure en fibres suggère une biomasse facilement digestible pour l'usage humain (Richmond, 2004 ; Sguera, 2008).

Enfin, toutes les souches ont montré des valeurs énergétiques élevées allant de 1327,34 à 1602,59 kJ, à l'exception de *Spirulina* 3 (1185.61 kJ). Cette faible valeur s'explique par ses faibles teneurs en glucides, protéines et lipides. En effet, le processus de production traditionnel du "Dihé" n'est pas très approprié pour obtenir une spiruline de haute valeur nutritive, car les conditions de croissance des algues ne sont ni enrichies ni contrôlées. De plus, les conditions de récolte et de séchage de cette souche s'effectuent de façon traditionnelle, ce qui peut affecter sa composition nutritionnelle et sa qualité microbiologique (Sorto et Gonnet, 2007).

2.4.2.2 Profil en acides gras des spirulines étudiées

Les valeurs obtenues pour les acides gras (AG) analysés ont été exprimées en pourcentage des lipides totaux et sont représentées dans le tableau 2.3. Les résultats montrent que le principal AG présent en quantité importante pour toutes les souches de spiruline est l'acide palmitique (AP, 16: 0) avec une moyenne de 43,60, 46,45, 71,15, 51,33 et 48,19% pour, respectivement, *Spirulina* 1, 2, 3, 4 et 5. Le taux le plus élevé d'AP est observé chez *Spirulina* 3. Selon Bhakar et Pabb, (1987), ceci pourrait être expliqué par un manque de phosphore dans le milieu de croissance.

Tableau 2.3 : Profil en acides gras des cinq spirulines étudiées exprimées en % de lipides totaux.

| Acides gras | <i>Spirulina</i> 1 | <i>Spirulina</i> 2 | <i>Spirulina</i> 3 | <i>Spirulina</i> 4 | <i>Spirulina</i> 5 |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C13:0 | ND | ND | ND | ND | ND |
| C14:0 | 0,42 ± 0,01 ^a | 1,46 ± 0,03 ^b | 3,25 ± 0,19 ^c | 3,26 ± 0,21 ^c | 3,65 ± 0,02 ^d |
| C14:1 | 0,06 ± 0,00 ^a | 0,14 ± 0,01 ^b | 0,23 ± 0,02 ^d | 0,23 ± 0,01 ^c | 0,07 ± 0,01 ^a |
| C15:0 | 0,15 ± 0,01 ^b | 0,13 ± 0,01 ^b | 0,37 ± 0,01 ^c | 0,08 ± 0,00 ^a | 0,09 ± 0,01 ^a |
| C16:0 | 43,60 ± 0,01 ^a | 46,45 ± 0,08 ^b | 71,15 ± 0,02 ^e | 51,33 ± 0,02 ^d | 48,19 ± 0,06 ^c |
| C16:1 | 7,60 ± 0,00 ^d | 5,49 ± 0,03 ^c | 4,36 ± 0,16 ^a | 4,83 ± 0,07 ^b | 4,75 ± 0,01 ^b |
| C17:0 | 0,32 ± 0,00 ^d | 0,24 ± 0,00 ^b | 0,37 ± 0,01 ^e | 0,16 ± 0,01 ^a | 0,27 ± 0,01 ^c |
| C17:1 | 0,21 ± 0,01 ^c | 0,21 ± 0,01 ^c | 0,50 ± 0,02 ^d | 0,18 ± 0,00 ^b | 0,13 ± 0,01 ^a |
| C18:0 | 3,33 ± 0,16 ^e | 1,67 ± 0,04 ^d | 1,42 ± 0,03 ^c | 1,10 ± 0,01 ^b | 0,69 ± 0,03 ^a |
| C18:1n-9 | 4,71 ± 0,23 ^b | 4,73 ± 0,18 ^b | 4,02 ± 0,19 ^a | 5,23 ± 0,01 ^c | 5,99 ± 0,04 ^d |
| C18:2n-6 | 20,15 ± 0,00 ^c | 19,26 ± 0,02 ^b | 7,86 ± 0,22 ^a | 18,94 ± 0,22 ^b | 19,82 ± 0,07 ^c |

Chapitre II : Comparaison de la composition biochimique de différentes souches d'*Arthrospira platensis* originaires de l'Algérie, du Tchad et des Etats Unis d'Amérique

| | | | | | |
|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| C18:3n-6 | 4,32 ± 0,01 ^b | 4,22 ± 0,07 ^b | 2,73 ± 0,02 ^a | 4,19 ± 0,00 ^b | 4,50 ± 0,04 ^c |
| C18:3n-3 | 0,01 ± 0,00 ^b | ND ^a | ND ^a | ND ^a | 0,02 ± 0,01 ^c |
| C20:0 | 15,12 ± 0,03 ^d | 15,71 ± 0,16 ^e | 3,75 ± 0,11 ^a | 10,24 ± 0,14 ^b | 11,65 ± 0,01 ^c |
| C20:3n-6 | ND ^a | 0,29 ± 0,00 ^b | ND ^a | ND ^a | ND ^a |
| C24:1 | ND ^a | ND ^a | ND ^a | 0,23 ± 0,02 ^b | ND ^a |

Les exposants avec différentes lettres sont significativement différents à $p < 0,05$. ND signifie 'non détecté'

Les expériences effectuées par Piorreck *et al.* (1984) et Tokus, Oglu et Ünal (2003) montrent que la teneur en acide palmitique (AP) dans la spiruline est comprise entre 26 et 39%.

Falquet et Hurni (2006) ont également signalé une proportion relativement élevée d'AP, environ 25 à 60%, ce qui reflète probablement la variation de la teneur en acides gras parmi les échantillons. Plusieurs autres auteurs ont également signalé que l'acide gras prédominant dans la spiruline est l'AP dont les valeurs se situent entre 35 et 54,1 % (Falquet et Hurni, 2006 ; Habib *et al.*, 2008).

L'analyse statistique montre des différences significatives ($p < 0,05$) de la teneur en acide stéarique (AS, C18: 0) concernant les cinq échantillons. Les valeurs maximum et minimum obtenues sont de 3,33 et 0,69 %, respectivement pour la spiruline 1 et 5. Selon Falquet et Hurni (2006), le taux de l'AS dans la spiruline varie entre 0,5 et 2 %. Oliveira *et al.* (1999), ont constaté que la teneur la plus élevée en AS (2,76 %) et a été obtenue chez la spiruline cultivée dans un milieu à une température de 30 °C.

La teneur en acide oléique (AO, 18: 1n-9) dans les échantillons se situe entre 4,02 et 5,99 %, soit à peu près dans les intervalles (5-16 %) et (1-15,5 %), rapportés respectivement par Hudson et Karis (1974) et Habib *et al.* (2008).

Les Acides gras essentiels (AGE) sont des acides gras polyinsaturés, indispensables à notre organisme. Ce dernier ne peut pas les synthétiser naturellement, ils sont donc exclusivement fournis par notre alimentation (Chen *et al.*, 2013). Par conséquent, l'estimation de ces AGE (l'acide linoléique, l'acide gamma-linolénique et l'acide alpha-linolénique) est très importante pour évaluer le potentiel de la spiruline pour notre santé.

Les niveaux de l'acide linoléique (AL, 18:2 n-6) dans les souches étudiées sont élevés, avec une moyenne de 19 à 20 % à l'exception de *Spirulina* 3, qui ne présente que 7,86 %. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Xue *et al.* (2002), soit environ $17,6 \pm 2,3$ % d'AL.

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont évalué la teneur en acide linoléique de la spiruline qui est de l'ordre de 27 % (Capelli et Cysewski, 2010) à 30,7 % (Habib *et al.*, 2008).

Les échantillons de spiruline analysés dans cette étude contiennent des quantités élevées d'acide gamma-linolénique (AGL, 18: 3n-6), avec une concentration moyenne de 4,32 %, sauf pour *Spirulina* 3 qui n'en comporte que 2,73 %.

Selon Kent *et al.* (2015), la spiruline contient de grandes quantités d'acide γ -linoléique (9,42%) comparée à toutes les autres microalgues (*Nannochloropsis sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.* et *Dunaliella sp.*). Tokus, Oglu et Ünal (2003) ont comparé le contenu d'AGL de trois types d'algues (*Spirulina platensis*, *Isochrysis galbana* et *Chlorella vulgaris*) et ils ont trouvé que l'espèce *Spirulina platensis* présentait une teneur en acide γ -linoléique beaucoup plus élevée (3,64 – 5,52 %) par rapport à *Isochrysis galbana* (0,54 %) et *Chlorella vulgaris* (traces).

Une autre étude réalisée par Franke *et al.* (1994), basée sur la sélection de plusieurs espèces de microalgues a eu pour but de définir leur composition en acides gras. Ils ont constaté que le taux en AGL de *Spirulina* est élevé et se situe entre 16 % et 23 %. Habib *et al.* (2008), ont également rapporté que la teneur en AGL chez *Spirulina* varie entre 8 % et 31,7 %.

Les travaux de Cohen *et al.* (1987) ont expliqué les raisons de ces variations de la teneur en AG, et ce, en étudiant leur distribution dans 19 souches de spiruline cultivées dans diverses conditions environnementales. Ils ont constaté que la teneur en acide gras augmentait proportionnellement avec la température de la culture alors que la quantité d'AGPI (Acide gras polyinsaturé) diminuait. En outre, la teneur la plus élevée en AGL a été trouvée dans les souches cultivées à 30-35 °C.

D'autres études plus récentes, réalisées par Tomaselli *et al.* (1993) et Quoc et Dubacq (1997), ont montré les mêmes raisons. D'après ces chercheurs, cette différence de composition des AG pourrait être attribuée à la différence de température du milieu utilisée pour la culture de la spiruline. Selon eux, lorsque la température du milieu augmente, la teneur en cellules lipidiques augmente considérablement et la composition en AG tend à se modifier vers un degré de saturation plus élevé (la biosynthèse de l'AGL est progressivement entravée alors que l'AL s'accumule). D'après Mühling *et al.* (2005), il existe des différences considérables dans la composition des AG, en particulier dans la fraction d'AGPI, parmi les souches de *Spirulina*.

En ce qui concerne l'acide alpha-linolénique (ALA, 18: 3n-3) ou (ω -3), nous avons constaté l'absence des ω -3 dans toutes les souches étudiées. Il est rapporté dans la littérature que *A. platensis*, par rapport à d'autres microalgues, ne possède pas, en général d'acides gras ALA (ou ω -3) (Kent *et al.*, 2015). Selon Jourdan, (2011), il ne devrait pas y avoir d'ALA dans la spiruline et s'il en existe, c'est que la spiruline est contaminée par une autre cyanobactérie.

Les teneurs d'acide arachidique (AA, 20: 0) dans les souches étudiées sont élevées avec une variation significative ($p < 0,05$) allant de 10,24 à 15,71 %. Cependant, la spiruline 3 présente une teneur plus faible d'AA (3,75 %). Néanmoins, cette valeur d'AA dans *Spirulina* 3 est d'une quantité raisonnablement élevée, puisque les souches *Spirulina platensis* étudiées par Tokus, Oglu et Ünal (2003) ne contiennent aucune quantité d'AA. En outre, la quantité d'AA de toutes les spirulines étudiées est bien supérieure à celle trouvées dans d'autres microalgues (*Chlorella vulgaris* et d'*Ichochrisis galbana* avec respectivement 0,19 % et 0,74 %).

Mühling *et al.* (2005), ont également remarqué que les conditions de croissance des microalgues pourraient affecter considérablement la teneur en acides gras. Par exemple, une forte intensité lumineuse et une température élevée favorisent l'accumulation d'AG saturés (Floreto *et al.*, 1993) et (Van Wagenen *et al.*, 2012). Alors que les faibles intensités de lumière et les basses températures favorisent la synthèse d'AGPI (Guschina, 2006).

Le tableau 2.4, présente la somme des acides gras monoinsaturés (AGMI), polyinsaturés (AGPI) et saturés (AGS) dans les souches de *Spirulina* étudiées. Les spirulines contiennent de grandes quantités de ω -6 et des traces de (ω -3). Les AGPI dans les échantillons étudiés se situent entre 23 et 24,5 %, sauf dans la spiruline 3, qui n'en présente que 10,59 %. Les quantités d' ω -6 dans *Spirulina* 1, 2, 4 et 5 sont presque identiques à celles rapportées par Kent *et al.* (2015), (20,04 % de ω -6 dans *Spirulina*).

Les AGPI les plus importants dans les échantillons de spiruline étudiés dans ce présent travail, sont l'acide linoléique et l'acide Gamma-linolénique (ω -6). Simopoulos (2008), a montré que l'équilibre entre les ω -6 et ω -3 dans les aliments est essentiel pour la santé humaine, et des rapports ω -6 / ω -3 élevés ont été impliqués dans les risques élevés de cancer, maladies cardiovasculaires et inflammatoires. Le même auteur a recommandé un ratio optimal

de ω -6 / ω -3 de 1/1 à 4/1 comme étant le ratio le plus bénéfique pour la santé humaine, alors que généralement notre régime alimentaire a un ratio compris entre 15/1 et 16,7 /1. Cependant, dans cette étude, le rapport ω -6 / ω -3, n'a pas pu être défini en raison de l'absence des ω -3 dans les spirulines étudiées (tableau 2.4). Les mêmes observations ont été rapportées par Kent *et al.* (2015). Cependant, la carence en ω -3 dans notre régime alimentaire doivent être complétés par d'autres aliments riches principalement d' ω -3 et des AGPI tels que les noix et les poissons. Cependant, de nombreux chercheurs ont signalé que la spiruline est l'une des meilleures sources alimentaires d' ω -6 (Capelli et Cysewski, 2010 ; Vo *et al.*, 2015).

Tableau 2.4 : AGS, AGMI, AGPI, ω 3, ω 6 (en pour cent des lipides totaux)*.

| Acides gras | <i>Spirulina 1</i> | <i>Spirulina 2</i> | <i>Spirulina 3</i> | <i>Spirulina 4</i> | <i>Spirulina 5</i> |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Σ AGS | 62,94 | 65,66 | 80,31 | 66,17 | 64,54 |
| Σ AGMI | 12,58 | 10,57 | 9,11 | 10,70 | 10,94 |
| Σ AGPI | 24,48 | 23,77 | 10,59 | 23,13 | 24,52 |
| $\Sigma\omega$ -3 | 0,01 | - | - | - | 0,20 |
| $\Sigma\omega$ -6 | 24,48 | 23,77 | 10,59 | 23,13 | 24,32 |

* Résultats n'incluent pas l'écart type.

2.4.2.3 Composition en éléments minéraux et métaux lourds

Les spirulines, quel que soit leur état de consommation (fraîches, séchées, sous forme de compléments alimentaires), peuvent répondre en grande partie aux besoins dont l'homme dénutri a besoin. Les oligoéléments ou éléments traces présents dans la spiruline sont le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, l'iode, le fluor, le chrome, le calcium et magnésium. Les autres éléments, en quantité plus significative, sont considérés comme des minéraux (Sguera, 2008).

Selon nos résultats, présentés dans le tableau 2.5, la spiruline constitue effectivement une source importante d'éléments minéraux. Dans notre cas, même si la quantité de ces éléments varie fortement d'une spiruline à une autre en raison des conditions physiques et chimiques de la croissance, nous pouvons les classer par ordre décroissant de la manière suivante : le sodium, le calcium, le potassium, le fer, le magnésium, Zinc, manganèse et cuivre.

Tableau 2.5 : Teneur en éléments minéraux et en métaux lourds en mg/kg de MS.

| Éléments minéraux (mg/kg) | Donnée Shabana et Arabi (2012) | <i>Spirulina 1</i> | <i>Spirulina 2</i> | <i>Spirulina 3</i> | <i>Spirulina 4</i> | <i>Spirulina 5</i> |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Na | 9000 | 9449 ±1,57 | 13484 ±0,40 | 8694 ±0,77 | 38803 ±3,01 | 38303 ±0,52 |
| Mg | 4000 | 622 ±0,20 | 1965 ±0,04 | 2265 ±0,01 | 1614 ±0,08 | 1684 ±0,01 |
| Mn | 50 | 13 ±0,00 | 154 ±0,02 | 32 ±0,00 | 9 ±0,01 | 13 ±0,00 |
| Fe | 1000 | 759 ±0,31 | 4256 ±1,21 | 1300 ±0,03 | 452 ±0,41 | 407 ±0,27 |
| K | 14000 | 7480 ±1,17 | 8102 ±1,05 | 6259 ±0,51 | 7593 ±0,97 | 7897 ±1,37 |
| Ca | 7000 | 1947 ±0,02 | 27426 ±1,85 | 41392 ±2,67 | 5376 ±0,23 | 5196 ±0,20 |
| Zn | 30 | 72 ±0,00 | 441 ±0,00 | 8 ±0,00 | 164 ±0,01 | 466 ±0,02 |
| Cu | 12 | 7 ±0,00 | 5 ±0,00 | 3 ±0,00 | 36 ±0,01 | 45 ±0,02 |
| Cr | 2,8 | 5 ±0,00 | 19 ±0,00 | 18 ±0,00 | 17 ±0,00 | 24 ±0,01 |
| Co | - | 0 ±0,00 | 8 ±0,00 | 5 ±0,00 | 3 ±0,00 | 2 ±0,00 |
| Ni | - | 5 ±0,01 | 29 ±0,01 | 20 ±0,02 | 16 ±0,04 | 19 ±0,04 |
| Cd | <= 0,5 * | 0 ±0,00 | 1 ±0,00 | 0,8 ±0,00 | 0,5 ±0,00 | 0,6 ±0,00 |
| Pb | <= 5* | 7 ±0,00 | 13 ±0,01 | 7 ±0,00 | 5 ±0,00 | 15 ±0,01 |

* Normes de la spiruline en France (Selon Arrêté du 21/12/1979) (Jourdan, 2011).

La teneur en Na des spirulines 2, 4 et 5 est très élevée (13484, 38803 et 38303 mg/kg) comparée à celle trouvée par d'autres auteurs (4500 et 9000 mg/kg) respectivement pour Falquet et Hurni (2006) et Shabana et Arabi (2012). Cette différence pourrait être due d'une part à la grande salinité du milieu et d'autre part en raison d'un manque de rinçage de l'algue fraîche avant son essorage (sachant que la teneur en sel du milieu de culture des spirulines 4 et 5 avoisine les 15 g/L).

Le taux de potassium dans les souches étudiées est très faible, il varie entre (6259 et 8102 mg/kg). Selon Jourdan (2011), la spiruline contient environ 14000 mg/kg de K.

Bensehaila *et al.*, (2015) ont dosé les éléments minéraux dans la spiruline de Tamanrasset chez qui ils ont trouvé 880 mg/kg, 9 mg/kg, 220 mg/kg, 27000 mg/kg et 20000 mg/kg, de Fe, Zn, Ca, Na et K, respectivement). Ces résultats sont différents comparés à ceux obtenus dans cette étude pour la même souche. Ceci pourrait être dû aux différences dans les conditions de culture, sachant qu'elles bioaccumulent les minéraux différemment lorsqu'elles sont cultivées dans différents milieux, à différentes températures, pH, salinité, etc.

La spiruline est connue par sa richesse en fer. La teneur en fer de nos échantillons est très variable (407 à 4256 mg/kg) avec la teneur la plus élevée observée chez la spiruline produite à Tamanrasset. Selon Falquet et Hurni (2006) la teneur en fer varie entre 600 à 6000 mg/kg. Cette teneur est très élevée soit 10 fois plus que le fer contenu dans les céréales complètes et 20 fois plus que le germe de blé qui sont pourtant classés parmi les meilleures sources de fer. Des études ont montré que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande. Il est ainsi d'un grand intérêt pour les végétariens, les sportifs, les femmes enceintes et les adolescents en phase de croissance, évitant ainsi toute carence en fer (Falquet et Hurni, 2006).

Dans la littérature, beaucoup de travaux ont été réalisés sur la composition en éléments minéraux et métaux lourds de la spiruline et les données sont très variables d'une étude à une autre (Tokus, Oglu et Ünal 2003 ; Al-Homaidan, 2006 ; Capelli *et al.*, 2010 ; Al-Dhabi, 2013 ; Bensehaila *et al.*, 2015).

La qualité sanitaire d'un produit alimentaire, quelque soit l'état dans lequel il se trouve, concerne le plan bactériologique et toxicologique. Elle doit être irréprochable n'entraînant pas, chez le consommateur, des troubles de la santé. La spiruline a une qualité unique pour neutraliser ou pour chélater des minéraux toxiques, une caractéristique qui n'est pas encore confirmée chez d'autres microalgues. C'est pour cette raison que nous avons dosé les métaux lourds : Cobalt (Co), Cadmium (Cd), Plomb (Pb) et Nickel (Ni), dans le but d'estimer la qualité toxicologique de nos spirulines.

D'après Belay, (1997), à ce jour, il n'existe pas encore de normes officielles sur les teneurs en métaux lourds pour les produits d'origine microalgale. Beaucoup de fermes ont établi leur propre « guidelines ».

Les résultats dans le tableau 2.5 montrent que la spiruline 1 (Hawaï, USA), est la seule qui ne présente pas une contamination élevée en Ni et Pb (5 et 7 mg/kg) et absence totale de Co et de Cd.

D'après les résultats obtenus, on constate que la spiruline comme tout produit d'aquaculture, accumule un grand nombre de métaux lourds présents dans son environnement. Ce désavantage oblige à une attention renforcée quant à la qualité de la

composition du milieu de culture de la spiruline ainsi qu'aux intrants utilisés, en particulier celle de l'eau.

2.4.2.4 Composition microbiologique

Avant l'examen microbiologique direct des échantillons de poudre de spiruline, une rapide analyse visuelle a permis d'apprécier l'état général de contamination. Il en ressort que la spiruline 3 du Tchad, contient de nombreux débris d'origine diverse tels que, terre sèche, plumes d'oiseaux, débris de végétaux et restes d'insectes.

Le pH des souches étudiées a été également mesuré à partir de solution préparée à 4% de poudre de spiruline. Le dénombrement de la flore microbienne dans les échantillons de spiruline donne les résultats mentionnés dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6 : Dénombrement de la microflore des souches étudiées.

| Flore microbienne UFC/g Souches | FMAT | Coliformes totaux | Levures/ Moisissures | pH à 20 °C |
|--|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Spiruline 1 | 10x10 ⁴ | Absence | < 10 | 8,37 |
| Spiruline 2 | 10,31x10 ⁴ | < 10 | < 10 | 8,67 |
| Spiruline 3 | 14,37x10 ⁶ | 5,3x10 ² | < 25 | 7,35 |
| Spiruline 4 | 10,5x10 ⁴ | < 10 | < 10 | 9,28 |
| Spiruline 5 | 10,30x10 ⁴ | < 10 | < 10 | 9,82 |
| Normes Françaises | 10x10 ⁴ | < 10 | < 10 | 7 à 9 |

Pour la flore mésophile et excepté *Spirulina* 3, les résultats de l'analyse microbiologique de toutes les poudres de spiruline répondent aux normes établies par les fermes aux USA (flore globale < 1x10⁶), en France (<1x 10⁵) et en Suède (flore globale <1x10⁷). *Spirulina* 3 présente des concentrations très élevées de la flore mésophile totale, des coliformes totaux et des levures et moisissures avec des valeurs respectives de 14,37x10⁶ UFC/g, 5,3x10² et 23 UFC/g.

Comme il a été déjà mentionné auparavant cette spiruline est cultivée et récoltée traditionnellement. Selon Sorto et Gonnet, (2007), le procédé traditionnel de dihé comprend deux étapes principales à savoir le ramassage et le séchage de dihé à même le sol. Cette pratique conduit à l'obtention d'un produit avec plusieurs types d'impuretés. La présence de sable (plus de 30%), de vers vivants, de débris de végétaux, d'animaux et d'insectes accentuent les vecteurs de transmission des germes et peuvent entraîner des infections alimentaires.

L'humidité et le pH sont des critères à prendre en considération pour évaluer le risque de contamination microbienne. Dans le milieu de culture de la spiruline, le pH est généralement élevé (> 9,5). De ce fait, la majorité des microbes dangereux pour l'homme sont normalement inactivés en deux jours. Les résultats du pH des poudres de spirulines étudiées se situent entre 7 et 9, marge de pH recommandé par les normes françaises. Le pH est d'autant plus bas si la spiruline est bien essorée avant séchage. S'il est inférieur à 5, c'est un signe de début de fermentation (Jourdan, 2011).

L'humidité des échantillons est inférieure à 9% (Tableau 2.2). Selon Jourdan (2011), aucun microorganisme dangereux ne peut survivre longtemps dans un produit à moins de 9 % d'eau correspondant à une activité de l'eau inférieure à 0,5 (< 50 % d'humidité relative dans l'air à l'équilibre avec le produit à 25 °C). Il affirme également, qu'en principe, la spiruline ne contient pas de spores, conséquence du pH du milieu de culture. Ainsi, les échantillons de spiruline séchés ont probablement été contaminés au cours du séchage à l'air libre ou lors de l'étape de broyage et de conditionnement.

Enfin, pour avoir une spiruline de bonne qualité microbiologique, il est impératif de maîtriser les règles d'hygiène classiques, de veiller à les appliquer en contrôlant avec rigueur les différentes étapes de la chaîne de production à savoir : culture, récolte et séchage. Ce respect des règles mettra les produits obtenus en conformité avec les normes bactériologiques en vigueur.

2.4.3 Composition phytochimique

2.4.3.1 Teneur en chlorophylle *a*, *b* et caroténoïdes

Les quantités de chlorophylles et de caroténoïdes observées dans cette étude sont présentées dans la figure 2.5. Le contenu de la chlorophylle *a* (Chl*a*) dans les souches de spiruline étudiées est de 6,39, 4,42, 1,79, 6,17 et 3,58 mg/g respectivement pour les spirulines 1, 2, 3, 4 et 5, avec une différence significative ($p < 0,05$). La Chl*a* est le principal pigment photosynthétique chez les microalgues par rapport à chlorophylle *b* (Chl*b*) (Richmond, 2004).

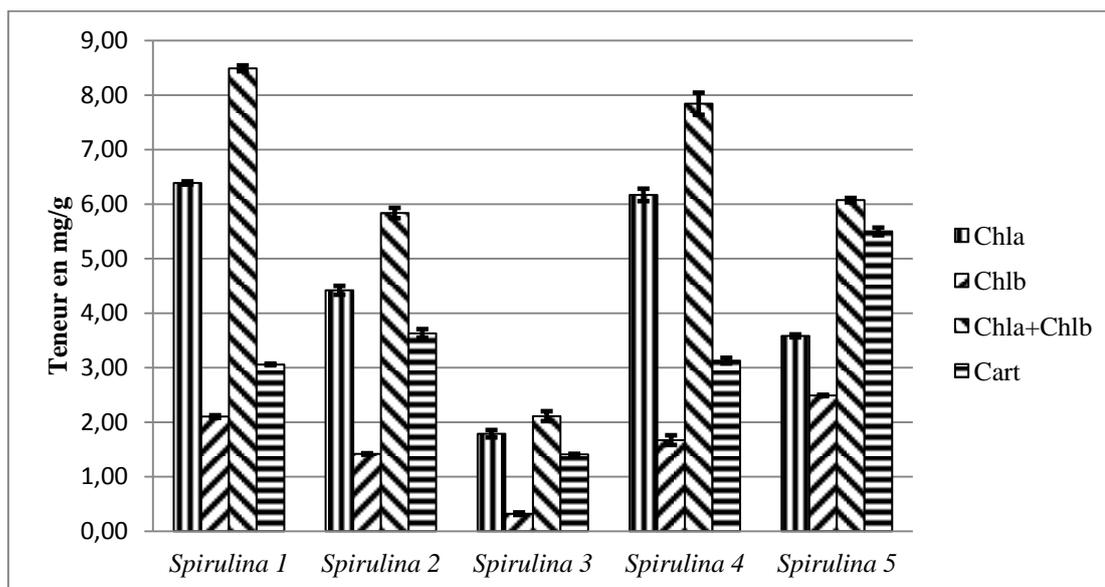


Figure 2.5 : Teneur en chlorophylle *a*, *b* et caroténoïdes en (mg/g) dans différentes souches de spiruline.

Selon Kumar *et al.* (2011), les processus métaboliques et la composition biochimique des cellules microalgales sont affectés par la température du milieu de culture et la température de croissance optimale dépend habituellement de la souche. Dans leur étude, à une température de croissance de 35 °C, la plus forte valeur de l'accumulation de Chla étant de 1,54 % alors que celle des caroténoïdes n'atteigne que 0,27 %.

El-sheikh et Al-fathy (2009), ont signalé que les conditions de croissance autotrophes et hétérotrophes peuvent affecter considérablement le contenu des phytopigments. Ils ont constaté que les teneurs en Chla dans *Chlorella vulgaris* étaient plus élevées dans les conditions de croissance d'autotrophie que dans celles de l'hétérotrophie. Pour la Chlb, la tendance était inversée.

Dans notre étude, la teneur en chlorophylles totales a été mesurée en additionnant Chla et Chlb. Les spirulines 1 et 4 contiennent des valeurs moyennes significativement plus élevées en chlorophylle, respectivement de 8,49 et 7,84 mg/g.

La teneur en caroténoïdes est plus élevée chez *Spirulina 5* (5,50 mg /g) que dans les autres échantillons. Ces valeurs sont similaires aux résultats rapportés par M'baye *et al.*

(2011) qui situaient la gamme de caroténoïdes dans 51 échantillons de spiruline mauritanienne entre 5,43 et 8,93 mg/g.

Fox (1999) et Pierlovisi (2007) ont trouvé que la teneur moyenne en phytopigments dans *Spirulina* était de 11,5, 6,8 et 3,3 mg/g, respectivement, pour les chlorophylles totales, la chlorophylle *a* et les caroténoïdes. En outre, Capelli et Cysewski (2010), ont constaté que les teneurs en chlorophylles totales et en caroténoïdes dans la spiruline sont respectivement de 10 mg/g et 5 mg/g. Cependant, Kent *et al.* (2015) ont trouvé des concentrations respectives de 12,33 mg/g et 1,45 mg/g de chlorophylles et de caroténoïdes pour la même souche. Comme mentionné ci-dessus, ces différences peuvent être dues aux conditions de croissance de *Spirulina*. Selon tous les résultats obtenus, les chlorophylles s'imposent comme le principal pigment dans la microalgue *A. platensis*, en comparaison avec les caroténoïdes.

On notera que le dosage des chlorophylles *a*, *b* et totale des algues est une méthode relativement délicate (l'incertitude des mesures est de ce fait très élevée). Nous n'avons considéré, dans notre travail que les variations relatives du contenu en chlorophylle dans les souches, et non leurs teneurs absolues. Chez les spécimens de spiruline cultivés dans les milieux naturels, la teneur en chlorophylle varie en fonction des conditions de culture (Zarrouk, 1966).

L'aspect visuel (vert plus profond) de la culture et de la poudre sèche de la spiruline 4 ainsi que la poudre sèche de la souche 1, laisse systématiquement présager une teneur en chlorophylle totale nettement supérieure que pour les souches 2 et 3 (vert moins prononcé). Pour ce qui est de la poudre, on observe une couleur allant d'un vert très foncé à un vert moins profond respectivement pour les souches, 1, 4, 5, 2 et 3 (Fig. 2.1). Cette observation est confirmée par les résultats obtenus (Fig. 2.5).

2.4.3.2 Teneur en phycobiliprotéines

La quantité de phycobiliprotéines dans les souches de spiruline est présentée dans le tableau 2.7. La phycocyanine est le pigment majeur chez *A. platensis*, avec une différence significative ($p < 0,05$) de la teneur pour tous les échantillons.

Tableau 2.7 : Teneur en phycobiliprotéines (C-PC, APC et PE) en (%), phycocyanine brute en (%) et pureté.

| Souches | C-PC | A-PC | PE | phycocyanine | Pureté |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>Spirulina</i> 1 | 8,70 ± 0,001 ^d | 7,20 ± 0,001 ^c | 2,80 ± 0,001 ^c | 29,03 ± 0,001 ^d | 1,80 ± 0,002 ^d |
| <i>Spirulina</i> 2 | 6,40 ± 0,001 ^b | 3,10 ± 0,000 ^c | 2,50 ± 0,000 ^c | 21,36 ± 0,001 ^b | 1,35 ± 0,001 ^b |
| <i>Spirulina</i> 3 | 1,80 ± 0,002 ^a | 2,20 ± 0,001 ^a | 1,30 ± 0,001 ^a | 5,33 ± 0,002 ^a | 0,40 ± 0,007 ^a |
| <i>Spirulina</i> 4 | 5,90 ± 0,002 ^b | 1,10 ± 0,001 ^b | 2,00 ± 0,001 ^b | 19,86 ± 0,002 ^b | 1,30 ± 0,006 ^b |
| <i>Spirulina</i> 5 | 7,20 ± 0,001 ^c | 5,10 ± 0,000 ^d | 3,30 ± 0,001 ^d | 24,18 ± 0,001 ^c | 1,44 ± 0,005 ^c |

Les exposants avec différentes lettres sont significativement différents à $p < 0,05$.

Les teneurs en phycoérythrine (PE) sont très faibles dans toutes les souches de spiruline étudiées. Ces résultats sont confirmés par (Bogorad, 1975 ; Tandeau de Marsac, 1983), car d'après eux, la synthèse des PE peut ne jamais être observée, ou alors seulement lorsque les souches sont soumises à une certaine qualité d'éclairement (phénomène d'adaptation chromatique complémentaire). Selon (Campanella *et al.*, 2000), la spiruline est une source considérable de pigments naturels, principalement la phycocyanine et l'allophycocyanine avec un rapport de 10 :1.

Spirulina 1 contient les plus hauts niveaux de C-PC et A-PC, respectivement avec une moyenne 8,7 et 7,2 %, suivie de *Spirulina* 5 (C-PC: 7,2%, APC: 5,1%), *Spirulina* 2 (C-PC: 6;4 %, APC: 3,1 %) et *Spirulina* 4 (C-PC: 5,9 %, APC: 1,1 %). Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Kumar *et al.* (2011), qui ont étudié l'effet de différentes températures et intensités de lumière sur la composition de pigments de *S. platensis*. Ils ont signalé que le plus haut taux de phycobiliprotéines (C-PC: 7,73%, APC: 3,46%, PE: 1,8%) a été obtenu lorsque la spiruline a été cultivée à une température de 35 °C et avec une intensité lumineuse de 2000 Lux. Cependant, Anamika *et al.* (2005) ont rapporté des valeurs supérieures de teneur en phycobiliprotéines de la spiruline (C-PC: 17,5%, APC: 3,8%, PE: 1,2%), confirmant que les conditions de croissance ont un effet significatif sur le contenu en phytopigments.

Les valeurs de la teneur en phycocyanine brute de *Spirulina* sont également présentées dans le tableau 2.7. La valeur la plus élevée a été obtenue pour *Spirulina* 1 (29,03%). À l'exception de *Spirulina* 3, les valeurs de la teneur en phycocyanine de tous les échantillons étaient supérieures à 10%. Cette dernière valeur représente le taux minimum exigé dans la

spiruline (Jourdan, 2011). Selon Cuellar-Bermudez *et al.* (2015), la phycocyanine est la phycobiliprotéine majeure chez *A. platensis* et peut constituer jusqu'à 20% de son poids sec.

Dans notre étude, la teneur moyenne de la pureté de C-PC pour toutes les souches étudiées, à l'exception de *Spirulina 3*, est supérieure à 0,7, ce qui est considéré comme une pureté de qualité alimentaire. Selon Rito-Palomares (2001), une pureté de 0,7 est considérée de grade alimentaire, 3,9 de grade réactif et supérieur à 4 de grade analytique.

2.4.3.3 Teneur en polyphénols totaux

La figure (2.6) montre la teneur en phénols totaux des souches de *Spirulina* exprimées en équivalent d'acide gallique (GAE). Les résultats ont montré que la *Spirulina 5* présente la teneur en polyphénols la plus élevée avec 67,52 mg/g de poids sec suivi de *Spirulina 1* (48,93 mg/g), *Spirulina 2* (45,22 mg/g), *Spirulina 3* (19,61 mg/g) et *Spirulina 4* (39,33 mg/g). Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Benahmed *et al.* (2015) qui ont observé une moyenne de 51,325 mg/g dans *Spirulina*.

Le travail effectué par Harwati (2013) sur les microalgues *Chlorococcum* sp. et *Nannochloropsis* sp., a montré que la teneur totale en phénol de ces espèces était respectivement de 2,41 et 2,05 mg/g de poids sec. Alors que Li *et al.* (2007), ont signalé que *Chlamydomonas rivialis* et *Chlorella vulgaris* avaient un contenu phénolique total relativement élevé (> 15 mg GAE/g). Selon ces auteurs, la composition du milieu a une influence significative sur la teneur totale en polyphénols des microalgues. En comparant nos résultats à ceux obtenus pour d'autres microalgues et d'autres fruits (les raisins, les pommes, les poires, les cerises et les baies qui contiennent seulement 2-3 mg/g de polyphénols), la microalgue *Spirulina* est une source considérable de polyphénols (Scalbert *et al.* 2005).

Selon Al-Dhabi et Arasu (2016), le taux le plus élevé de polyphénols (24 mg/g) a été observé dans des comprimés de spiruline obtenus auprès de la source Naturals, Inc., Santa Cruz, Californie. Miranda *et al.* (1998) dans Al-Dhabi et Arasu (2016) ont affirmé que les principaux composés phénoliques généralement présents dans *Spirulina* sont l'acide chlorogénique, l'acide synaptique, l'acide salicylique, l'acide trans-cinnamique et l'acide caféique. Ces polyphénols contiennent les structures chimiques idéales possédant des propriétés anti-inflammatoires, antivirales, anti-oxydantes, anti-thrombotiques, vasodilatatrices et anti-cancérigènes.

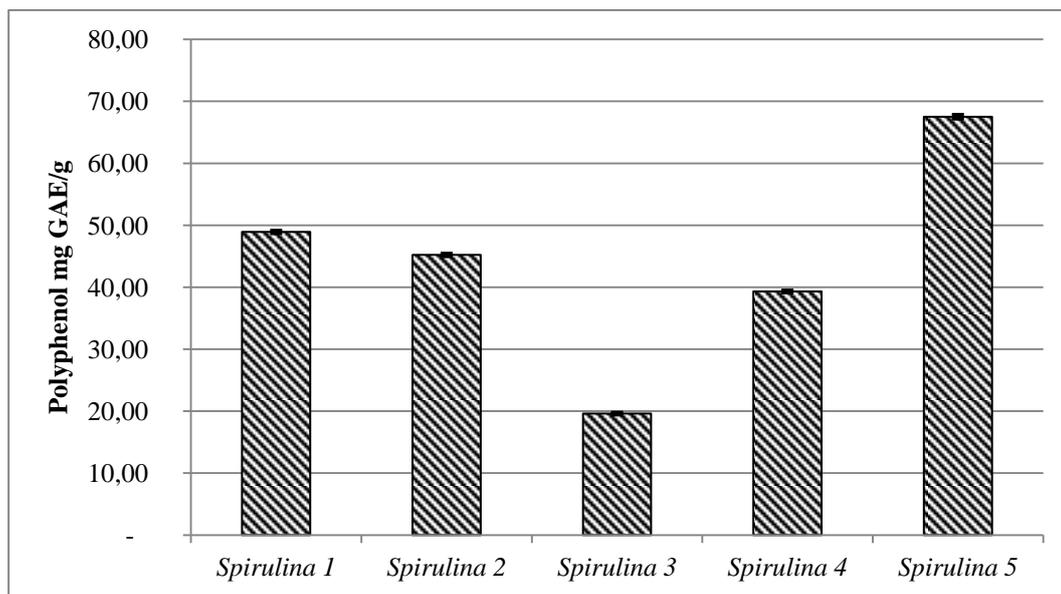


Figure 2.6 : Teneur en polyphénols de différentes souches de spiruline.

2.5 Conclusion

Cette étude nous a permis de caractériser différentes souches de spiruline provenant d'Algérie, du Tchad et des États-Unis. Il ressort de celle-ci que les conditions de culture, qu'elles soient naturelles ou artificielles, peuvent influencer de façon significative sur la composition nutritionnelle aussi bien qualitativement que quantitativement.

La majorité des souches de spiruline testées présentent un excellent profil nutritionnel, riches en phytopigments (phycocyanine, caroténoïdes et polyphénols) et en éléments minéraux, ce qui leur confère un grand intérêt nutritionnel et thérapeutique. Cependant certaines souches (ex : *Spirulina 3* ou "Dihé") présente une composition nutritionnelle plus ou moins faible. Par rapport aux autres souches, les spirulines (1 et 5) ont une composition biochimique et phytochimique très intéressante car riche en antioxydants. Par conséquent, il est fortement recommandé d'utiliser des souches de spiruline cultivées dans des conditions de croissance contrôlées permettant ainsi l'augmentation de la production de composés nutritifs et bioactifs utilisés à des fins nutraceutiques.

TEXTE DE CONNEXION

Selon les résultats du chapitre précédent, il est largement établi que les variations des conditions de culture provoquent facilement d'importants changements dans la composition biochimique des spirulines. Cependant, en moyenne, la souche locale de Tamanrasset (HTam) cultivée dans des conditions contrôlées présente une bonne composition nutritionnelle et riche en composés bioactifs principalement en phycocyanines. Dans le chapitre suivant, nous allons utiliser cette souche (dont le but de valoriser les souches endémiques de terroir) pour l'extraction des phycobiliprotéines, en employant différentes méthodes de désintégration cellulaire.

3.1 Résumé

Parmi les méthodes innovatrices de rupture cellulaire, le traitement par champ électrique pulsé (CEP) est largement utilisé pour la désintégration des cellules et l'extraction des composants intracellulaires. Le but de cette étude est d'étudier l'effet de l'intensité du CEP sur l'extraction des composés bioactifs à savoir les phycobiliprotéines, à partir d'une cyanobactérie *Arthrospira platensis*, originaire de l'extrême sud Algérien (Tamanrasset). Le traitement par les ultrasons (US) et congélation/décongélation ont également été utilisés comme moyen de désintégration cellulaire en comparaison avec le CEP. La microalgue a été cultivée dans le milieu Zarrouk, dans des conditions contrôlées, récoltée et mise en suspension dans un tampon phosphate (pH = 7) puis traitées. Deux types de traitement par CEP ont été effectués (statique et en continu) avec, respectivement, une intensité de (2,5, 3,5 kV/cm) et de 46 kV/cm. Le traitement en mode continu de la suspension algale a été effectué dans une chambre de traitement de type co-field ayant, respectivement, un volume de traitement et un intervalle entre les électrodes de 0,05 cm³ et 0,1 cm. La durée totale du traitement est de 0,3 ms pour le traitement continu et entre (13,5 - 81 ms) pour le traitement discontinu. En ce qui concerne le traitement par les US, les suspensions algales ont été soumises à une fréquence de 35 kHz pendant un temps allant de 30 à 90 min. Les concentrations maximales des phycobiliprotéines obtenues sont (0,163, 0,173, 0,178, 0,133 et 0,175 g/L), avec une efficacité d'extraction 90,79, 96,36, 99,14, 74,63 et 97,64 %) respectivement, pour CEP à 2, 3,5 et 46 kV/cm, Cong/décong et US. La pureté du produit est légèrement plus élevée dans la biomasse traitée par le CEP que dans celle traitée par les US et cong/décong (respectivement, 0,53 contre 0,45 et 0,34). Cependant, le CEP en mode continu est plus efficace que les US puisqu'il permet d'avoir le même rendement d'extraction et une pureté plus élevée mais en appliquant un temps de traitement inférieur (0,003 vs. 5400 s), avec une consommation d'énergie moindre. Les densités d'énergie pour les différents traitements : congé/décong, US, CEP statique et continu sont respectivement (172,8, 81, 0,353 et 0,052 kJ/mL).

Mots clés : Champ électrique pulsé, Ultrasons, phycobiliprotéines, densité d'énergie.

3.2 Introduction

De nos jours, les composés bioactifs sont largement utilisés dans les industries pharmaceutique et alimentaire comme médicaments naturels et compléments alimentaires. Ils remplacent les produits chimiques qui ont un effet néfaste sur la santé humaine. Comparés aux produits alimentaires provenant des plantes et des animaux, plusieurs études ont montré que les microalgues présentaient des quantités très élevées de composés fonctionnels (Richmond, 2004 ; Pulz et Gross, 2004 ; Andersen, 2005).

Parmi ces microalgues, *Arthrospira platensis*, est très intéressante car elle contient tous les nutriments et composants bioactifs nécessaires pour notre organisme (Gouveia *et al.* 2009). Elle contient également toute une gamme de pigments photosynthétiques (les chlorophylles, les caroténoïdes et d'autres pigments antennes les phycobiliprotéines) dont le rôle dans les étapes primaires de la photosynthèse est essentiel. Les phycobiliprotéines sont des complexes protéine-pigment composés principalement de 80 à 85% de polypeptides brillamment colorés (Szalontai, *et al.*, 1994).

Les phycobiliprotéines sont constituées de trois sous-unités: l'allophycocyanine (APC), la phycocyanine (C-PC) et la phycoérythrine (PE). La C-PC est un pigment essentiel car en plus de représenter près de la moitié du poids des phycobiliprotéines, il correspond à environ 20% du poids sec de la spiruline (Chaiklahan *et al.*, 2011 ; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2012).

En général, la désignation « les phycocyanines » inclue la C-PC et l'APC. Ce pigment, de couleur bleue revêt un grand intérêt commercial et industriel. Il est non seulement largement utilisé comme colorant alimentaire et en cosmétologie, mais est aussi utilisé comme marqueur fluorescent dans la recherche médicale. De même, c'est un agent thérapeutique dans les maladies induites par le stress oxydatif (Chen *et al.*, 2014). En conséquence, les phycobiliprotéines ainsi que tous ces composants antioxydants principalement la C-PC, doivent être extraits des cellules de la spiruline.

La C-PC est formée de deux sous-unités protéiques α et β , qui ont, respectivement un poids moléculaire de 18,0 et 20,0 kDa (Abd El Baky et El-Baroty, 2013). Il s'agit cependant d'une molécule thermosensible, compliquée à extraire donc coûteuse. L'obtention de cette molécule avec un rendement et une pureté élevés est possible grâce au développement de

méthodes bien ajustées. Celles-ci sont des méthodes de bio-séparation efficaces, préservant les propriétés de la phycocyanine, tout en étant respectueuses de l'environnement et économiques à l'échelle industrielle. De plus, la condition d'obtenir une C-PC d'une grande pureté avec un bon rendement est de l'extraire à partir de la biomasse fraîche. Sarada *et al.*, (1999) ont rapporté que le séchage de la biomasse d'*A. platensis* entraîne une perte d'environ 50% de C-phycocyanine.

Beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'étude et au développement de nouvelles méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline en réduisant au maximum l'impact sur le contenu nutritionnel et la qualité des composés extraits. De ce fait, plusieurs techniques sont adoptées pour extraire les produits bioactifs de la spiruline telles que la congélation/décongélation, la sonication, l'acidification et d'autres technologies innovantes telles que la haute pression hydrostatique (HPH) et les champs électriques pulsés (CEP) (Manirafasha *et al.*, 2016).

La technologie du CEP consiste en l'application de courtes pulsations (variant de quelques microsecondes à millisecondes) de champs électriques d'intensité élevée de l'ordre de 20 à 80 kV/cm. L'application de champs électriques de courte durée est capable d'induire la perméabilisation de la membrane cellulaire par un phénomène appelé «électroporation» (Asavasanti *et al.* 2011).

Selon l'intensité du champ électrique appliqué aux cellules, la formation de pores peut être réversible ou irréversible. Le champ électrique, qui provoque la lyse des cellules grâce au phénomène d'électroporation, peut être appliqué sous forme de pulsations exponentiellement décroissantes, carrées, bipolaires ou oscillantes, réalisées à température ambiante ou sous-ambiante (Amiali et Ngadi, 2012).

Les ultrasons (US) sont une forme d'énergie générée par des ondes sonores de fréquences trop élevées pour être détectées par l'oreille humaine, au-dessus de 16 kHz (Jayasooriya *et al.*, 2004). Lorsque les ultrasons sont appliqués, la rupture des cellules microalgales se produit grâce à un phénomène de cavitation. Au cours du traitement, des bulles d'air se forment et grossissent puis s'effondrent près des parois cellulaires, provoquant ainsi des dommages et libérant le contenu des cellules (Lee *et al.*, 2013).

Le principal avantage de l'extraction de ces antioxydants à partir de la spiruline par les technologies de CEP et US est, la facilité d'extraction sans risque de dénaturation de l'extrait.

L'objectif de cette étude est donc de comparer entre l'efficacité du CEP, des US et de la congélation/décongélation sur le rendement d'extraction des phycobiliprotéines à partir de la spiruline fraîche.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Matériel biologique

La culture de spiruline (HTam) nous a été fournie par un producteur local dans la région de Tamanrasset (Sud Algérien). La souche a été cultivée, au sein de notre laboratoire, dans le milieu Zarrouk (Annexe.1).

3.3.2 Conditions et contrôle de la culture

Le milieu Zarrouk (MZ) a initialement été inoculé avec une concentration de cellules de 8×10^5 cellules/mL, correspondant à une concentration de 0,06 g /L. La culture est mise sous agitation à l'aide d'une pompe à air d'un débit de 25 ml/min et sous une intensité lumineuse optimale de 2500 Lux (fournie par des tubes fluorescents de lumière blanche), avec un rapport lumière / obscurité de 12:12 heures. Le flux lumineux a été déterminé grâce à un luxmètre portable (marque KIMO, modèle LX 200, Canada), d'une précision de lecture allant de 0,1 à 200000 Lux.

La température de la culture est maintenue à environ 30 °C grâce à un thermostat. Le pH de la culture est mesuré en utilisant un pH mètre portable (modèle 315i / SET, Corning, Inc., NY, USA). La conductivité électrique (σ) et la salinité sont mesurées grâce à un conductimètre (modèle 197i WTW, Weilheim, Allemagne). La mesure de la croissance de *Spirulina* a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre UV / VIS (JENWAY Genova plus, Staffordshire, UK) à la longueur d'onde de 560 nm et calculée par la formule 3.1 (Zarrouk, 1966).

$$C_b = 0.7 \times DO_{560} \quad \text{Equation 3.1}$$

Où ;

C_b est la concentration en biomasse (g/L) ;

DO est la densité optique avec 1 unité d'absorbance représente 0,7g/L de spiruline.

La densité cellulaire a été déterminée en utilisant un microscope optique (Optech linear Biostar B4, München, Allemagne) et la cellule de Nageotte pour le comptage. La pureté et l'identification de la culture se faisaient systématiquement en utilisant le microscope optique. Les paramètres physico-chimiques de la culture sont présentés dans le tableau (3.1).

Tableau 3.1 : Les paramètres physico-chimiques de la culture de la spiruline.

| Température (°C) | pH | Salinité (g/L) | Conductivité électrique (mS/cm) |
|------------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| 30,22 ± 1,46 | 9,85 ± 0,11 | 19,33 ± 1,38 | 31,03 ± 1,87 |

3.3.3 Coloration de Gram

Pour déterminer le type de cellules d'*Arthrospira*, nous avons réalisé la coloration de Gram comme suit :

- Réalisation du frottis : on agite la suspension algale afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. À l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisée (avec la flamme du bec bunsen), on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de l'anse dans le tube à essai. On dépose ensuite le prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- Fixation du frottis : On procède à la fixation du frottis on faisant passer directement la lame 3 fois dans la flamme du bec bunsen.
- 1^{re} coloration au violet de Gentiane (colorant basique) : la lame est plongée pendant 2 minutes dans le colorant violet de Gentiane.
- Mordançage au Lugol (solution iodo-iodurée) : On étale le lugol et on le laisse agir 45 secondes. On répète l'opération une deuxième fois puis on rince à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- Décoloration à l'alcool : On plonge la lame dans l'alcool et on laisse agir pendant 30 secondes exactement. On rince la lame sous un filet d'eau déminéralisée. Si l'alcool traverse la paroi, les cellules se décolorent, on est en présence de bactéries Gram-, par contre si l'alcool ne traverse pas la paroi, il s'agit de bactéries Gram+.
- 2^e coloration à la Fuchsine (colorant de contraste): On plonge la lame dans la fuchsine et on laisse agir 2 minutes. On lave doucement la lame à l'eau déminéralisée puis on la

sèche à 15 à 20 cm de la flamme du bec bunsen. On observe au microscope optique. Après cette étape, les bactéries Gram- sont colorées en rose.

3.3.4 Extraction des phycobiliprotéines

3.3.4.1 Préparation de l'échantillon

Afin d'avoir une biomasse cellulaire importante, l'algue est récoltée entre les 17^e et 23^e jours, durant la phase exponentielle de croissance (la concentration de la biomasse étant de 0,6 g /L). L'extraction des phycobiliprotéines par les différents procédés s'effectue à partir de cette biomasse fraîche.

La suspension algale est centrifugée à 6000 tr/min pendant 30 minutes par une centrifugeuse type (KSEROA Monaco, n ° 4222). Environ 5g de la biomasse collectée est remise en suspension dans 50 mL d'un tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 7,0) (voir Annexe 6). La conductivité électrique initiale du tampon est de 0,78 mS/cm. Après l'ajout de la biomasse algale dans le tampon, la conductivité σ atteint 0,88 mS /cm. Les échantillons ainsi préparés vont subir les différents types de traitement réalisés au cours de cette étude.

3.3.4.2 Extraction conventionnelle par congélation/décongélation

Après préparation des échantillons, ces derniers sont congelés à -18 °C pendant 24 heures dans un congélateur (Maxwell, Modèle KIL 24 V 30, USA) puis décongelé à température ambiante (18-25 °C). Le congélateur possède un pouvoir de congélation de 2 kg/24 heures et une consommation énergétique de 200 Watt.

3.3.4.3 Traitement statique par CEP

Le traitement par CEP de la microalgue a été réalisé au niveau du laboratoire de technologie alimentaire (ENSA), en utilisant un générateur de champ électrique pulsé de 10 kV. La tension à la sortie du générateur à haute tension est alors redressée par des diodes (12 diodes de 1 kV chacune) pour charger un condensateur. Pour redresser une tension de 10 kV, on met en série au moins 10 diodes de 1000 V chacune, pour avoir une diode haute tension de 10 kV. Deux types de condensateur sont utilisés pour chacun des deux traitements, statique et en continu. La capacitance (C) des condensateurs de décharge est de 1 μ F pour un traitement statique et de 0,02 μ F pour un traitement en continu.

Un oscilloscope digital (Siglent, SD1102CML, Chine) est utilisé pour la lecture des paramètres, à savoir : la tension (V), le courant (I), la fréquence (f) et la durée de pulsation (τ), grâce à une sonde de tension (Tektronix, modèle P6015A 40 kV, 75 MHz, 100 M Ohm, USA) et à une sonde de courant (Pearson current monitor 410, USA). L'installation du champ électrique est faite de sorte à produire des pulsations de type exponentiel de déclin ou décroissance exponentielle (Figure 3.1).

Pour le montage statique, la microalgue a été traitée dans une chambre de traitement à électrodes parallèles ayant un volume de 15 cm^3 et un intervalle entre les électrodes de 1 cm (Figure 3.2). L'intensité du champ électrique pour le traitement statique est de 2 et 3,5 kV/cm avec une fréquence de 3 Hz. Pendant des temps de traitement de 13,5 ms, 27 ms, 40,5 ms, 54 ms, 67,5 ms, 81 ms. La température du milieu de traitement est surveillée par un thermocouple (Thermocouple Extech double K / JTM 300, Nashua, NH, États-Unis) avant et après le traitement par CEP, pour éviter le chauffage de la suspension.

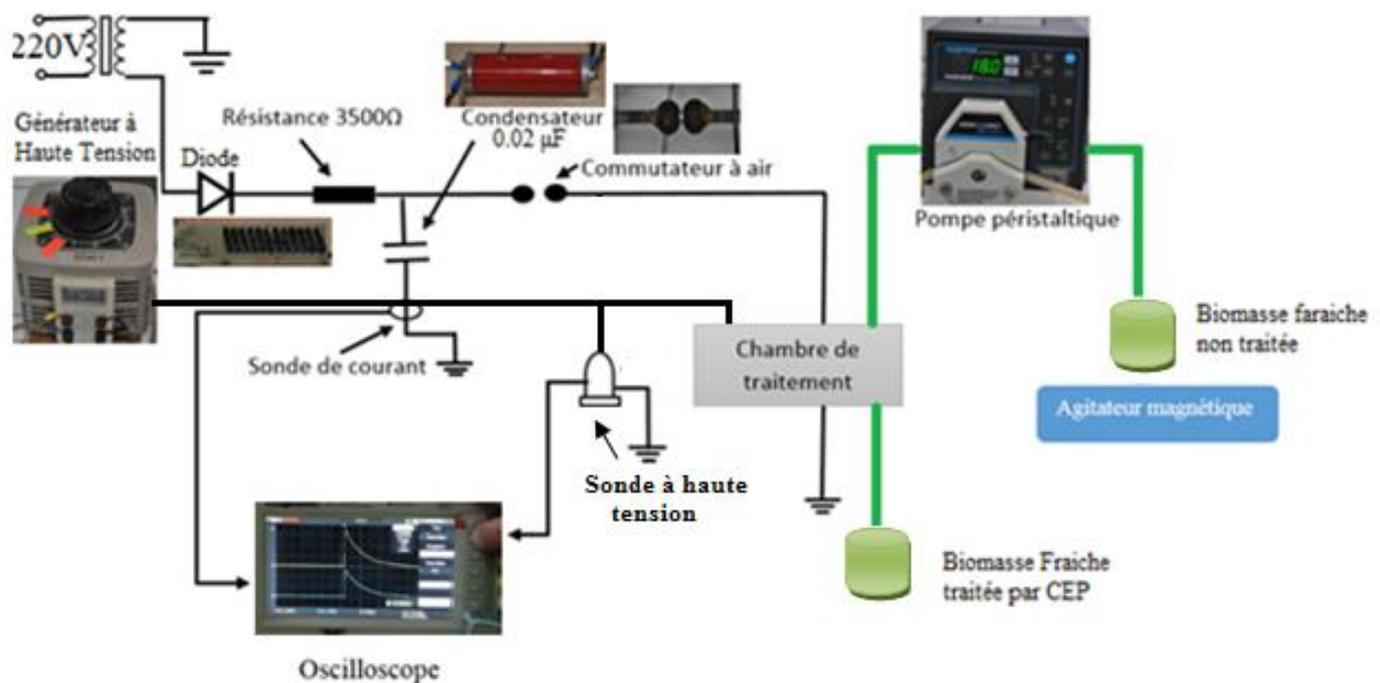


Figure 3.1 : Circuit électrique d'une installation d'un traitement par CEP en continu.

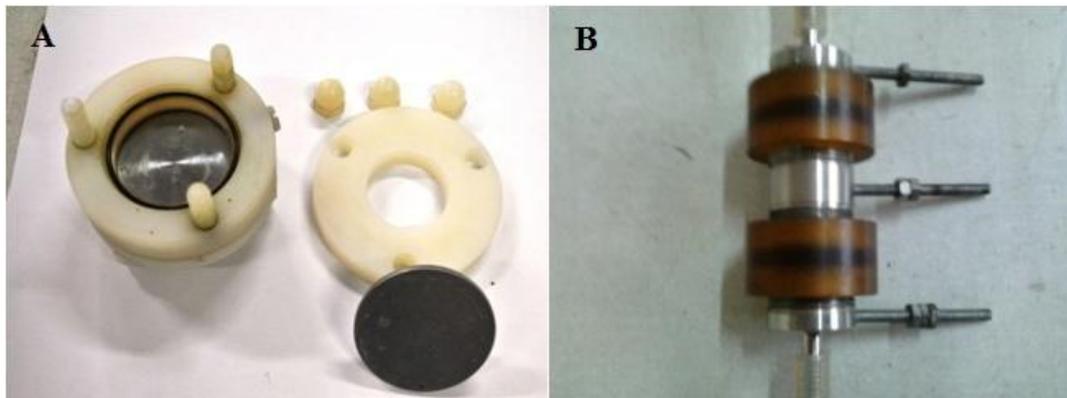


Figure 3.2 : Type de chambre de traitement par CEP. A : chambre statique, B : chambre continue type cofield.

3.3.4.4 Traitement en mode continu par CEP

Le traitement en mode continu est montré dans la figure (3.1). 100 mL de la suspension algale, ont été traités en continu en utilisant une chambre de traitement de type cofield avec deux petites chambres d'un volume égal calculé par l'équation 3.2, et d'un intervalle entre les électrodes de 0,1 cm chacune (Figure 3.2).

$$v = \pi R^2 h \quad \text{Equation 3.2}$$

Où;

v : volume de la chambre de traitement

R : diamètre = 0,4 cm

h : intervalle entre les électrodes = 0,1 cm

Donc le volume de chaque chambre de traitement est égal à : $v = 0,05204 \text{ cm}^3$.

La suspension algale est envoyée à la chambre de traitement à l'aide d'une pompe péristaltique (Carter Cassette pump Manostat, USA) à un débit (F) de 0,61 mL/s, qui garantit qu'aucune bulle d'air n'est présente dans le tube pendant la procédure. L'intensité du champ électrique pour le traitement continu est de 46 kV/cm ($25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). Le nombre de pulsation total (n) appliqué à chaque passage à travers la chambre de traitement est déterminé par l'équation 4.3 :

$$n = \frac{f \times v}{F} \quad \text{Equation 4.3}$$

Où : f est la fréquence (Hz), v le volume total de la chambre de traitement (mL) et F le débit de la suspension (mL/s).

La fréquence est d'environ 158 Hz et la durée de pulsation (τ) est de 23 μ s ; ces valeurs étant données par l'oscilloscope.

Le temps de traitement (t) à chaque passage du volume traité est déterminé par l'équation (4.4).

$$t = n \times \tau \quad \text{Equation 4.4}$$

Les paramètres de traitement par CEP en mode continu sont résumés dans le tableau (3.2).

Tableau 3.2 : Paramètres du traitement par CEP en continu.

| F (mL/s) | E (kV/cm) | τ (μ s) | I (A) | f (Hz) | n | t (μ s) |
|----------|-----------|-------------------|-------|----------|----|--------------|
| 0,61 | 46 | 23 | 14,6 | 158 | 13 | 300 |

3.3.4.5 Traitement par les ultrasons

La préparation des échantillons s'effectue de la même manière que celle du traitement par CEP. Le traitement par les ultrasons est réalisé en utilisant un appareil à ultrasons de type (Laborette 17, Germany), ayant une fréquence de 35 kHz et une puissance de 750 W.

Des erlenmeyers contenant 50 mL de la suspension algale, sont partiellement immergés dans le bain ultrasonique, puis traités pendant des durées différentes de 30, 60 et 90 min. Pour augmenter l'efficacité de l'extraction des phycobiliprotéines, environ 2 g de billes en verre ont été rajoutés.

3.3.5 Dosage des phycobiliprotéines

Après chaque traitement la suspension algale est centrifugée à 6000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants sont récupérés pour l'analyse spectrophotométrique. Les teneurs de pigments hydrosolubles des phycobiliprotéines à savoir l'allophycocyanine (APC), la phycocyanine (C-PC) et la phycoérythrine (PE) ainsi que la pureté de la C-PC, sont mesurés selon les équations décrites par Anamika *et al.*, (2005) (Voir Chapitre II). L'efficacité de l'extraction est calculée en utilisant l'équation 3.4 décrite par Kilpatrick (1985).

$$EE = \frac{A_{545}(\text{surnageant})}{[(A_{545}(\text{suspension}) - A_{750}(\text{suspension}))]} \quad \text{Equation 3.4}$$

3.3.6 Mesure de la densité d'énergie

La densité d'énergie (Q_e) est exprimée en (kJ/mL). Pour les traitements par CEP elle est mesurée par l'équation 1.11 (voir chapitre .I)

$$Q_e = \frac{V_0^2 C_0 n}{2v} = \frac{V_0^2 t}{2Rv} \quad \text{Equation 1.11}$$

Concernat l'énergie délivrée par la congélation/décongélation et les ultrasons, celle-ci est mesurée par l'équation 1.6 (chapitre I) et la densité d'énergie par l'équation 3.5 :

$$W_{(t)} = \int_0^t P_{(t)} \times d_{(t)} \quad \text{Equation 1.6}$$

P : puissance (W) ;

W : énergie (J);

d: temps (s).

$$Q_e = W/v \quad \text{Equation 3.5}$$

v est le volume de la suspension (mL).

3.3.7 Analyse statistique

Trois mesures de répétition ont été effectuées pour chaque paramètre et les moyennes sont représentées ainsi que l'écart-type. La différence est calculée par l'ANOVA et les valeurs $p < 0,05$ sont considérées significatives. L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée en utilisant les modèles linéaires généraux du logiciel STATGRAPHICS Centurion XVI.II (STATPOINT Technologies, Inc. www.STATGRAPHICS.com). Le modèle linéaire définie par l'équation $Y=b_0+b_1X$. Cette équation nous indique que la variable Y peut être exprimée en termes d'une constante (b_0) et d'une pente (b_1) multipliée par la variable X. La constante est aussi appelée l'ordonnée à l'origine (intercept).

3.4 Résultats et discussion

3.4.1 Cinétique de la croissance bactérienne

La figure 3.3 montre l'évolution de la croissance bactérienne durant les 23 jours de culture. En général, la courbe de la croissance bactérienne en culture discontinue "en batch" est caractérisée par quatre phases à savoir : phase de latence, phase exponentielle de croissance, phase stationnaire et enfin une phase de déclin.

Dans cette étude on constate l'absence de la phase de latence. Ceci serait dû au fait que l'inoculum était déjà dans le même milieu (MZ) ne nécessitant donc pas de période d'adaptation.

Par contre la phase exponentielle de croissance est très visible dans la courbe et elle dure environ deux semaines. Au cours de cette phase le nombre des cellules est passé de 8×10^5 à 2×10^7 au 19^e jour. Au-delà du 19^e jour on assiste à une phase stationnaire durant laquelle le taux de croissance de cellules est égal à 0 ($\mu = 0$). Elle représente un équilibre entre le nombre des cellules qui meurent (à cause des conditions difficiles du milieu) et celles qui se divisent encore. Cette évolution de la croissance peut être confirmée à l'œil nu par l'observation d'une couleur vert bleuâtre foncé durant la dernière phase.

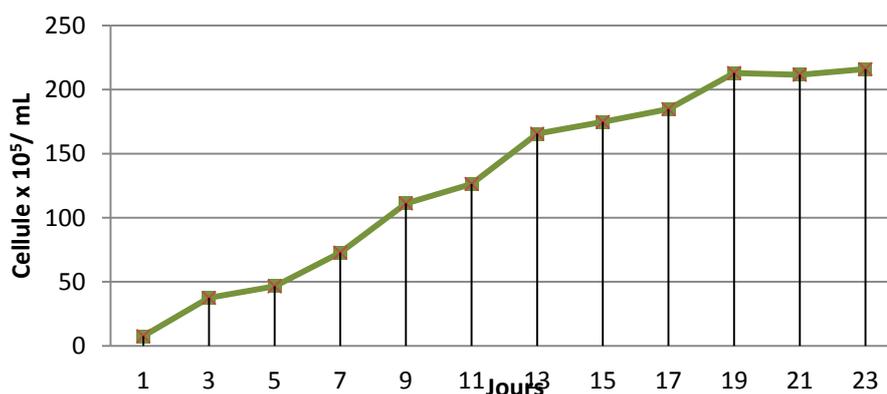


Figure 3.3 : Densité cellulaire de la spiruline exprimée en 10^5 bactéries /mL.

3.4.2 Résultat de la coloration de Gram

L'observation sous le microscope optique du frottis coloré, montre que la spiruline est colorée en rose ce qui confirme que cette microalgue appartient au groupe des bactéries Gram négatives. Selon Habib *et al.*, (2008) et Koru, (2009), la paroi des spirulines comme les bactéries Gram-négatives, est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides. Ces glucides sont composés principalement de glucose, ainsi que de rhamnose, mannose, xylose, galactose et de deux sucres inhabituels, à savoir : 2-O-méthyle-L-rhamnose et de 3-O-méthyle-L-rhamnose

L'objectif de cette analyse est très important dans la mesure où on veut déterminer la sensibilité de la spiruline vis-à-vis du traitement par le CEP. Cependant, d'après Garcia *et al.*, (2009) et Roodenburg (2011), les deux groupes de bactéries (Gram + et Gram -) ont une sensibilité différente lorsqu'elles sont exposées à un traitement par le CEP. Les bactéries Gram-positives ont une sensibilité moindre comparée à celle des Gram-négative. En outre, Hülshager *et al.* (1983) ont constaté que le champ électrique critique (E_c) pour les bactéries Gram négatives était plus faible que celui des bactéries Gram-positives, phénomène qui peut s'expliquer par la plus faible résistance des premiers.

Néanmoins, Steward et Farmer, (1984) ont montré que les parois des cellules cyanobactériennes sont épaisses et extrêmement résistantes. Elles agissent comme barrière physique lors de la libération de la phycobiliprotéine dans le milieu d'extraction. Ceci est peut-être dû au fait que certaines cellules des Cyanobactéries sont recouvertes par une gaine.

3.4.3 Résultats de l'extraction des phycobiliprotéines par les différents traitements

3.4.3.1 Traitement par CEP en mode statique

Les résultats de l'extraction phycobiliprotéines (C-PC, A-PC et PE) par le CEP, dans une chambre statique de type parallèle électrode (traitement en discontinu) sont montrés dans la figure (3.4).

D'après les résultats la quantité extraite des pigments est fonction du temps de traitement et de l'intensité du champ électrique. Effectivement selon plusieurs auteurs (Goettel *et al.*, 2013 ; Flisar *et al.*, 2014 ; Luengo *et al.*, 2014 ; Coustets *et al.*, 2014 et Grimi *et al.*, 2014), l'extraction des pigments et des constituants cellulaires augmente graduellement

avec l'augmentation du temps de traitement et de l'intensité du champ électrique, jusqu'à atteindre une teneur maximale au-delà de laquelle il n'est plus nécessaire d'utiliser des intensités plus élevées .

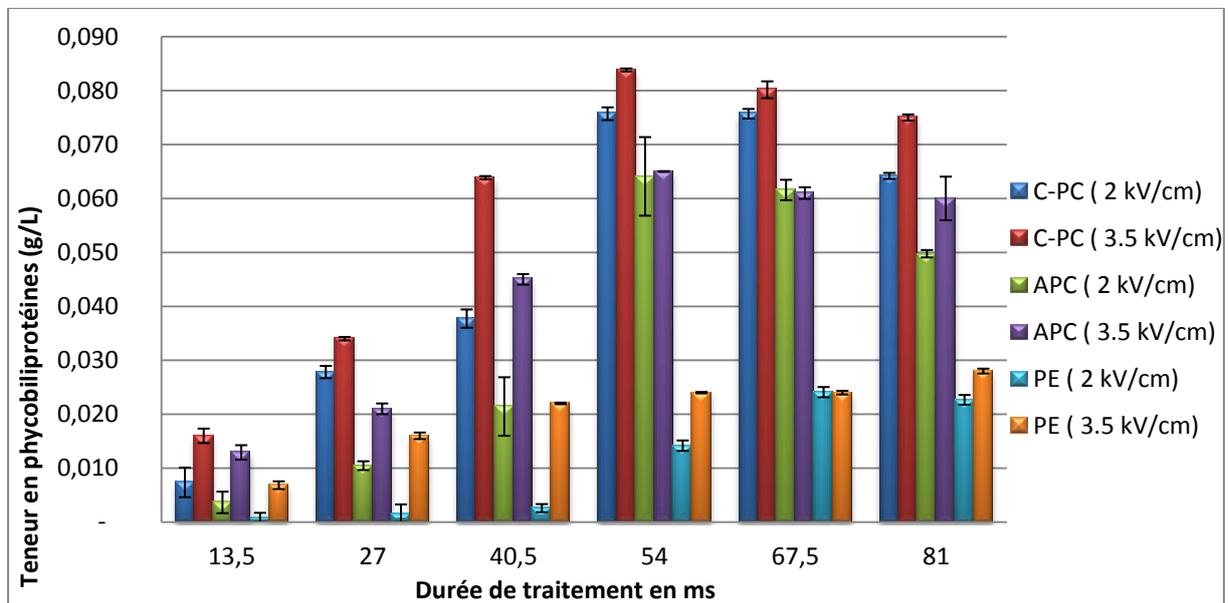


Figure 3.4 : Concentration en phycobiliprotéines avant et après le traitement statique par CEP à 2 et 3.5 kV / cm. C-PC: phycocyanine, A-PC: allophycocyanine, PE: Phycoérythrine.

Dans cette étude, les teneurs maximales en phycobiliprotéines sont obtenues pour un temps de traitement de 54 ms et une intensité de 3,5 kV/cm avec des teneurs de 0,084, 0,065 et 0,024 g/L respectivement pour C-PC, APC et PE. Exceptionnellement, la PE ne peut atteindre une concentration maximale (0,028 g/L) qu'avec une durée de traitement plus élevée égale à 67,5 ms. Dans ces conditions de traitement par CEP (3,5 kV/cm pendant 54 ms), l'efficacité de l'extraction est d'environ 96,36 % et le taux de phycobiliprotéines (PbP) totale extraite est de 17,3 %.

Cependant, pour une intensité de champ électrique de 2 kV/cm, l'extraction des PbP augmente de façon significative ($p \leq 0,05$) avec l'augmentation du temps de traitement. Les concentrations maximales en phycobiliprotéines sont obtenues pour un même temps de traitement, égal à 54 ms, avec des valeurs d'environ 0,076 g/L, 0,064 g/L et 0,023 g/L respectivement pour la C-PC, APC et PE. Dans ces conditions de traitement (2 kV/cm et 54 ms), l'efficacité de l'extraction est de 90,79 % et le taux de phycobiliprotéines totale extraite

est de 16,3 %. Ces résultats sont légèrement inférieurs que ceux obtenus pour un traitement par CEP à 3,5 kV/cm.

Nos résultats corroborent ceux de Flisar *et al* (2014) qui ont étudié l'effet d'un traitement par CEP d'une intensité de 2,7 kV/cm sur l'extraction des lipides à partir d'une microalgue : *Chlorella vulgaris*. Dans leurs expériences le temps de traitement est de 0,5, 1 et 2 heures, la biomasse a été exposée à des pulsations de l'ordre de 10, 20 et 40 et le rendement en lipides était respectivement de 23%, 31% et 32%.

Donc on peut conclure que l'effet des intensités de champ électrique sur l'efficacité de l'extraction est significatif, puisqu'elles sont d'environ plus de 96,36 vs 90,79 % pour respectivement, des traitements de 3,5 kV/cm et 2 kV/cm.

Les travaux réalisés par Coustets *et al.*, (2014), portant sur l'optimisation de l'extraction des protéines à partir des microalgues (*Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris* et *Haematococcus pluvialis*), ont montré que l'efficacité de l'extraction dépendait de l'intensité du champ électrique appliqué ainsi que de l'espèce considérée. En effet l'intensité de 3 kV/cm est efficace pour l'extraction des protéines à partir de *C. vulgaris*, alors que l'espèce *N. salina* avait besoin d'une intensité de CEP plus importante (6 kV/cm). Les auteurs ont également remarqué que l'augmentation du taux d'extraction des protéines se faisait parallèlement à celle de l'intensité du champ électrique, pour la même durée de pulsation de 2 ms.

Concernant les travaux réalisés par Luengo *et al.*, (2014), sur les effets de l'intensité du CEP et du temps de traitement sur l'extraction des Car et des Chl *a* et *b* à partir des cellules de *C. vulgaris*, il a été démontré que l'augmentation de l'intensité du CEP ainsi que celle du temps de traitement n'ont pas provoqué une augmentation significative des rendements d'extraction des trois composés.

3.4.3.2 Traitements par congélation/décongélation et par CEP en mode continu

Concernant les concentrations en phycobiliprotéines (C-PC, A-PC et PE), obtenues après le traitement par congélation/décongélation et par le CEP en continu à 46 kV/cm, nous les avons comparées au témoin (auquel aucun traitement n'a été appliqué à part la centrifugation). Les résultats sont représentés dans la figure (3.5).

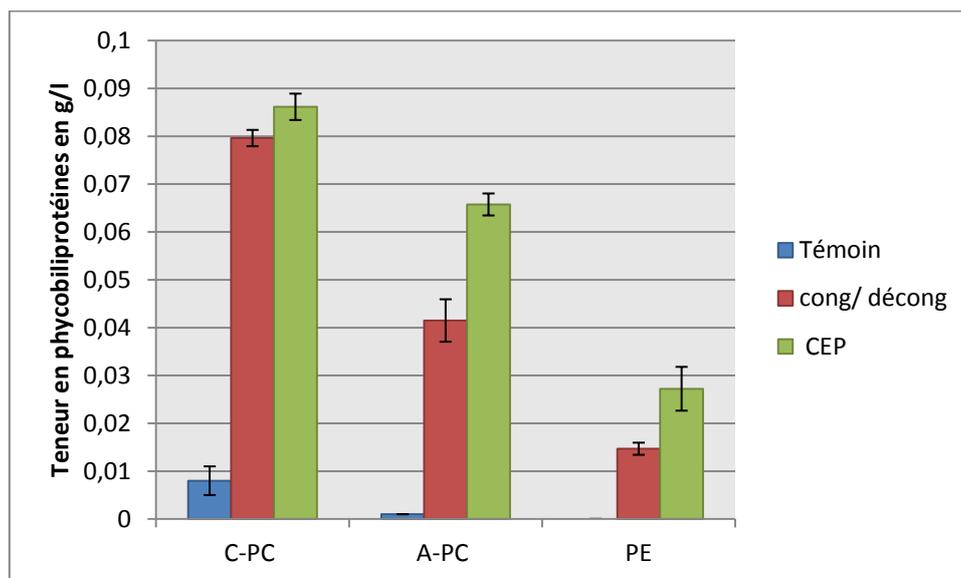


Figure 3.5 : Comparaison entre la concentration des phycobiliprotéines extraites par congélation/décongélation et par CEP en mode continu (à 46 kV/cm).

Les résultats montrent que les concentrations de C-PC, A-PC et PE après traitement par le CEP sont, respectivement, de $0,086 \pm 0,002$, $0,065 \pm 0,002$ et $0,027 \pm 0,004$ g/L. Ces valeurs sont significativement différentes ($p \leq 0,05$) de celles obtenues par les US et Cong/décong. Ceci confirme que l'application d'une forte intensité de CEP équivalente à 46 kV/cm, s'avère être plus efficace pour augmenter la lyse des membranes cellulaires et par conséquent, permet d'obtenir des concentrations de pigment plus élevée.

Ces résultats corroborent ceux de Zbinden *et al.*, (2013). Leurs travaux portant sur l'extraction des lipides à partir de la microalgue *Ankistrodesmus falcatus*, par un prétraitement de CEP à 45 kV/cm pendant une durée de 360 ns, leurs a permis d'obtenir 90 % de lyse cellulaire, soit une augmentation significative du taux de lipides extraits.

On constate également que, les échantillons traités par cong/décong, présentent des concentrations plus faibles en C-PC, A-PC et PE soient, respectivement $0,079 \pm 0,002$, $0,041$

$\pm 0,004$ et $0,014 \pm 0,001\text{g/L}$, avec un pourcentage d'efficacité de seulement 74,63 %. Comparé à ceux traités par le CEP, on peut déduire que le traitement à 46 kV/cm augmente le rendement d'extraction puisque l'efficacité est quasi égale à 100% ($> 99,14$ %). La congélation/décongélation présente une faible efficacité comparée aux autres traitements (CEP et US), ceci peut être expliqué par le fait que le traitement a été réalisé une seule fois, alors que d'autres auteurs ont procédé en appliquant à plusieurs reprises le traitement de congélation suivie par décongélation (Bermejo *et al.*, 2006 ; Soni *et al.*, 2008). D'après les travaux de Moraes *et al* (2011), entrepris pour l'extraction de la C-PC à partir de la spiruline, la biomasse a été congelée et décongelée pendant 24 et 48 heures, mais le résultat était similaire (environ 18 mg/g de C-PC extraite). Dans le second cas (48 heures), la procédure de congélation/décongélation a été répétée deux fois, avec des intervalles de 24 heures.

Au cours de la dernière décennie, certains articles sur l'extraction de la C-phycoyanine à partir de biomasse fraîche par des méthodes conventionnelles, ont été publiés (Sarada *et al.*, 1999 ; Bermejo *et al.*, 2006 et Soni *et al.*, 2008,). Dans tous les cas, la congélation/décongélation était considérée comme la méthode la plus rentable, puisqu'elle permettait d'obtenir une teneur en C-phycoyanine extraite, plus élevée que par les autres méthodes étudiées (Bermejo *et al.*, 2006 ; Soni *et al.*, 2008). La congélation/décongélation présente l'avantage d'être simple, rapide (10-12 heures), reproductible, robuste (indépendante de la quantité de biomasse), exempte de problèmes liés aux matériaux corrosifs et aussi sans présenter de pertes significatives de la capacité biologique de la protéine extraite (Manirafasha *et al.*, 2016).

Au cours de cette décennie et dans un souci de meilleure rentabilité, les recherches se sont beaucoup plus focalisées sur l'extraction des composés bioactifs à partir des microalgues, en utilisant d'autres méthodes plus innovantes, principalement le CEP.

Les travaux réalisés par Luengo *et al.*, (2014) ont montré que l'application d'une intensité de 15 kV/cm pendant 75 μs , améliorerait le rendement d'extraction des caroténoïdes et des chlorophylles *a* et *b*, respectivement, de 104 %, 142 %, et 176 %, , alors que pour la même durée, mais avec une intensité de 20 kV/cm, le rendement d'extraction passait respectivement à 124 %, 164 % et 218 %, soit une augmentation significative de la rentabilité.

Qin *et al.*, (2014), ont montré que le traitement de la spiruline, aux intensités 33,3 kV/cm et 66,7 kV/cm provoquait son inactivation. Ils ont également trouvé que la croissance de la microalgue était arrêtée après un traitement de 50 pulsations à 66,7 kV/cm du CEP. D'après Stewart et Farmer (1984) dans Moraes *et al* (2011), la libération de la C-phycocyanine est directement liée à la rupture cellulaire ; mais les petites algues telles que la spiruline, ont des parois cellulaires multicouches résistantes, rendant la procédure d'extraction difficile.

Dans la littérature, les différentes intensités du champ électrique appliquées pour augmenter le rendement d'extraction des pigments à partir des microalgues sont variables. Elles sont comprises entre 45 KV/cm pour l'extraction des lipides à partir de l'espèce *Ankistrodesmus falcatus* (Zbinden *et al.*, 2013), 40 kV/cm pour l'extraction de différents constituants intracellulaires à partir de l'espèce *Nannochloropsis spp.* (Parniakov *et al.*, 2015 a) et situées entre 3 – 4,5 kV/cm pour l'extraction des protéines à partir de l'espèce *C. vulgaris* (Coustets *et al.*, 2014). D'après Luengo *et al* (2015), la différence entre les intensités requises pour l'électroporation des microalgues pourraient être liées à la durée de pulsation utilisée dans les différentes études.

Dans notre étude, nous avons appliqué des pulsations de l'ordre de millisecondes pour les intensités faibles (2 et 3,5 kV/cm) et de l'ordre de microsecondes pour l'intensité de 46 kV/cm. Pour cette raison, la relation entre la durée de pulsation et l'intensité du champ électrique (requis pour provoquer une électroporation des cellules) nécessite plus de recherches qui permettraient de mieux comprendre l'influence de ces paramètres.

Le problème auquel sont confrontés les chercheurs, réside dans la petite taille de microalgues et qui varie selon les espèces (quelques μm et jusqu'à 500 μm pour la spiruline). Comparées aux cellules des eucaryotes (cellules végétales de grandes tailles), les microalgues nécessitent des intensités élevées pour améliorer l'extraction de leurs constituants. En règle générale, pour obtenir une bonne extraction des différents composés intracellulaires les eucaryotes exigent des intensités de champ électrique inférieures à 7 kV/cm avec des pulsations de l'ordre de quelques microsecondes (Puertolas *et al.*, 2012 dans Luengo *et al.*, 2014).

3.4.3.3 Traitement par les ultrasons

La figure (3.6) montre les résultats acquis après traitement par les ultrasons. La teneur maximale en phycobiliprotéines (PbP) totale est 0,175 g/L est obtenue après une durée de traitement de 90 min (5400 s), avec une efficacité de traitement de 97,64%. Pour cette technique, les concentrations maximales de PbP obtenues sont quasi similaires à celles obtenues avec les autres traitements (CEP statique et en mode continu), mais à des temps de traitement beaucoup plus longs (5400 s vs 0,003 s).

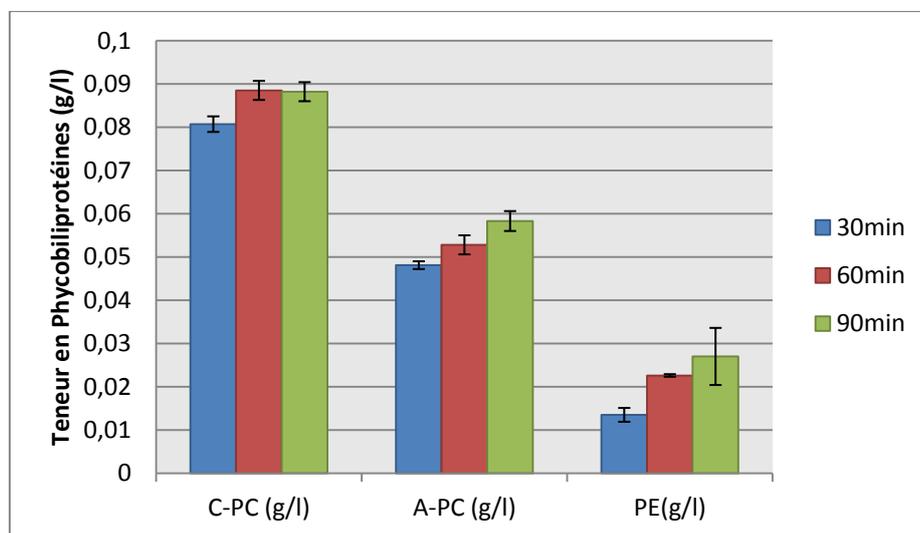


Figure 3.6 : Concentration des phycobiliprotéines extraites après un traitement par ultrasons à 30, 60 et 90 min.

Des travaux similaires ont été réalisés par Furuki *et al* (2003) qui ont étudié l'effet des ultrasons sur l'extraction des phycocyanines à partir de l'espèce *Spirulina platensis*. La microalgue est préparée dans 0,1 M de tampon phosphate (pH 6,8). Des sonications de 20 kHz et 28 kHz ont été utilisées pour l'extraction de la phycocyanine. Les résultats ont montré que la C-PC n'était pas détruite par les US tant que la valeur du temps appliquée était appropriée.

D'après Vilku *et al* (2006), en Australie l'application des ultrasons en science alimentaire a permis de mettre l'accent sur l'utilisation de systèmes à haute puissance, pour l'extraction de bioactifs, à partir de végétaux (carottes, pommes, gingembre etc.). Les cibles principales ont été les polyphénols et les caroténoïdes, dans les systèmes d'extraction à la fois

aqueux et avec solvant. Les essais d'extraction par ultrasons ont montré des améliorations du rendement d'extraction allant de 6 % à 35%.

Au cours de ces dernières années plusieurs travaux sur l'extraction par les ultrasons des composés intracellulaires à partir de microalgue, ont vu le jour. La fréquence des ultrasons utilisée est très variable ; elle dépend du composé extrait et de la microalgue étudiée.

Moraes *et al* (2011), ont étudié l'effet d'un traitement par ultrasons pour l'extraction des C-PC à partir de la spiruline. La biomasse a été placée dans un bain à ultrasons d'une fréquence de 50 kHz, avec des perles en verre dans la proportion de 1: 1,1 (g de biomasse: g de perles de verre) pendant 40 minutes. Cette méthode a permis d'obtenir une efficacité d'extraction 57% supérieure à celle de la congélation/décongélation. Ils suggèrent que le phénomène de cavitation, associé à l'effet d'abrasion généré par les perles de verre pendant la sonication, favorise l'extraction intracellulaire des protéines.

Postérieurement Dey et Rathod (2013), ont travaillé sur l'extraction des caroténoïdes à partir de la spiruline en appliquant une intensité de 167 W/cm. L'expérience a été réalisée en appliquant les ultrasons sous forme d'impulsion uniquement en mode continu et ceci dans le but de réduire le temps de traitement et par conséquent diminuer la consommation d'énergie. L'extraction maximale obtenue était de 47,10%.

Zhao *et al* (2013), ont également utilisé la sonication avec une intensité de 20 kHz et 1000W pendant 40 minutes, pour l'extraction des sucres à partir de l'espèce *Chlorella sp*. Ils ont constaté que la teneur en sucre pouvait être augmentée par les US comme prétraitement. Cependant d'autres auteurs (Araujo *et al.*, 2013), ont utilisé une intensité et une durée de traitement par US plus importantes (40 kHz, 2,68 W/m², pendant 56 minutes) pour améliorer l'extraction des lipides à partir de *C. vulgaris*. Ils ont obtenu un bon rendement d'extraction d'huile de 52,5%.

Dans une récente étude effectuée par Wang *et al* (2014), une faible intensité de 20 kHz et 100 W, pendant 5 minutes était efficace pour l'extraction des lipides à partir des microalgues *Scenedesmus dimorphus* et *Nannochloropsis oculata*.

Selon Joannes *et al* (2015), en dépit du fait que la méthode d'extraction assistée par les ultrasons a permis d'améliorer le rendement d'extraction, elle s'avère être moins efficace

comparée à d'autres méthodes, comme les hautes pressions et le traitement à l'acide sulfurique.

3.4.4 Pureté de la C-PC après extraction par les différents traitements

Les puretés des phycocyanines obtenues en utilisant les différentes méthodes d'extraction ont été mesurées puis comparées, comme le montre le tableau (3.3). Les résultats ont montré que la pureté de la phycocyanine isolée en utilisant la méthode de séparation classique congélation/décongélation, était très faible (0,39). Ce dernier provoque l'éclatement des cellules de la spiruline et par conséquent, l'extrusion de tous les éléments intracellulaires. La diminution de la pureté de la C-PC est donc due à la présence d'impuretés inhérentes à ce type de traitement non sélectif. Ce traitement nécessitera donc de nombreuses et longues étapes de purification, pour atteindre un niveau de pureté de grade alimentaire égale à 7.

Tableau 3.3 : la pureté de la phycocyanine extraite par différentes méthodes de désintégration cellulaire.

| Traitement | Durée | Pureté |
|-----------------|--------|--------------|
| Cong/ décong | 24 h | 0,39 ± 0,005 |
| CEP (2 kV/cm) | 81 ms | 0,54 ± 0,008 |
| CEP (3.5 kV/cm) | 81 ms | 0,54 ± 0,012 |
| CEP (46 kV/cm) | 300 µs | 0,54 ± 0,001 |
| US (35 kHz) | 90 min | 0,49 ± 0,002 |

Par contre, quelque soit l'intensité et le type de traitement par CEP (mode statique et continu), la pureté moyenne de la C-PC est plus élevée et identique (0,54), et ceci pour des durées plus élevées (2 et 3,5 kV/cm à 81 ms et 46 kV/cm à 300 µs). Le CEP abouti à une meilleure pureté comparativement aux traitements par ultrasons et congélation/décongélation, avec respectivement, les valeurs suivantes (0,54 vs 0,49 et 0,39).

Une pureté plus élevée est due à la diminution de l'absorbance de protéines totales à 280 nm tandis que l'absorbance de la phycocyanine spécifique à 620 nm a augmenté. On pense que la phycocyanine isolée en utilisant le procédé du CEP est stable car le traitement a été effectué dans des conditions de basse température et pendant une très courte durée (de

l'ordre de ms à μ s). Ces conditions ont détruit la membrane cellulaire de la spiruline sans dénaturer la phycocyanine, chromoprotéine composée de sous-unités de polypeptides α et β sensibles à la température.

De plus, les données de Parniakov *et al* (2015 a) montrent que la technique du CEP permet une extraction sélective des protéines pures, différentes des protéines extraites par la sonication. D'après eux le prétraitement par CEP présente un excellent potentiel comme étape préliminaire d'extraction aqueuse des composants de l'espèce *Nannochloropsis spp* . Les auteurs rajoutent que pour l'extraction des pigments, le prétraitement par sonication rendait le procédé du CEP plus efficace. Cependant, ce mode de traitement nécessite une plus grande consommation d'énergie ainsi qu'une purification supplémentaire des produits extraits consécutive à un endommagement de certains types de pigments. La perte significative de la pureté de phycocyanine pourrait être due à sa position périphérique au sein des phycobilisomes, sur la membrane des thylakoïdes, provoquant de ce fait une sensibilité au traitement.

D'après Furuki *et al* (2003), la phycocyanine extraite par les US avec une intensité de 20 kHz donne une pureté d'environ 80%, alors qu'avec 28 kHz on obtient une pureté plus élevée (90%).

3.4.5 Densité d'énergie délivrée par les différentes méthodes d'extraction

Le calcul de la densité d'énergie a été effectué uniquement pour les traitements qui ont donné une teneur maximale de phycobiliprotéines totales. Les résultats de la consommation énergétique sont représentés dans la figure (3.7).

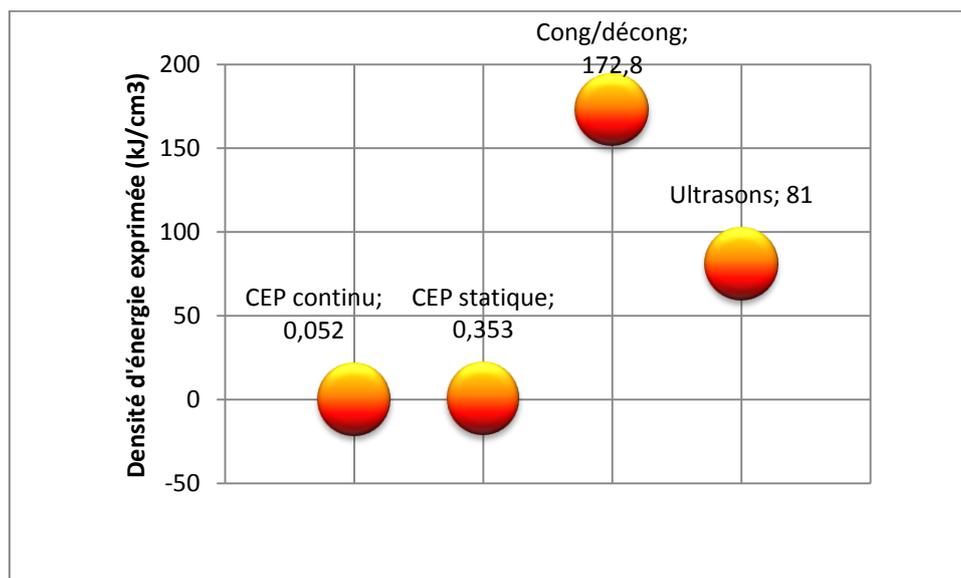


Figure 3.7 : Densité d'énergie des différents traitements exprimée en kJ/cm³.

Les densités d'énergie pour le traitement par CEP en mode continu et statique sont très faibles (respectivement 52 J/cm³ et 353 J/cm³), alors que celles des traitements par ultrasons et congélation/décongélation sont très élevées (respectivement 81 kJ/cm³ et 172,8 kJ/cm³). Cet important écart des valeurs de consommation d'énergie est dû au fait que le temps de traitement de ces deux dernières méthodes est très élevé (exprimé en heure) contrairement au traitement par CEP (exprimé en ms ou µs).

Les résultats de la densité d'énergie obtenus pour le traitement par CEP sont pratiquement similaires à ceux obtenus par Flisar *et al* (2014). Leur étude porte sur l'influence du champ électrique pulsé sur l'inactivation d'*E. coli* par un traitement en continu à 12 kV/cm avec des pulsations carrées, pendant 1, 4 et 8 pulsations d'une durée chacune de 1 ms. Les densités d'énergie obtenues sont respectivement, 9,6 J/cm³, 38,4 J/cm³ et 76,8 J/cm³, pour les traitements à 1, 4 et 8 pulsations.

Qin *et al.*, (2014), ont confirmé que le traitement par CEP de la spiruline provoquait son inactivation et que la réduction de la consommation d'énergie par ce procédé pourrait être réalisée en traitant des suspensions à faibles conductivités électriques. De ce fait, l'énergie par pulsation W (kJ) peut être calculée par l'équation suivante :

$$W = \int_0^t \sigma \cdot E(t)^2 dt \quad \text{Equation 3.6}$$

Avec σ (S/m) représentant la conductivité électrique du milieu traité ; E (V/cm) l'intensité du champ électrique ; et t (s) la durée de la pulsation.

3.4.6 Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré le grand potentiel du traitement par CEP pour l'amélioration de l'extraction des composés d'intérêt à partir de la microalgue *A. platensis* comparé aux méthodes classique d'extraction (congélation/décongélation et US). L'efficacité du CEP sur l'amélioration du rendement d'extraction dépend non seulement de l'intensité du champ électrique mais également du temps de traitement. La technologie de traitement du CEP se révèle être une technologie prometteuse pour l'extraction des phycobiliprotéines, en raison de ses multiples avantages : non thermique, gain de temps, ne nécessite l'ajout d'aucun produit chimique supplémentaire et développant une grande capacité d'extraction.

En raison des variations des différents paramètres (Intensité, durée et température) influençant sur l'efficacité du traitement par CEP pour l'extraction des composés bioactifs d'intérêt, une étude d'optimisation de ces paramètres s'avère nécessaire pour obtenir un rendement maximum avec une moindre consommation d'énergie.

TEXTE DE CONNEXION

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent ont montré que le CEP est une technique de choix pour l'extraction des phycobiliprotéines à partir d'*A. platensis*. A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur l'optimisation de l'extraction des PbP par CEP à partir de cette microalgue. Dans ce contexte, nous avons jugé important d'étudier et d'optimiser les paramètres qui influenceraient l'efficacité du procédé du champ électrique. Nous présenterons dans le chapitre suivant le développement et l'optimisation de l'extraction des PbP assistée par champ électrique pulsé, dans le but de maximiser le rendement d'extraction et la pureté de la C-PC.

4.1 Résumé

Le but de cette étude est la modélisation et l'optimisation de l'extraction de la phycocyanine à partir d'*A. platensis*. L'optimisation de l'extraction a été réalisée en utilisant un plan de criblage. La conception expérimentale est basée sur la conception d'un plan factoriel du premier degré qui va étudier l'effet de 3 facteurs (intensité du CEP, température et temps de traitement). La spiruline a été cultivée dans des conditions contrôlées en milieu Zarrouk pour augmenter la production des phycobiliprotéines, puis récoltée. La biomasse fraîche a été mise en suspension dans un tampon phosphate (pH = 7) puis traitée par le CEP à 35, 40 et 45 kV/cm pour des durées allant de 24 à 75 μ s et à des températures variant entre 20 °C et 40 °C. L'analyse du plan d'expérience montre que l'optimum d'extraction des phycocyanines est de 0,16 g/L avec une pureté de 0,83. Ces résultats sont obtenus dans des conditions particulières d'intensité de CEP (45 kV/cm), de température (20 °C) et de temps de traitement (75 μ s). La C-PC extraite possède une activité antioxydante très élevée (87 % pour une concentration de 200 μ g/mL).

Mots clés : champ électrique pulsé, *Spirulina*, phycobiliprotéines, optimisation

4.2 Introduction

Ce n'est que depuis peu que la littérature a montré un vif intérêt biologique relatif aux phycocyanines (C-PC et APC) en vertu de leurs propriétés antioxydantes. Ces pigments, hydrosolubles et de couleur bleue, ont une grande importance commerciale et industrielle (Manirafasha *et al.*, 2016).

Pour procéder, à partir des cellules de la spiruline, à l'extraction des phycocyanines, tout en prenant soin de préserver indemnes leurs propriétés, il convient de procéder au développement de méthodes bien ajustées. Celles-ci, en outre devront être aussi respectueuses de l'environnement qu'être d'un apport économique rentable à l'échelle industrielle.

Afin d'améliorer le rendement d'extraction et de réduire le temps de traitement, différentes méthodes de rupture des enveloppes cellulaires ont été étudiées. Les différents essais ont utilisés des cycles de congélation/décongélation, l'homogénéisation dans le mortier et le pilon, la sonication et la désintégration par les lysozymes de la paroi cellulaire (Manirafasha *et al.*, 2016 et Martínez *et al.*, 2016). Cependant, tous ces procédés de rupture cellulaire se sont caractérisés par un manque de spécificité provoquant de ce fait la libération de débris cellulaires ou d'autres impuretés. Ces derniers ont affecté négativement la qualité et la pureté des extraits, ce qui nécessite des opérations de purification en aval.

L'exploitation commerciale de ce pigment passe d'abord par son extraction à partir des phycobilisomes, puis par sa purification. La pureté de la C-PC est primordiale, particulièrement pour ses applications fluorescentes dans le domaine médical (analyse clinique et immunologique). La purification de la phycocyanine à partir de microalgues comporte différentes étapes : précipitation fractionnée, centrifugation, dialyse et chromatographie sur colonne (Boussiba et Richmond, 1979). Pour cela, la phycocyanine a besoin d'être séparée de manière sélective, des protéines non désirées. Le rapport A_{620}/A_{280} sert d'indice de pureté pour la phycocyanine.

Comparé aux méthodes d'extraction classique (congélation/décongélation et US), les travaux, réalisés précédemment (Aouir *et al.*, 2015), ont démontré le grand potentiel du traitement par CEP dans l'amélioration de l'extraction des phycocyanines brutes (phycobiliprotéines ou PbP) à partir de la microalgue *A. platensis*. En se basant sur les

résultats obtenus, l'intensité du CEP et le temps de traitement sont les paramètres qui influent, en premier lieu, sur l'extraction des phycocyanines brutes (ou PbP).

Selon Stewart et Farmer, (1984) dans Hemlata *et al* (2011), la paroi des cellules cyanobactériennes est épaisse et extrêmement résistante. Elle agit comme barrière physique pour la libération des phycobiliprotéines dans le milieu d'extraction. Ainsi, l'optimisation de la méthode de perturbation cellulaire est également très importante pour l'extraction maximale.

En raison des variations des différents paramètres (Intensité, durée et température de traitement) qui influencent sur l'efficacité du traitement par CEP (Martínez *et al.*, 2016), nous avons utilisé, dans ce chapitre, un plan d'expérience pour optimiser le rendement d'extraction en PbP ainsi que la pureté de la C-PC.

L'utilisation d'un plan d'expérience a pour but de :

- Déterminer les facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé,
- Optimiser des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure,
- Prédire par modélisation le comportement d'un procédé.

Afin de déterminer les facteurs clés et optimiser les paramètres (l'intensité, la température et la durée du traitement) qui conviennent à une meilleure extraction des PbP avec une bonne pureté de la C-PC, nous avons utilisé un plan de criblage d'ordre 1 avec optimisation multi réponses. Nous avons également déterminé l'activité antioxydante de la C-PC après une purification partielle et procédé à la caractérisation de cette molécule par la méthode spectrophotométrie infra-rouge de Fourier (FTIR).

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 Préparation de l'échantillon

Le prélèvement a été réalisé durant la phase exponentielle de croissance. Environ 650 mL de culture ont été centrifugés. Nous avons récupéré le culot et l'avons fait dissoudre dans un volume de 100 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,0). La conductivité électrique initiale du tampon était de 0,7 mS/cm. Après l'ajout de la biomasse algale dans le tampon la conductivité, σ est passée à 0,9 mS /cm.

Pour déterminer la concentration en cellules de notre échantillon, un comptage des cellules a été réalisé en utilisant l'hématimètre de Thoma à l'aide d'un microscope optique de type (OPTIKA B-192). L'échantillon retenu pour le traitement par CEP présentait une concentration de 6×10^9 cellules/mL.

4.3.2 Installation de CEP

Nous avons procédé à la même installation électrique (en mode continu) que celle déjà réalisée dans le chapitre précédent, à laquelle nous avons rajouté un bain-marie et ce afin de soumettre les échantillons à différentes températures avant le passage dans la chambre de traitement par CEP (Figure 4.1). Un thermocouple a été utilisé pour la mesure de la température avant et après traitement. Nous avons également utilisé un débit de la solution à traiter un peu plus élevé (0,85 mL/s), afin de réduire le nombre de pulsations ($n = 6$) et par conséquent réduire le temps de traitement. L'installation du champ électrique est faite en sorte de produire des pulsations de type exponentiel de déclin d'une durée τ égale à $4 \mu\text{s}$ (Figure 4.2).

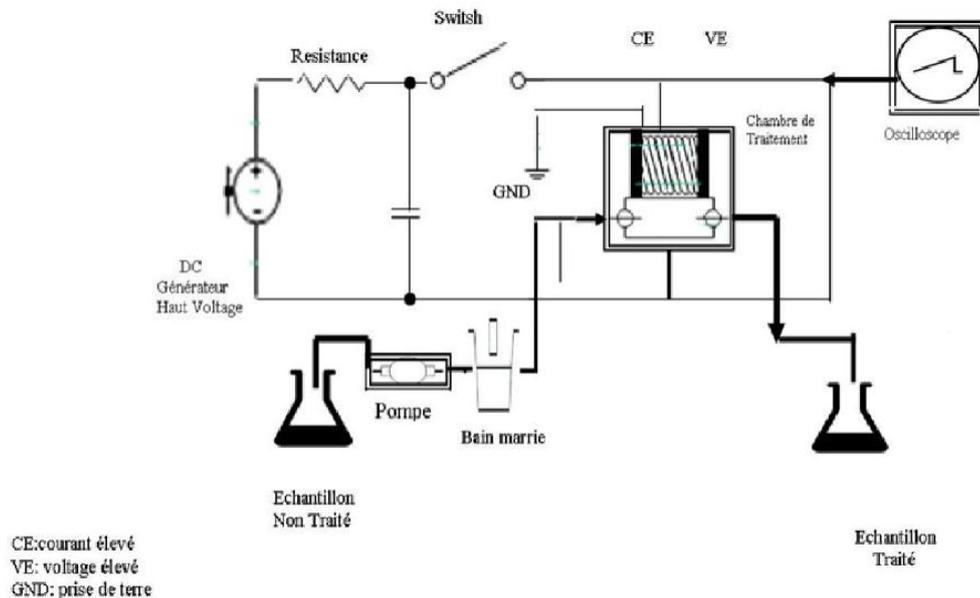


Figure 4.1 : Installation d'un système de champ électrique pulsé.

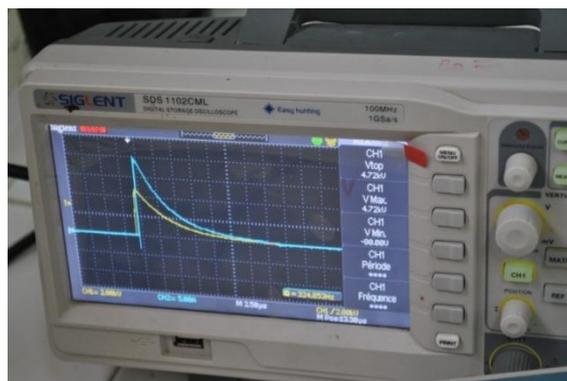


Figure 4.2 : Impulsion de type exponentiel de déclin (Laboratoire de Technologie Alimentaire, ENSA).

4.3.3 Dosage des phycobiliprotéines et mesure de la pureté

Après une durée de 4 heures, de chaque traitement, la suspension algale est centrifugée à 6000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants sont récupérés pour l'analyse spectrophotométrique. Les teneurs de pigments hydrosolubles des phycobiliprotéines, à savoir l'allophycocyanine (APC), la phycocyanine (C-PC) et la phycoérythrine (PE) de même que la pureté de la C-PC, sont mesurées selon les équations décrites par Anamika *et al.*, (2005) (Chapitre II).

4.3.4 Modélisation et optimisation de l'extraction des phycobiliprotéines et de la pureté de la C-PC

L'optimisation de l'extraction a été réalisée en utilisant un plan de criblage grâce au logiciel STATGRAPHICS Centurion XVI.II (STATPOINT Technologies, Inc. www.STATGRAPHICS.com). La conception expérimentale, basée sur un plan factoriel, va étudier les effets de trois facteurs du premier degré. Le domaine expérimental, défini pour les trois facteurs choisis, permet d'établir la matrice d'expérience factorielle complète de ceux-ci.

Cette méthodologie établit une relation entre les paramètres d'entrée, qui représentent les paramètres opératoires (intensité de CEP, température et temps de traitement), et les variables de sortie qui correspondent dans notre cas à la concentration en phycobiliprotéines (PbP) et la pureté de la C-PC. Les limites de variation de chaque variable (facteur) sont présentées dans le tableau 4.1:

Tableau 4.1: Limites de variation des facteurs et réponses.

| <i>Facteurs</i> | <i>Bas Haut</i> | | <i>Unités Réponses</i> | <i>Unités</i> |
|------------------------------|-----------------|------------|------------------------|---------------|
| | <i>(-)</i> | <i>(+)</i> | | |
| Facteur A (Intensité du CEP) | 35 | 45 | kV/cm PbP (Y) | g/L |
| Facteur B (Température) | 20 | 40 | °C | Pureté (Y) |
| Facteur C (Temps) | 24 | 72 | µs | |

Nous avons créé un plan factoriel qui nous permettra d'étudier les effets de trois facteurs. Le plan est exécuté en 2 blocs, incluant 2 points au centre par bloc (10 essais). Le plan a été répliqué une seule fois où chaque expérience est remise en œuvre ce qui fait un total de 20 essais (Tableau 4.2).

L'ordre des expériences a été entièrement randomisé, le but étant de nous protéger des effets de variables perturbatrices.

Tableau 4.2 : Plan d'expérience en unités codées.

| BLOC | Facteur A (X_1) | Facteur B (X_2) | Facteur C (X_3) | PbP (Y) | Réponse 2 (Y') |
|------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|----------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | Y_1 | Y'_1 |
| 1 | -1 | -1 | 1 | Y_2 | Y'_2 |
| 1 | 1 | -1 | 1 | Y_3 | Y'_3 |
| 1 | 1 | 1 | -1 | Y_4 | Y'_4 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | Y_5 | Y'_5 |
| 1 | -1 | 1 | -1 | Y_6 | Y'_6 |
| 1 | -1 | 1 | 1 | Y_7 | Y'_7 |
| 1 | 1 | -1 | -1 | Y_8 | Y'_8 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | Y_9 | Y'_9 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | Y_{10} | Y'_{10} |
| 2 | -1 | -1 | -1 | Y_{11} | Y'_{11} |
| 2 | -1 | -1 | 1 | Y_{12} | Y'_{12} |
| 2 | 1 | -1 | 1 | Y_{13} | Y'_{13} |
| 2 | 1 | 1 | -1 | Y_{14} | Y'_{14} |
| 2 | 1 | 1 | 1 | Y_{15} | Y'_{15} |
| 2 | -1 | 1 | -1 | Y_{16} | Y'_{16} |
| 2 | -1 | 1 | 1 | Y_{17} | Y'_{17} |
| 2 | 1 | -1 | -1 | Y_{18} | Y'_{18} |
| 2 | 0 | 0 | 0 | Y_{19} | Y'_{19} |
| 2 | 0 | 0 | 0 | Y_{20} | Y'_{20} |

Dans un premier temps, on supposera que le modèle postulé est un modèle d'ordre 1 avec interaction. Si l'analyse statistique confirme notre choix, le modèle choisi est conforme au phénomène étudié sinon on passera à un modèle d'ordre 2.

4.3.5 Mesure de l'activité antioxydante

4.3.5.1 Purification de la phycocyanine

Les premières étapes de la purification sont basées sur le principe de la précipitation différentielle. Pour obtenir cette pureté l'électrolyte le plus utilisé reste le sulfate d'ammonium. Il a l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives.

Pour la prépurification nous avons utilisé la méthode modifiée d'Anamika *et al.*, (2005). Après extraction par CEP suivie d'une centrifugation, nous avons récupéré le surnageant bleu clair contenant la phycocyanine, auquel nous avons rajouté 0,01 % d'Azoture de sodium en vue de sa conservation. Un premier traitement a été réalisé avec du sulfate d'ammonium à 25% (P/V), ajouté de façon graduelle sous agitation pendant 1 heure. On laisse agir pendant 24 heures à 4 °C puis on procède à une deuxième centrifugation (17 000 x g pendant 20 minutes). Le but de cette étape est d'augmenter la solubilisation des protéines (Salting-in).

Le surnageant récupéré est traité une deuxième fois mais avec du sulfate d'ammonium à 50 % (P/V). On procède à une troisième centrifugation (17 000 x g pendant 20 minutes). Le but ici est de précipiter les protéines (Salting out). A la fin de cette étape, le culot récupéré (extrait de phycocyanine) est immergé dans une petite quantité de tampon phosphate à 0,005 M (pH=7).

L'extrait est ensuite dialysé pendant une nuit, dans un volume 1000 fois supérieur au volume initial de l'extrait de phycocyanine contenu dans le tampon. Le dialysat est concentré et lyophilisé, puis pesé pour déterminer l'extrait massique de phycocyanine. Le produit séché est maintenu au congélateur à -18 °C jusqu'à son utilisation ultérieure, pour l'analyse de l'activité antioxydante.

4.3.5.2 Préparation de la solution alcoolique de DPPH : (α , α -diphényle- β -picrylhydrazyle)

On prépare 100 mL d'une solution de DPPH dans le même type de solvant que celui utilisé pour préparer l'échantillon et ses dilutions (Éthanol ou méthanol). Pour cela on prépare 100 mL d'une solution 60 μ m de DPPH ce qui correspond approximativement à 2,4 mg = 0,0024 g de DPPH dans 100 mL de solvant.

4.3.5.3 Protocole expérimental

La mesure de l'activité antioxydante a été réalisée selon la méthode décrite par Shalaby et Shanab (2013). On mélange un millilitre d'extrait de phycobiliprotéine-méthanol, à différentes concentrations (10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 μ g/mL de méthanol), avec 1 mL de solution de réactif de DPPH-méthanol. On agite vigoureusement chaque mélange et on les laisse reposer dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance de chaque mélange est calculée, avant et après l'ajout du DPPH, à une longueur d'onde de 517 nm. Le même spectrophotomètre est usité, tant pour analyser les paramètres décrits ci-dessus que pour l'hydroxytoluène butylé (BHT) utilisé comme agent antioxydant standard.

L'activité antioxydante est exprimée en concentration d'inhibition (IC_{50}), définie comme étant la concentration en phycobiliprotéines nécessaire pour provoquer une diminution de 50% de l'absorbance du radical DPPH (517 nm). On détermine, à partir du graphe, les pourcentages d'inhibition par rapport à la concentration de l'extrait. Des valeurs d'absorbance plus faibles du mélange réactionnel indiquent une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée.

La capacité de piégeage du radical DPPH a été calculée en utilisant l'équation 4.1.

$$DPPH (\% \text{ d'inhibition}) = ((A_0 - A_t) / A_0) * 100 \quad \text{Equation 4.1}$$

Où A_t est l'absorbance des extraits après 30 minutes et A_0 est l'absorbance de la solution méthanolique de DPPH.

4.3.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform Infrared FTIR)

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour identifier les groupes fonctionnels de la phycocyanine de la microalgue *A. platensis* participant à la biosorption. L'analyse a été réalisée au niveau du laboratoire central de la police scientifique (LCPS) à l'aide d'un appareil de type « Thermo Scientific, Nicolet- iS5 FT-IR Spectrometer ». L'essai a été effectué dans un intervalle d'onde de $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (Région du milieu infrarouge) à l'aide d'une fenêtre de bromure de potassium, à température ambiante ($25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchiée ou transmise. Le domaine infrarouge, situé entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5 - 25\text{ }\mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

4.4 Résultats et discussion

4.4.1 Résultats expérimentaux de l'extraction des phycobiliprotéines et de la pureté

Le tableau (4.3), regroupe l'ensemble des essais réalisés ainsi que les réponses trouvées expérimentalement.

X_1 , X_2 et X_3 représentent respectivement les facteurs : intensité de CEP, température et temps et

Y et Y_1 représentent les deux réponses recherchées : PbP et pureté de la C-PC.

Tableau 4.3 : Résultats des essais du plan factoriel.

| | Intensité du CEP (X ₁) | Température (X ₂) | Temps (X ₃) | PbP (Y) | Pureté de la C- PC (Y') |
|--------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------|----------------------------|
| Unités | kV/cm | °C | µseconde | g/L | |
| Essais | | | | | |
| E1 | 35 | 20 | 24 | 0,105 | 0,620 |
| E2 | 35 | 20 | 72 | 0,107 | 0,639 |
| E3 | 45 | 20 | 72 | 0,150 | 0,850 |
| E4 | 45 | 40 | 24 | 0,131 | 0,469 |
| E5 | 45 | 40 | 72 | 0,132 | 0,430 |
| E6 | 35 | 40 | 24 | 0,090 | 0,500 |
| E7 | 35 | 40 | 72 | 0,084 | 0,430 |
| E8 | 45 | 20 | 24 | 0,125 | 0,669 |
| E9 | 40 | 30 | 48 | 0,117 | 0,476 |
| E10 | 40 | 30 | 48 | 0,115 | 0,693 |
| E11 | 35 | 20 | 24 | 0,104 | 0,620 |
| E12 | 35 | 20 | 72 | 0,106 | 0,640 |
| E13 | 45 | 20 | 72 | 0,164 | 0,849 |
| E14 | 45 | 40 | 24 | 0,141 | 0,470 |
| E15 | 45 | 40 | 72 | 0,153 | 0,431 |
| E16 | 35 | 40 | 24 | 0,091 | 0,501 |
| E17 | 35 | 40 | 72 | 0,080 | 0,430 |
| E18 | 45 | 20 | 24 | 0,117 | 0,670 |
| E19 | 40 | 30 | 48 | 0,115 | 0,693 |
| E20 | 40 | 30 | 48 | 0,115 | 0,588 |

4.4.2 Analyse statistique

La démarche à suivre pour analyser le plan expérimental est la suivante :

- Modélisation et validation du modèle,
- Analyse des résultats du modèle.

4.4.2.1 Modélisation et validation du modèle

Pour un modèle d'ordre 1 avec interaction, la forme générale du polynôme est la suivante (Equation 4.2):

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{i=1}^n a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n a_{ijm} X_i X_j X_m + \dots + \sum_{i=1}^n a_{ij\dots p} X_i X_j \dots X_p$$

Equation 4.2

Les coefficients du modèle moyen, principaux et d'interaction, respectivement, a_0 , a_i et a_{ij} , sont obtenus à l'aide d'une régression multiple exécutée sur le logiciel d'analyse STATGRAPHICS Centurion. En présence de trois facteurs : X_1 , X_2 , X_3 , le modèle de la réponse est exprimé par l'équation 4.3 :

$$y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3$$

Equation 4.3

Les résultats de l'analyse de la variance, avant ajustement, sont présentés dans les Annexes (7 et 8).

Avant d'utiliser le modèle statistique de cette analyse, il est important de retirer les effets non significatifs. La règle à suivre lors de l'exclusion des effets non significatifs est la suivante :

1. Exclure toutes les interactions entre deux facteurs non significatifs.
2. Exclure tous les effets directs non significatifs et qui ne sont pas présents dans des interactions significatives.

Dans notre cas, cela veut dire qu'il faut exclure toutes les interactions qui ne sont pas significatives dans le graphique de Pareto (interaction entre facteurs ABC à savoir : CEP, température et temps), à l'exception de l'effet direct C (le temps) (Figure 4.3 a). Cet effet direct est conservé car il est présent dans l'interaction significative avec le facteur A (intensité de CEP). Idem pour les résultats de la pureté nous avons enlevé les interactions entre facteurs ABC (Figure 4.3 b).

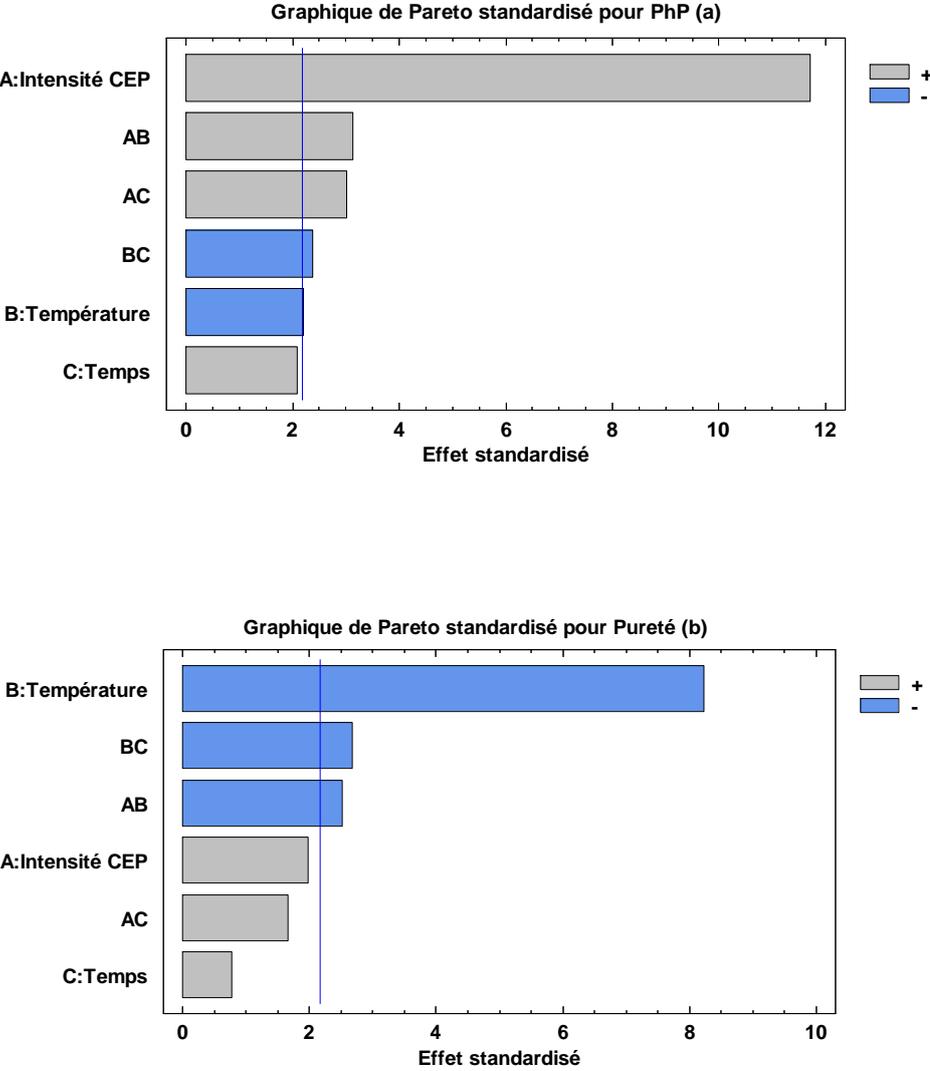


Figure 4.3 : Graphique de Pareto pour les effets principaux et les interactions sur l'extraction des PbP (a) et la pureté (b).

Le graphique de Pareto, standardisé, affiche les effets dans l'ordre décroissant de signification avec une ligne permettant de déterminer ceux qui sont statistiquement significatifs. Il est utilisé pour déterminer rapidement les effets qui sont les plus importants. La longueur de chaque barre est proportionnelle à la valeur de la statistique t calculée pour l'effet associé. Toute barre au-delà de la ligne verticale est statistiquement significative au niveau de signification précisée, par défaut de 5%. Dans notre cas, pour le rendement en PbP (figure 4.3.a), il y a 2 effets directs significatifs : Intensité de CEP et température. Il y a également trois interactions significatives entre tous les facteurs (intensité CEP et température), (intensité CEP et temps) et (température et temps).

Concernant, la pureté, l'effet direct significatif correspond à la température. Il y a également deux interactions significatives entre : température et le temps et entre : intensité de CEP et température.

- **Estimation des effets des paramètres expérimentaux**

Les résultats de l'analyse de la variance après ajustement, et les coefficients pour déterminer l'influence des différents paramètres pour l'extraction des PbP et la pureté sont représentés respectivement dans les Annexes (8, 9 et 10).

Le coefficient de détermination R^2 ainsi que celui de R^2 ajusté sont respectivement égaux à 93,50 % et 89,71 %, pour les PbP et respectivement égaux à 88,07 et 81,10 % pour la pureté, nous pouvons déduire que le modèle mathématique est satisfaisant et donc peut être accepté.

Les équations de la réponse PbP (Y) et de la Pureté (Y') seront ainsi exprimées par le modèle mathématique suivant :

$$Y_{PbP} = 0,116 + 0,021 * X_1 - 0,004 * X_2 + 0,004 * X_3 + 0,0056 * X_1X_2 + 0,0054 * X_1X_3 - 0,0042 * X_2X_3 \quad \text{Equation 4.4}$$

$$Y'_{Pureté} = 0,583 + 0,029 * X_1 - 0,118 * X_2 + 0,011 * X_3 - 0,036 * X_1X_2 + 0,024 * X_1X_3 - 0,039 * X_2X_3 \quad \text{Equation 4.5}$$

4.4.2.2 Analyse des résultats du modèle

a- Effets directs

Les figures (4.4, a et b) montrent les effets directs de chaque facteur sur le rendement d'extraction des phycobiliprotéines et de la pureté de la C-PC. Les effets directs indiquent les variations estimées de la réponse lorsque chaque facteur passe de son niveau bas à son niveau haut. Sachant que tous les autres facteurs sont maintenus à des valeurs à mi-chemin entre leurs niveaux hauts et bas respectifs.

D'après les résultats, on constate que le rendement en PbP ainsi que la pureté augmentent quand les deux facteurs : intensité du CEP et temps de traitement passent de leur niveau bas à leur niveau élevé. Par contre, ces rendements diminuent lorsque la température augmente particulièrement dans le cas se rapportant à la pureté.

Ces résultats sont confirmés par plusieurs auteurs. Selon Coustets *et al.*, (2014), les méthodes classiques utilisées pour des traitements à grande échelle telles que les extractions mécaniques ou chimiques, affectent l'intégrité de la protéine cytosolique extraite en libérant des protéases contenues dans les vacuoles. Des travaux antérieurs, portant sur les processus d'écoulement électroextraction sur les levures, ont prouvé que la technologie du champ électrique pulsé permet de préserver l'intégrité des protéines cytosoliques libérées et en n'altérant pas les membranes des vacuoles. Sur la base de ces connaissances antérieures, les chercheurs ont développé un nouveau protocole afin d'extraire, par le CEP, les protéines cytoplasmiques totales des microalgues (*Nannochloropsis salina*, *Chlorella vulgaris* et *Haematococcus pluvialis*).

Une récente étude réalisée par Martínez *et al* (2016), sur l'extraction des phycocyanines par champs électriques pulsés, à partir d'*A. platensis*, a montré que la force du champ électrique et le temps étaient les deux variables les plus significatives et présentant le plus d'influence sur le rendement d'extraction des C-PC. Le rendement en C-PC augmente linéairement avec le temps de traitement, allant de 60 à 150 μ s. Selon ces auteurs la température augmente également le rendement d'extraction lorsqu'elle passe de 10 à 40 °C.

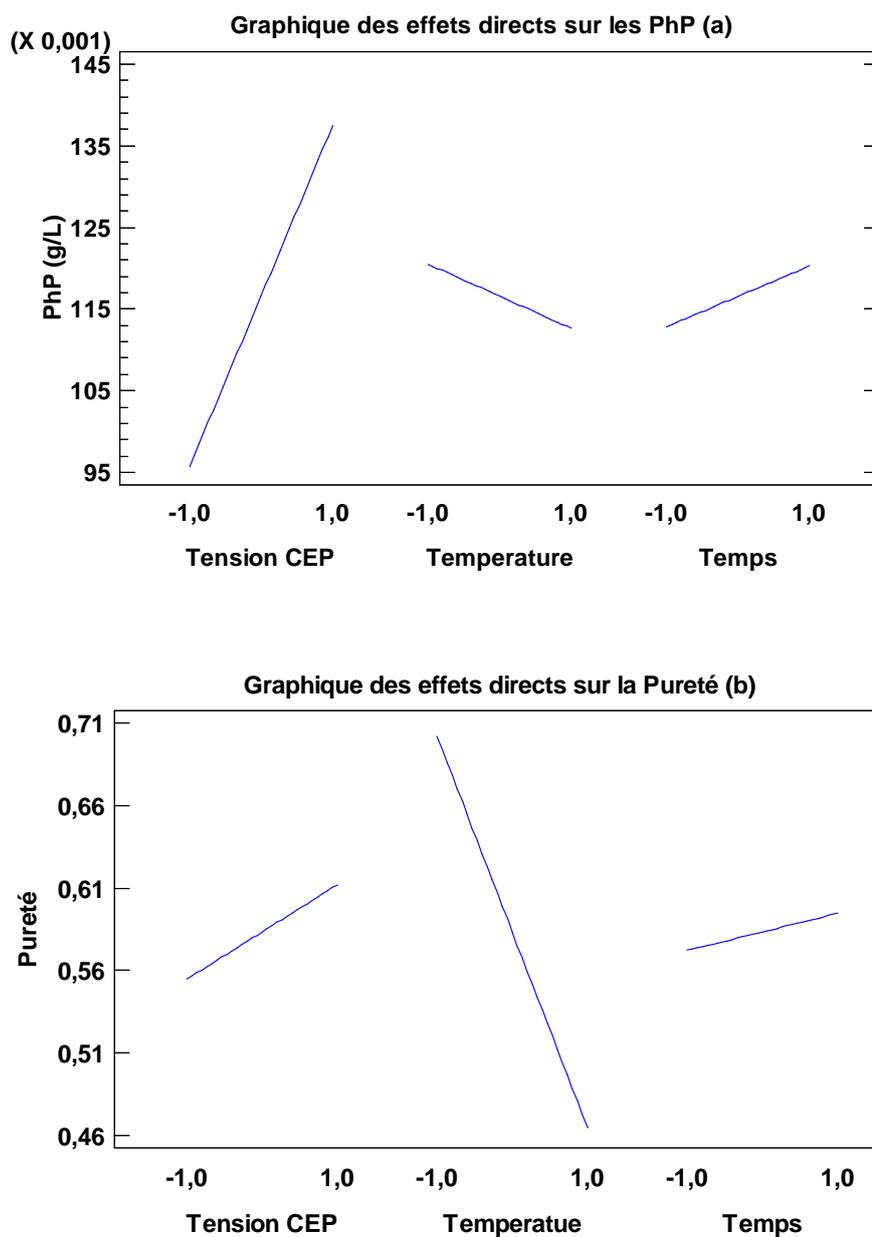


Figure 4.4 : Graphique des effets principaux sur l'extraction des PbP (a) et la pureté de la CPC (b).

Le même effet a été observé par Luengo *et al.*, (2015), lors de leurs travaux sur l'extraction de la lutéine par CEP à partir de *C. vulgaris*. Ces chercheurs ont montré lors du traitement par CEP à 25 kV/cm que l'augmentation de la température du traitement de 10 à 40 °C entraîne l'augmentation du rendement d'extraction en lutéine qui passe de 400 à 700 µg/g. Cette variation a été expliquée par une augmentation de l'électroporation de la

membrane des chloroplastes plus importante à 40 °C qu'à 10 °C. De ce fait l'extraction de la lutéine serait plus élevée lorsque la température augmente. Sachant que la membrane des chloroplastes est une bicouche lipidique comme la membrane cytoplasmique. A des températures basses la bicouche lipidique présente une structure bien organisée ce qui pourrait être la cause d'une faible électroporation.

Dans notre cas, la spiruline, qui est une cyanobactérie, ne possède pas de chloroplastes et les thylakoïdes isolées, situées à la périphérie de la cellule, portent les phycobilisomes sur leurs surfaces (sous forme arrondie ou en bâtonnets). De plus, *A. platensis* de par son génome formé d'acides nucléiques liés par des histones-likes est affilié aux bactéries. Elle est également caractérisée, par l'absence dans les cellules, de membrane nucléaire, de mitochondries et de plastes.

Contrairement à d'autres microorganismes (levures, chlorelles, *Scenedesmus...*), proposés comme sources de protéines, la spiruline est une Gram – négative ne comportant pas de paroi cellulosique mais une enveloppe de muréine relativement fragile. Cette caractéristique pourrait expliquer que l'augmentation de la température ne permet pas d'élever le rendement en PbP, mais risque, bien au contraire de dénaturer les protéines.

En outre, comme la spiruline est dépourvue de plastes, ceci facilite une électroporation rapide sans l'augmentation de la température de traitement. Egalement l'absence de membrane cellulosique procure une très bonne digestibilité (83 à 90 %) des protéines de la spiruline crue ou simplement séchée. Selon Falquet et Hurni (2006), pour toutes ces raisons la spiruline ne nécessite ni cuisson ni traitement particulier destiné à rendre ses protéines accessibles. C'est un avantage considérable tant du point de vue simplicité de production que pour la préservation des constituants de haute valeur.

b- Effets des interactions

L'effet des interactions entre les différents paramètres sont représentés dans la figure 4.5 (a et b) respectivement sur le rendement en PbP et la pureté. À noter que, pour toutes les interactions, les deux droites se croisent entre (elles ne sont pas parallèles) ce qui signifie que l'interaction entre les facteurs a un effet sur le rendement en PbP et la pureté.

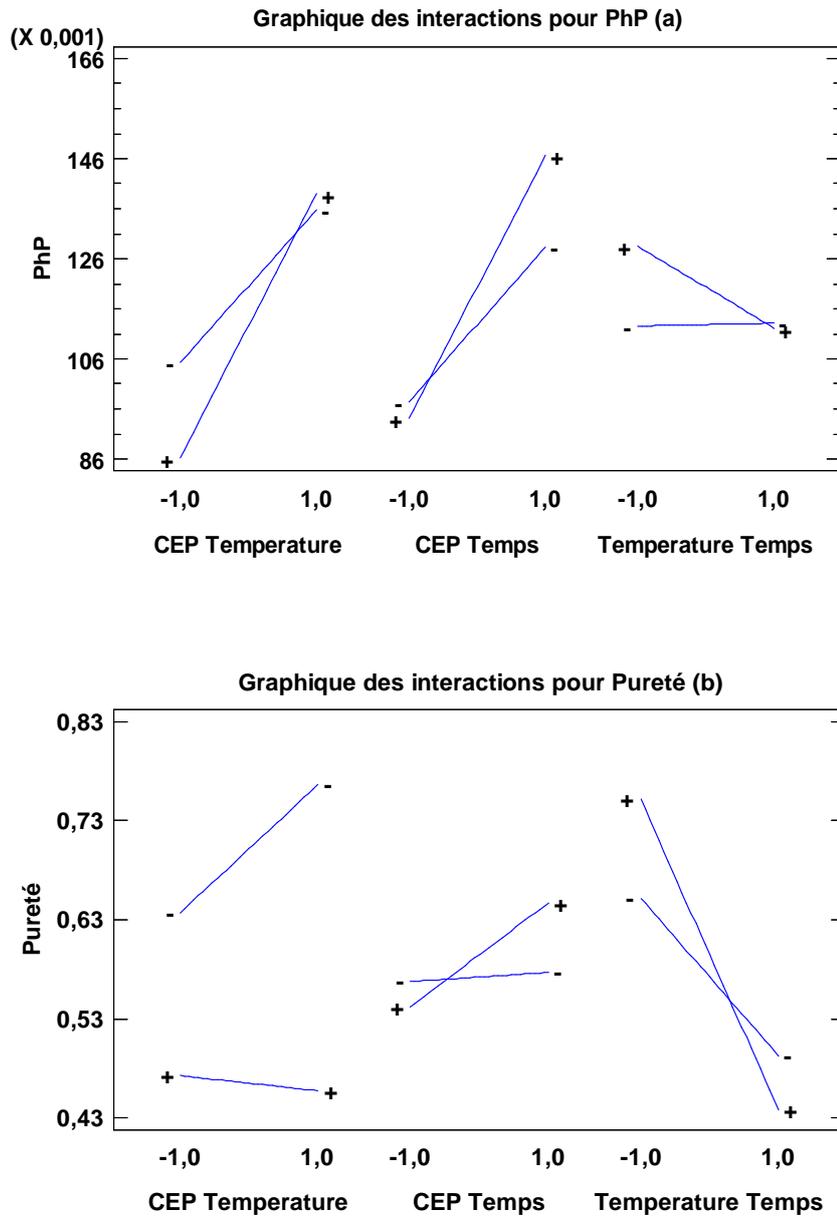


Figure 4.5 : Graphique des effets des interactions sur l'extraction des PbP (a) et la pureté de la CPC (b).

Il ressort de la figure 4.5 (a), que pour l'interaction : intensité CEP/température, si la température (T) est à son niveau bas (20 °C), l'intensité du CEP (E) a un faible effet sur le rendement d'extraction des PbP (la teneur en PbP extraite passe de 0,105 à 0,135 g/L, soit une augmentation du rendement de 18,75 %). Par contre si T est à son niveau supérieur (40 °C), elle devient un facteur dominant car elle permet d'augmenter plus la teneur en PbP (de 0,086

à 0,14 g/L, soit une augmentation du rendement de 33,75 %) lorsque E passe du niveau inférieur au niveau supérieur (de 35 kV/cm à 45 kV/cm).

Donc l'interaction entre E et T a un effet positif sur l'augmentation du rendement d'extraction des PbP (ce qui a été déjà observé sur le diagramme de Preto, figure 4.3.a). Le point d'interaction entre les deux droites correspond à une concentration en PbP optimale égale à 0,131 g/L. Ceci est confirmé par Martínez *et al* (2016), qui ont trouvé que, l'effet de la force du champ électrique sur le rendement en phycocyanine, augmente progressivement, lorsque des traitements de CEP sont appliqués à des températures plus élevées (de 10 à 40 °C le rendement a augmenté de 25% à 15 kV / cm et de 60% à 25 kV / cm).

Idem pour l'interaction entre les facteurs intensité CEP et temps (E et t). Le temps de traitement (t) est un facteur très important pour l'extraction des PbP qui, lorsqu'il est à son niveau le plus haut (72 μ s) entraîne une concentration en PbP extraite d'environ 0,15 g/L (alors qu'initialement elle était de 0,096 g/L).

Par contre l'interaction entre la température et le temps de traitement (T et t) ne montre pas une corrélation positive. La concentration en PbP diminue avec l'augmentation de la température. Elle passe de 0,128 à 0,112 g/L, lorsque le temps de traitement est à son niveau supérieur (72 μ s). Par contre une très légère augmentation de la concentration en PbP (de 0,112 à 0,113 g/L) a été observée lorsque le temps de traitement est à son niveau inférieur (24 μ s). Donc le temps est un facteur important par ce qu'avec l'augmentation de la température il diminue le rendement d'extraction des PbP.

Concernant l'effet des interactions sur la pureté de C-PC (la figure 4.5.b), on remarque qu'il existe une interaction entre E et T, car, lorsque la température est à son niveau inférieur (20 °C), l'intensité du CEP a un effet positif sur la pureté de la C-PC. C'est donc E un facteur important qui permet d'augmenter la pureté qui passe de 0,63 à 0,77. Par contre si T est à son niveau supérieur (40 °C), E a un faible effet sur la pureté (elle passe de 0,47 à 0,46).

Une interaction entre E et t a été également observée. Lorsque t est à son niveau supérieur (72 μ s), la pureté est plus importante car elle augmente en même temps que l'intensité du CEP, ce qui n'est pas le cas lorsque t est au niveau inférieur (0,54 à 0,64 vs 0,56 à 0,57).

Pour ce qui est de l'interaction entre T et t, les deux paramètres réunis diminuent la pureté. Cette dernière diminue encore plus (elle passe de 0,75 à 0,43) lorsque t est à son niveau supérieur. Ceci peut être expliqué par le fait que les pigments photosynthétiques de la spiruline ou les phycocyanines sont constitués de sous-unités protéiques sensibles à la chaleur.

Cette hypothèse est confirmée par Sheng *et al* (2011). Les auteurs ont évalué les effets de perturbation cellulaire d'un traitement par champ électrique pulsé (Focused Pulsed, FP) sur la microalgue *Synechocystis* PCC 6803. Ils ont noté la dénaturation des pigments photosynthétiques en utilisant la microscopie de fluorescence. Ils n'ont observé aucune auto-fluorescence rouge dans les cellules traitées par FP à une température de 54 °C et 71,7 kWh/m³ d'intensité. Cette disparition de l'auto-fluorescence est confirmée par le changement dans la couleur de la culture passant du vert foncé à jaunâtre, après traitement par FP. Ce qui confirme la dénaturation de la phycocyanine et des pigments chlorophylles. D'après ces auteurs ces observations indiquent que la destruction des pigments photosynthétiques peut être attribuée à la dénaturation thermique.

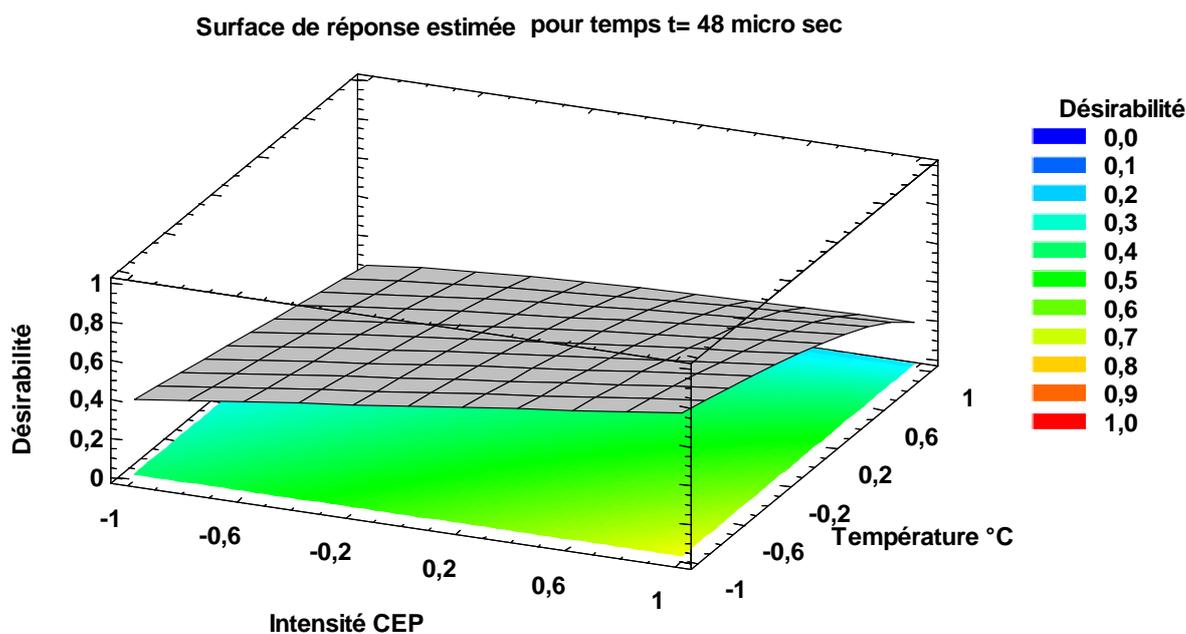
Selon Seo *et al* (2013), la phycocyanine est très sensible aux variations de température et de pH de son environnement et ce en raison de ses sous-unités polypeptidiques. Par conséquent, il convient d'appliquer une méthode de séparation plus efficace en termes de temps et de coût, que la méthode de séparation classique. Pour cela il est impératif d'isoler la phycocyanine de *Spirulina platensis* en peu de temps à basse température. D'après les auteurs, la phycocyanine isolée, en utilisant le procédé à haute pression est stable car l'expérience se déroule dans des conditions de basse température. Dans ces conditions expérimentales, la membrane cellulaire de *Spirulina platensis* a été détruite sans qu'il y ait eu dénaturation de la phycocyanine. Celle-ci est en effet une chromoprotéine composée de sous-unités de polypeptides α et β , sensibles à la température.

En plus des paramètres étudiés, d'autres facteurs interviennent également sur le traitement par CEP. Les travaux de Yun *et al.*, (2016), sur l'effet du CEP sur la membrane de *Salmonella typhimurium*, ont montré que lorsque la conductivité électrique de la suspension algale est faible (0,18 mS/cm) elle influence sur l'énergie spécifique délivrée dans l'échantillon et permet de diminuer le temps de traitement pour l'inactivation de la bactérie. Le même résultat est constaté pour un pH de 6-7.

C'est la raison pour laquelle lors de cette étude, un tampon phosphate (pH = 7) a été utilisé. Il permet d'une part, de stabiliser le pH au cours du traitement et d'autre part de diminuer le temps de traitement en faisant baisser la conductivité électrique de notre échantillon.

4.4.3 Optimisation

La recherche de l'optimum se fait à partir de la fonction désirabilité qui permet d'optimiser la réponse. Les valeurs de cette fonction sont comprises entre 0 et 1. La valeur de 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés. La figure suivante (Fig. 4.6) montre la surface de réponse en fonction de la désirabilité, estimée pour un temps de traitement de 48 μ s.



Le tableau (4.4) illustre l'évolution de la fonction de désirabilité pour chaque point du plan expérimental. Parmi les points du plan, le maximum de la désirabilité est atteint pour l'essai 13. La fonction désirabilité prédite qui permet d'optimiser la réponse est égale à 0,919.

Le tableau (4.5) indique les combinaisons des niveaux des facteurs qui maximisent la fonction de désirabilité. Il indique également la combinaison des facteurs pour laquelle l'optimum est atteint.

Selon (Roe 2000 ; Viskari et Colyer, 2003) dans Hemlata *et al.* (2011), la sélection d'un tampon approprié pour une extraction maximale des phycobiliprotéines est cruciale, car celui-ci assure que les protéines ne sont pas dénaturées en raison du changement de pH. Lors de la comparaison de divers tampons, le tampon phosphate de sodium a été considéré comme le meilleur tampon avec $100,5 \pm 0,22$ mg/g de phycobiliprotéines, tandis que l'eau double distillée a extrait à peine $83,6 \pm 0,17$ mg/g. D'après les auteurs, ce plus faible rendement peut être dû à l'incapacité de l'eau distillée à lyser la paroi cellulaire réduisant ainsi l'infiltration de pigment phycobiliprotéine.

Soni *et al.* (2008) et Hemlata *et al.* (2011) ont également observé que le tampon phosphate de sodium (pH=7,0) agit de façon efficace pour l'extraction de phycocyanine chez *Oscillatoria* et *Spirulina*. Le tampon phosphate de sodium possède également une propriété d'inhibition aux enzymes métaboliques, assurant de ce fait la stabilité des protéines pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Tableau 4.4 : Évolution de la fonction de désirabilité en fonction des différents essais.

| Essai | PbP | Pureté | Désirabilité | |
|-----------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | | | Prévue | Observée |
| 1 | 0,11 | 0,62 | 0,32 | 0,37 |
| 2 | 0,11 | 0,64 | 0,41 | 0,40 |
| 3 | 0,15 | 0,85 | 0,88 | 0,84 |
| 4 | 0,13 | 0,47 | 0,19 | 0,24 |
| 5 | 0,13 | 0,43 | 0,18 | 0,00 |
| 6 | 0,09 | 0,50 | 0,16 | 0,14 |
| 7 | 0,08 | 0,43 | 0,00 | 0,00 |
| 8 | 0,13 | 0,67 | 0,54 | 0,56 |
| 9 | 0,12 | 0,48 | 0,38 | 0,22 |
| 10 | 0,12 | 0,69 | 0,38 | 0,51 |
| 11 | 0,10 | 0,62 | 0,36 | 0,36 |
| 12 | 0,11 | 0,64 | 0,45 | 0,39 |
| 13 | 0,16 | 0,85 | 0,92 | 1,00 |
| 14 | 0,14 | 0,47 | 0,24 | 0,26 |
| 15 | 0,15 | 0,43 | 0,24 | 0,05 |
| 16 | 0,09 | 0,50 | 0,20 | 0,15 |
| 17 | 0,08 | 0,43 | 0,00 | 0,00 |
| 18 | 0,12 | 0,67 | 0,58 | 0,50 |
| 19 | 0,12 | 0,69 | 0,42 | 0,51 |
| 20 | 0,12 | 0,59 | 0,42 | 0,40 |

Tableau 4.5 : Optimisation de la désirabilité.

| <i>Facteur</i> | <i>Bas</i> | <i>Haut</i> | <i>Optimum codé</i> | <i>Optimum</i> | <i>Réponse</i> | <i>Optimum</i> |
|---------------------------------|------------|-------------|---------------------|----------------|------------------|----------------|
| Intensité de CEP (kV/cm) | -1,0 | 1,0 | 1,0 | 45 | PbP (g/L) | 0,163 |
| Température (°C) | -1,0 | 1,0 | -1,0 | 20 | Pureté | 0,849 |
| Temps (µs) | -1,0 | 1,0 | 1,0 | 72 | | |

4.4.4 Activité antioxydante de la phycocyanine

Dans cette étude, nous avons démontré l'activité antioxydante de la phycocyanine après avoir effectué une purification partielle de la C-PC, atteignant une pureté respectivement de 0,85, 2,72 à 4,08 pour l'extrait brut, le sulfate d'ammonium à 25 et à 50 %. Sachant que pour une pureté égale à 0,7, la C-PC est de qualité alimentaire, les fractions qui présentent une pureté supérieure à 4 sont considérées comme très pures (Boussiba et Richmond, 1979).

Il est donc important d'identifier et de caractériser de nouvelles sources d'antioxydants naturels fiables. Pour cela, nous avons étudié l'activité antioxydante d'un extrait de phycocyanine d'une pureté de 4 par rapport à l'activité de piégeage du radical hydroxyle DPPH (Figure 4.7).

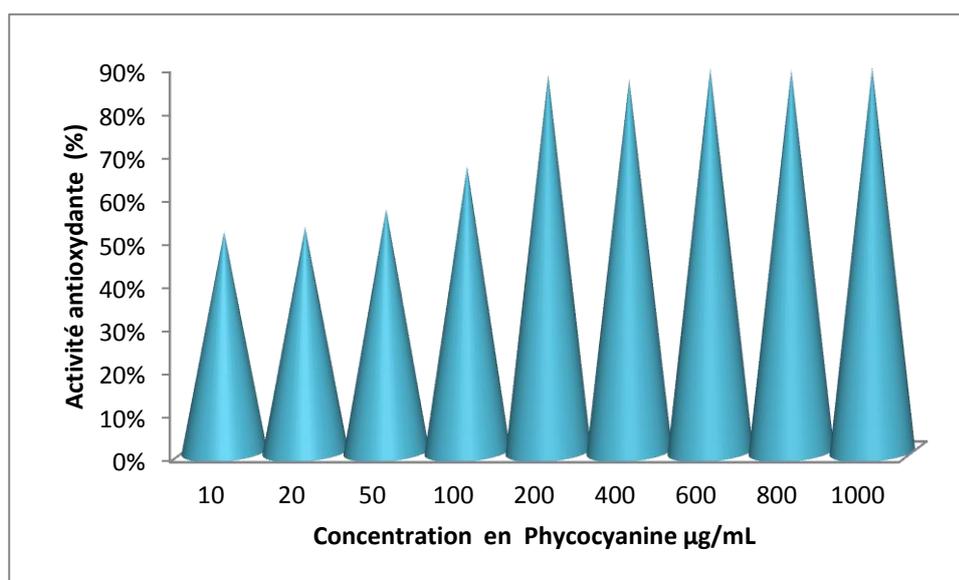


Figure 4.7 : Pourcentage du piégeage des radicaux libres DPPH en fonction des concentrations en phycocyanine (µg/ml).

Selon les résultats obtenus, des niveaux élevés du pourcentage de l'activité antioxydante (87 et 90 %) ont été enregistrés à une concentration de 200 et 1000 µg / mL respectivement, après 30 minutes d'incubation.

Ces résultats corroborent à ceux rapportés par Shalaby et Shanab (2013), qui ont montré 95,3% de l'activité antioxydante totale pour les mêmes conditions expérimentales que celles de notre étude.

Nous avons également observé que l'activité antioxydante augmentait proportionnellement à l'augmentation de la concentration en phycocyanine (variant entre 10 µg/mL jusqu'à 200 µg/mL). Au-delà de cette dernière concentration l'activité varie légèrement.

Les valeurs du pourcentage d'inhibition de l'activité radicalaire en fonction de la concentration en C-PC, et leur augmentation apparentée avec la teneur en phycocyanine démontrent l'activité antioxydante de cette biliprotéine. Selon Estrada *et al.*, (2001), la biliprotéine s'est avérée être le principal associé à l'activité antioxydante de l'extrait protéique de *S. platensis*.

Seo *et al.* (2013) ont trouvé un taux élevé d'inhibition des radicaux libres d'oxygène (83 %) pour des concentrations en phycocyanine de 50 µM. Dans leur étude, les auteurs ont extrait la phycocyanine en utilisant le procédé à haute pression qui est une technologie innovante.

Afin de vérifier la puissance de l'activité antioxydante de la phycocyanine, nous avons fait une comparaison entre la concentration inhibitrice de la phycocyanine à 50 % (IC₅₀) et celle d'un antioxydant standard habituellement utilisé l'hydroxytoluène butylé (BHT). Les résultats de l'essai ont montré que la concentration de phycocyanine nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres de DPPH dans le milieu réactionnel est de 9,6 µg / mL (figure 4.7).

Selon la courbe de la figure 4.8, la concentration en BHT (IC₅₀) correspond à 18,48 µg/mL. Il est à noter que plus la concentration de l'extrait, efficace pour l'inhibition de 50 %, est basse plus son pouvoir antioxydant est important (c'est-à-dire, une valeur inférieure de IC₅₀ de DPPH indique une meilleure capacité de piégeage de radicaux libres de l'extrait).

D'après ces résultats le IC_{50} de la C-PC et du BHT est respectivement de 50 $\mu\text{g/mL}$ et 18,48 $\mu\text{g/mL}$. La C-PC possède donc un pouvoir antioxydant très élevée. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par; Romay *et al* (2003) ; Guan *et al.* (2009) ; Shalaby et Shanab, (2013) et Chen *et al.*, (2014) .

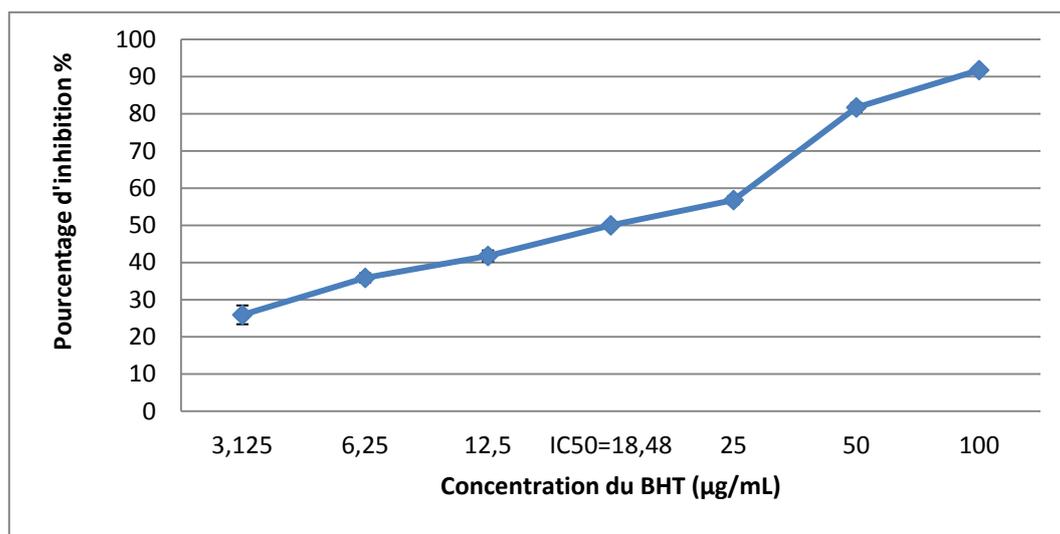


Figure 4.8 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations du BHT ($\mu\text{g/ml}$).

4.4.5 Spectre infrarouge de la phycocyanine

Le spectre IR de la C-phycocyanine est représenté sur la figure (4.9). Les pics maximaux d'absorption de la C-phycocyanine se situent autour des valeurs : 3256, 1635, 1448, 1090 et 650 cm^{-1} . Selon Gang *et al.*, (1999), les pics maximaux d'absorption de la C-phycocyanine sont à 3200, 1650, 1550, 1100, 1050 et 650 cm^{-1} , valeurs proches de nos résultats.

Une bande (vibration) d'élongation de la fonction N-H (mouvements relatifs des atomes suivant leur axe de liaison) est observée à 3256 cm^{-1} . Cette bande est caractéristique des amides secondaires (deux groupes R-C = O liés à l'azote). Une bande de déformation (mouvements avec variation des angles de liaison) dans le plan de NH_2 est toujours observée entre 1550 et 1650 cm^{-1} . Alors que la bande de vibration C-N est observée à 1448 cm^{-1} . Pour les bandes d'élongation de C-N des amines aliphatiques cette bande se manifeste entre 1000 et 1250 cm^{-1} . Dans notre cas, elle correspond à 1090 cm^{-1} .

Ce spectre IR fournit un renseignement important sur la structure de la C-phycocyanine et peut être utilisé pour une identification rapide.

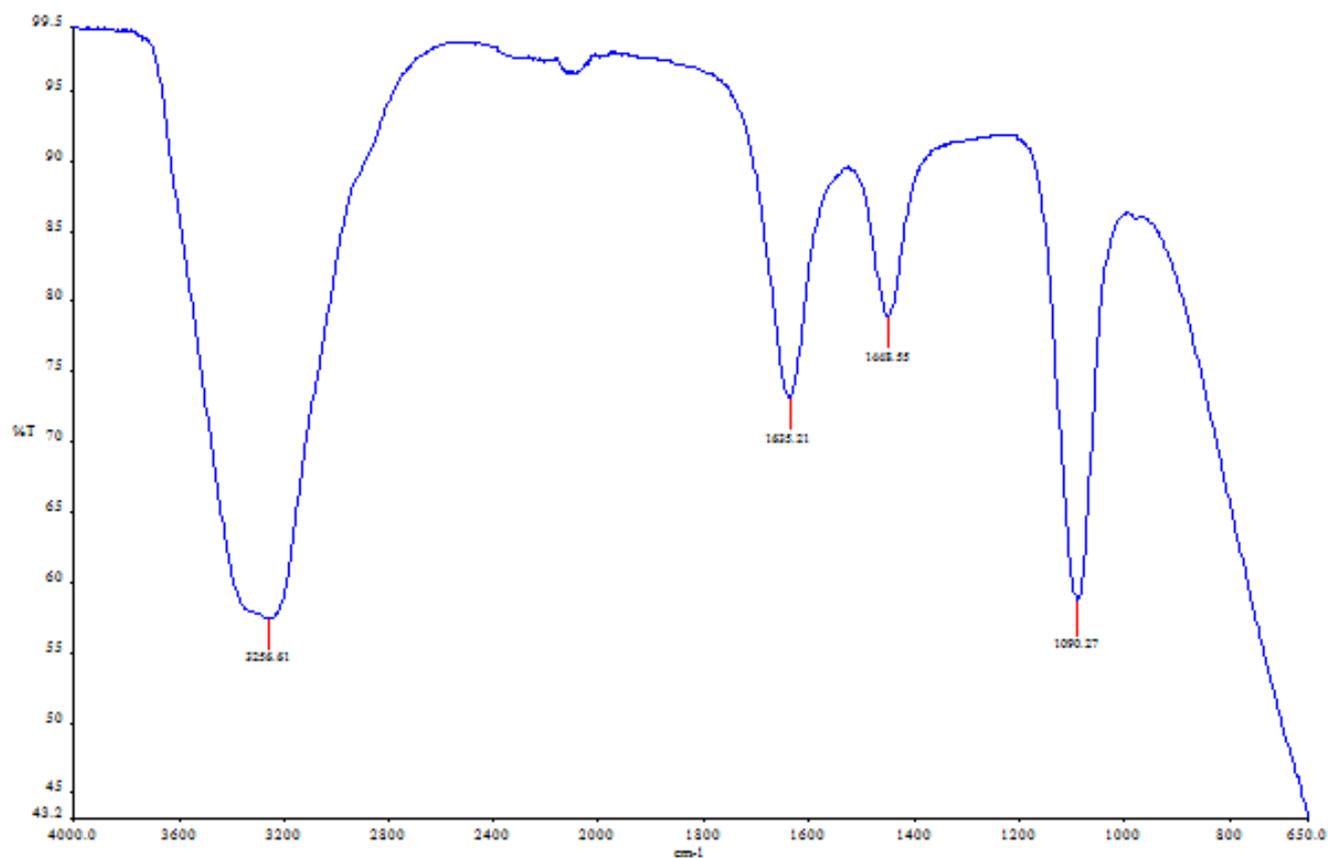


Figure 4.9 : FTIR de la phycocyanine.

4.5 Conclusion

Nous avons démontré, dans le cadre de notre étude, que les principaux paramètres, à savoir l'intensité du champ électrique, le temps de traitement et la température, ainsi que leurs interactions sont des éléments critiques pour permettre l'extraction des phycobiliprotéines dotées d'une bonne pureté de C-PC, à partir de la biomasse fraîche d'*A. platensis*. L'intensité de CEP s'avère être le paramètre le plus important qui influe sur l'électroporation de cette microalgue.

Les résultats de l'optimisation ont montré que les conditions optimales pour maximiser le rendement en PbP (0,16 g/L) avec une bonne pureté de C-PC (0,85), s'obtenaient pour une intensité de CEP égale à 45 kV/cm, à une température de 20 °C et durant un temps de traitement n'excédant pas 75 μ s.

Il ressort également de cette étude, que la C-PC recueillie après avoir subi une prépurification possède une activité antioxydante très élevée, avec un IC_{50} égal à 9,6 μ g/mL, supérieure à celle du BHT ($IC_{50}=18,48$).

5.1 Conclusions

L'objectif primordial de cette étude consiste en l'extraction des composés bioactifs présents dans la spiruline, par le biais d'une technique innovante de désintégration cellulaire à savoir le traitement par champ électrique pulsé (CEP). Pour atteindre cet objectif, plusieurs études expérimentales ont été réalisées.

Dans la première partie, une caractérisation sur le plan biochimique et phytochimique de cinq souches de spiruline a été effectuée. Deux d'entre elles ont été cultivées dans des conditions contrôlées, à l'échelle de notre laboratoire. Les trois autres souches ont été utilisées sous forme de poudre, en provenance de la région de Tamanrasset, du lac Tchad et d'Hawaï. Le but recherché durant cette étude est d'une part la maîtrise de la culture de la spiruline et d'autre part, la production d'une biomasse importante riche en composés bioactifs principalement les phycobiliprotéines (PbP).

Sur la base des résultats obtenus, la souche HTam cultivée au laboratoire a été sélectionnée pour la suite des travaux en raison de sa richesse en phycocyanine brute (plus de 24 %). Nous avons ainsi pu réaliser dans un premier temps, une analyse comparative de l'efficacité de plusieurs procédés d'extraction innovants et conventionnels (CEP en mode statique et en mode continu, ultrasons et congélation/décongélation), des phycocyanines à partir de la spiruline fraîche.

Le processus du champ électrique pulsé a le mieux prouvé son efficacité dans l'amélioration du rendement d'extraction des PbP à partir de la spiruline fraîche. Par la suite, une étude expérimentale a été réalisée dans le but de déterminer précisément l'effet de différents paramètres (l'intensité du CEP, la température et le temps), sur l'efficacité du traitement par CEP. En dernier lieu, une modélisation et une optimisation ont été réalisées pour augmenter le rendement d'extraction des phycobiliprotéines par CEP, avec une bonne pureté de la C-PC.

Les principales conclusions et contributions aux connaissances résultant de cette recherche peuvent être résumées ci-dessous :

- 1- L'étude de la composition de la spiruline a permis de démontrer son extrême richesse en nutriments (principalement les protéines), en micronutriments tels que fer, Cu, Mn, ou encore en acides gras essentiels (ω -6) et en composés bioactifs (C-PC, polyphénols

et caroténoïdes). La présence de tous ces constituants réunis dans un seul et même microorganisme apporte à celui-ci une valeur nutritionnelle unique.

- 2- Les exigences simples des microalgues pour leurs croissances rendent ces microorganismes extrêmement faciles à cultiver. La microalgue *A. platensis* (spiruline) peut croître en milieu naturel ou semi-naturel et en culture synthétique. Dans ce dernier cas, la culture doit être contrôlée dans le but d'obtenir une production massive de biomasse d'une valeur nutritive élevée.
- 3- Il est impératif, lors de l'achat de la spiruline pour sa propre consommation, de s'assurer de son origine, de sa composition et des conditions dans lesquelles elle a été cultivée et récoltée. Ceci est dû aux différences de composition et aux risques de contaminations microbiologique et toxicologique. Il faut être attentif à la composition des spirulines surtout celles issues d'une culture non contrôlée. Indubitablement, les résultats obtenus dans cette étude le prouvent, les conditions de culture qu'elles soient naturelles ou artificielles influent de façon significative sur la composition nutritionnelle de manière qualitative ou quantitative.
- 4- La comparaison de l'efficacité des différents traitements (CEP en modes statique et continu, ultrasons, congélation/décongélation) sur l'amélioration de l'extraction des phycobiliprotéines à partir de la microalgue *A. Platensis* n'avait jamais été étudiée auparavant. Cette étude montre que la technologie du CEP se révèle être une technologie prometteuse pour l'extraction des phycobiliprotéines, et ce en raison de ses multiples avantages : non thermique, rapide, ne nécessitant l'emploi d'aucun solvant ou de produit chimique et permettant une grande reproductibilité.
- 5- L'application du CEP en mode continu offre un bon potentiel pour remplacer les techniques conventionnelles de désintégration des cellules, jugées trop coûteuses et destructrices de l'extrait. De plus, cette même application en continue durant de courtes durées de traitement (de l'ordre de la microseconde), en fait une technique de choix pour l'extraction des composés bioactifs intracellulaires.
- 6- Les résultats de l'optimisation ont montré que pour avoir un bon rendement d'extraction de PbP (16,3%) avec une bonne pureté (≥ 8), il suffisait d'appliquer une forte intensité de CEP (45 kV/cm) pour un laps de temps très court (72 μ s) en travaillant à température ambiante (20 °C).

- 7- La réduction du nombre d'étapes de purification de la phycocyanine, après extraction par CEP, à aussi permis d'avoir une quantité importante de C-PC d'une pureté très élevée (environ 4). Dans la plupart des cas, les récupérations finales étaient faibles en raison du grand nombre d'étapes nécessaires pour atteindre des niveaux de pureté très élevée.
- 8- L'étude des propriétés antioxydantes des phycocyanines extraites d'*A. Platensis* par le champ électrique pulsé a montré que les C-PC extraits puis seulement prépurifiés sont d'excellents anti-radicaux et antioxydants naturels.

5.2 Perspectives

La spiruline, l'aliment le plus riche en protéines connu à ce jour. Actuellement, il s'agit plus d'un complément alimentaire que d'un aliment simple. Au vu des multiples avantages fournis par une production locale et d'un apport économique, d'une denrée riche de promesses dans un pays où l'alimentation traditionnelle, soit par manque de ressources soit par ignorance, ne procure pas un apport nutritionnel quotidien suffisamment équilibré. Nous souhaiterions que la production de spiruline devienne une priorité pour notre pays.

Dans le cadre de l'utilisation de la phycocyanine dans le domaine du nutraceutique et de la nutrition humaine, il est également intéressant de compléter cette étude par d'autres analyses, à savoir le dosage des acides aminés, des vitamines et de s'assurer que les limites de sécurité des métaux lourds ne soient pas dépassés. Concrètement ces travaux de recherche gagneraient à être poursuivis pour une meilleure valorisation de cet aliment.

De même, pour augmenter les rendements de production des composés bioactifs de valeur élevée (Phycobiliprotéines, ω -6 et ω -3) de cette microalgue, des modifications génétiques peuvent être évaluées. Plus encore, les conditions de croissance de sa culture (température, nutriments, lumière) devraient davantage être évaluées, et ce dans le but d'augmenter la quantité de composés bioactifs produits par ces microorganismes.

Les méthodes d'extraction par CEP et de purification de la phycocyanine ont été étudiées à l'échelle de laboratoire et de manière réduite. Si l'on désire rentabiliser la production de spiruline pour son utilisation à des fins pharmaceutiques et alimentaires, l'application de ces méthodes doit passer à l'échelle industrielle. L'avantage le moins négligeable est que la technologie de CEP ne consomme pas beaucoup d'énergie.

Les interactions entre le produit à traiter et le processus du CEP ainsi que les éventuels changements indésirables, restent incertains. Pour cette raison, chaque nouvelle technologie est subordonnée à une autorisation requise dans le cadre du règlement législatif sur les nouveaux aliments.

La C-PC est une molécule qui se dégrade très rapidement, après son extraction, du fait de conditions telles que la lumière, la température et la contamination par les microorganismes entraînant, malheureusement, une décomposition de ces protéines. Il serait judicieux d'entreprendre des études en vue d'augmenter la stabilité de l'extrait de phycocyanine par l'ajout d'agent de conservation, sans danger pour le consommateur.

Enfin, les efforts devraient se concentrer sur la réduction de la perte de produits et des coûts d'équipement et d'énergie associés aux étapes d'extraction, de purification et de stabilisation. De plus, la transformation en aval et à grande échelle de la technologie du CEP pour l'extraction des phycocyanines devrait être améliorée afin de développer des procédés économiquement viables et respectueux de l'environnement.

Références bibliographiques

A

- Abd El Baky H. H., El-Baroty G.S. (2013). Healthy benefit of microalgal bioactive substances. *Journal of Aquatic Science*, 2013, Vol. 1, n° 1, p.11-2.
- Abu Affan Md., Lee D.W., Jeon S.M., Noh J.H., Heo S.J., Oh C., Park H.S., Hisham Sulaiman A. Khomayis, Kang D.H. (2015). Bituminous coal and sodium hydroxide-pretreated seawater stimulates *Spirulina (Arthrospira) maxima* growth with decreased production costs. *Aquaculture*, Vol. 436, p. 121-126
- Achard M.A. (1994). Etude et modélisation du transfert de CO₂ dans les photobioréacteurs. Application à l'étude de la limitation par la source de carbone chez *S. platensis*, D.E.A. Université Blaise Pascal., Laboratoire de Génie Chimique Biologique.
- Agriculture et agroalimentaire Canada, (2015). Aliments fonctionnels et produits de santé naturels - Industrie canadienne. [En Ligne]. http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/statistiques-et-information-sur-les-marches/par-produit_secteur/aliments-fonctionnels-et-produits-de-sante-naturels/aliments-fonctionnels-et-produits-de-sante-naturels-industrie-canadienne/?id=1170856376710 (Page consultée le 28 novembre 2016).
- Aguilo'-Aguayo I., Odriozola-Serrano I., Quintao-Teixeira L.J., Martí'n-Belloso O., (2008). Inactivation of tomato juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as affected by process conditions. *Food Chem*, Vol. 107, p. 949-955.
- Aguilo'-Aguayo I., Soliva-Fortuny R., Martí'n-Belloso O., (2009). Changes on viscosity and pectolytic enzymes of tomato and strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields. *Int. J. Food Sci. Technol*, Vol. 44, p. 2268-2277.
- Al-Dhabi N.A., (2013) Heavy metal analysis in commercial *Spirulina* products for human consumption Saudi. *J Biol Sci*. Oct 2013; 20 (4): 383-388.
- Al-Dhabi N.A., Arasu M.V. (2016). Quantification of Phytochemicals from Commercial *Spirulina* Products and Their Antioxidant Activities. *Evid Based Complement Alternat Med*. Volume 2016: ID 7631864, 13 pages.

- Al-Homaidan A.A. (2006). Heavy Metal Levels in Saudi Arabian *Spirulina*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol. 9 | Issue: 14 | p. 2693-2695
- Alvarez I., Raso J., Palpo A., Sala F.J., (2000). Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 55, p. 143-146.
- Amiali M., (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Enteritidis* in Liquid egg products using pulsed electric field. Thèse de Doctorat, Department of Bioresource Engineering Macdonald Campus, McGill University Montreal, Quebec. 192 p.
- Amiali M., Ngadi M.O, Raghavan Vijaya G.S., A. Nguyen D.H., (2006). Electrical Conductivities of Liquid Egg Products and Fruit Juices Exposed to High Pulsed Electric Fields. *International Journal of Food Properties*, Vol. 9, p. 533-540.
- Amiali M., Ngadi M.O, Smith J.P., Raghavan Vijaya G.S., (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, vol. 79, p. 689-694.
- Amiali M., Ngadi M.O., (2012). Microbial decontamination of food by Pulsed Electric Fields (PEFs), in *Microbial decontamination in food industry: Novel Methods and Applications*, Chap. 14, pp 407- 449, Woodhead Publishing Ltd. U.K.
- Anamika. P, Sandhya M, RichaPawar, P.K. Ghosh., (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, Vol. 40, p. 248-255.
- Andersen R.A., (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Inc. Hardback Ltd., 578 p. ISBN: 0-12-088426-7
- Anonyme, (1970). *Agricultural Food Products - General directions for the determination of nitrogen with mineralization by the Kjeldahl method*. NF V03-050:1970
- Anonyme, (1992). *Méthode de recherche et dénombrement de la Flore Mésophile*. Association Francaise de Normalisation (AFNOR). AFNOR V08-051-Décembre 1992. Aérobies Totales. Paris: AFNOR, Décembre 1992 ; 5 p
- Anonyme, (1996). *Méthode de recherche et dénombrement de Flore fongique*. Association Francaise de Normalisation, AFNOR XP-08-059-octobre 1996. Paris, 1 p

- Anonyme, (2008). Complément d'information sur la spiruline. Spiruline Saint-Augustin. www.spiruline-saint-augustin.com. France.
- Anonyme, (2009). NF V08-050 Avril 2009. Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes présumés par comptage des colonies obtenues à 30 °C.
- Anonyme, (2015). L'or bleu de la spiruline : la phycocyanine. <http://www.consoglobe.com/spiruline-phycocyanine-cg>.
- Anonyme, (2016). Supercritical CO₂. Nova Sterilis. [en ligne], <http://www.novasterilis.com/index.PbP/application/supercritical-co2>. (Page consultée le 28 novembre 2016).
- Antelo F.S., Costa J.A.V., Kalil S.J. (2008). Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J*, Vol. 41, p. 43-47.
- AOAC, (1990). Official methods for analysis. 15th edn. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC, Etats-Unis.
- Aouir A., Amiali M., Gachovska T. K., Benchabane A., Bitam A., (2015). The effect of pulsed electric field (PEF) and ultrasound (US) technologies on the extraction of phycopiliproteins from *Arthrospira Platensis*. IEEE Canada International Humanitarian Technology Conference (IHTC), *IEEE Communications Letters*, 2015, p. 1-4
- Araujo G.S., Matos L.J.B.L., Fernandes J.O., Cartaxo S.J.M., Gonçalves L.R.B., Fernandes F.A.N., Farias W.R.L., (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method, *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 20, p. 95-98.
- Asavasanti S., Ersus S., Ristenpart W., *et al* (2010). Critical electric field strengths of onion tissues treated by pulsed electric fields. *J Food Sci*, vol. 75, p. 433-443.
- Aychunie S., Belay A., Baba T.W., Ruprecht R.M., (1998). Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr*, Vol.18, p. 7-12.

B

- Balasubramanian S., Allen J.D., Kanitkar A., Boldor D., (2011). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system--design, optimization, and quality characterization. *Bioresour Technol*, Vol. 102, n° 3, p. 3396-3403.

- Balloni W., Tomaselli L., Giovannetti L., Margheri M.C., (1980). Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In Materassi, R. (Ed.) *Prospettive della Coltura di Spirulina in Italia*, p. 49, Roma: CNR.
- Barbosa-Cánovas G.V., Góngora-Nieto M.M., Pothakamury U.R. Swanson B.G., (1999). Preservation of foods with pulsed electric fields (Academic Press, San Diego, California, USA).
- Barbosa-Canovas G.V., Pothakamury U.R., Palou E. Et Swanson B.G., (1998). Pulsed electric fields: effects and application. In Barbosa-Canovas G.V., Pothakamury U.R., Palou E., Swanson B.G (eds.) *Non thermal preservation of foods*, Marcel Dekker, New-York, p. 73-112.
- Barsotti L. Cheftel J.C., (1999). Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Reviews International*, Vol. 15, p. 181-213.
- Barsotti L., Merle P. Cheftel J.C., (1998). Traitement des aliments par champs électriques pulsés : I-Aspects physiques. *Sci.Alim*, Vol.18, p. 583-601.
- Bazhal M., Lebovka N.I., Vorobiev E., (2001). Pulsed electric field treatment of apple tissue during compression for juice extraction. *Journal of Food Engineering*, Vol. 50, p. 129-139.
- Bazhal M., Vorobiev E., (2000). Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, p. 1668-1674.
- Becker E.W., (1995). *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press. 293 p.
- Belay A., (1997). Mass culture of *Spirulina* outdoors: the Earthrise Farms experience. In Vonshak, A. (ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, London: *Taylor & Francis*, pp.131-158.
- Ben ammar J., (2011). Etude de l'effet des champs électriques pulsés sur la congélation des produits végétaux. Thèse de Doctorat, Génie des Procédés Industriels. Université de Technologie de Campiégne UTC, France. 189 p.
- Benaissi K., (2013). Le CO₂ supercritique appliqué à l'extraction végétale. Développement de solvants alternatifs et intensification des procédés. REF: TIB492DUO. http://www.techniques-ingenieur.fr/base_documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/developpement-de-solvants-alternatifs-et-intensification-des-procedes-42492210/le-CO2-supercritique.

- Bendicho S., Barbosa-Ca'novas G.V., Marti'n O., (2003). Reduction of protease activity in milk by continuous flow high-intensity pulsed electric field treatments. *J. Dairy Sci*, vol. 86, p. 697-703.
- Benedetti S., Benvenuti F., Pagliarani S., Francogli S., Scoglio S., Canestrari F., (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*, *Life Sci*, vol. 75, p. 2353-2362.
- Bensehaila S, Doumandji A, Boutekrabt L, Manafikhi H, Peluso I, Bensehaila K, Kouache A and Bensehaila A., (2015). The nutritional quality of *Spirulina platensis* of Tamenrasset, Algeria. *Afr. J. Biotechnol*, vol. 14, n° 19, p. 1649-1654.
- Bermejo R., Felipe M.A., Talavera E.M., Alvarez-Pez J.M., (2006). Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia*, vol. 63, n° 59, p.1-2.
- Bhakar R.N., Brahmdudd Sunil Pabb., (2014). Total lipid accumulation and fatty acid profiles of microalga *Spirulina* under different nitrogen and phosphorus concentrations. *Egyptian Journal of Biology*, vol. 16, p. 57- 62.
- Bhat V.B., Madyastha K.M., (2000). C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys.Res. Commun*, vol. 275, p.20-25.
- Bogorad I., (1975). Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol*, vol. 26, 369-401.
- Boussiba S., Richmond A.E., (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, vol.120, p. 155-159.
- Brejc K., Ficner R., Huber R., Steinbacher S., (1995). Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol*, vol. 249, p. 424-440.
- Bucaille P., (1990). Intérêt et efficacité de l'algue spiruline dans l'alimentation des enfants présentant une malnutrition protéino-énergétique en milieu tropical. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, 10/10/1990.
- Bujard E., Braco U., Mauron J., Mottu F., Nabholz A., Wuhrmann J.J., Clément G., (1970). Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations. 3rd.international Congress of Food Science and Technology, Washington.

C

- Cai Y.Z, Luo Q, Sun M., Corke H., (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, vol. 74, p. 2157-2184.
- Camel V., (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, vol. 126, n° 7, p. 1182-1193.
- Campanella L., Cubadda F., Sammartino M.P., Saoncella A., (2000). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.*, vol. 35, p. 69-76.
- Capelli B., Gerald R. Cysewski., (2010). Potential health benefits of *Spirulina* microalgae. A review of the existing literature. *Nutra foods*, vol. 9, n° 2, p. 19-26.
- Cardoso L.C., Serrano C.M., Rodriguez M., De la Ossa E.J., Lubian L.M., (2012). Extraction of carotenoids and fatty acids from microalgae using supercritical technology. *Am J Anal Chem*, vol. 3, p. 877-883.
- Castenholz R.W., (1989). Subsection III, Order *Oscillatoriales*. In Stanley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, p. 1771, Baltimore: William and Wilkins.
- Castro A.J., (1994): Pulsed electric field modification of activity and denaturation of alkaline phosphatase. Ph. D. thesis, Washington State University, Pullman, Washington.
- Chaiklahan R., Chirasuwan N., Bunnag B., (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochem .*, vol. 47, p. 659-664.
- Charlemagne D., (2008). La spiruline : aliment santé ?. Mémoire, DIU Alimentation Santé et Micronutrition de la faculté de pharmacie de Dijon. Année 2007/2008.
- Charpy L., Langlade M.J., Alliod R., (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Institut de Recherche pour le Développement UR 167 (CYROCO) COM, rue de la Batterie des Lions 13007 Marseille, p.1-43

- Chemat S., Lagha A., AitAmar H., Bartels P. V., Chemat F., (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, vol.19, n° 3, p. 188-195.
- Chen C.Y., Chen Y.C., Huang H.C., Huang C.C., Lee W.L., Chang J.S., (2013). Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2. *Biores Technol.*, vol. 147, p. 160-167.
- Chen H.W., Yangb T.S., Chena M.J., Chang Y.C. *et al.*, (2014), Purification and immunomodulating activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochemistry*, vol. 49, p. 1337-1344.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P., (2016). Phycobiliproteins: A new perspective in natural pigments derived from microalgae. *J Oceanogr Mar Res*, 4:114.
- Ciferri O., (1983). *Spirulina*, the edible microorganism, *Microbiological Reviews*, vol. 47, p. 551-578.
- Ciobanu, V.G., (1987). Increase of the effectiveness of vegetable stuff treatment by electropulsation. Thèse de l'Université d'Odessa Technological Institute of Food Industry, Odessa, Ukraine.
- CNA, (2009). Avis sur le développement des nouvelles technologies dans la fabrication, le conditionnement et la conservation des denrées alimentaires : conséquences, responsabilité des opérateurs et acceptabilité sociale. Avis n°65 du Conseil National de l'Alimentation. 2009 http://www.cna-alimentation.fr/wp-content/uploads/2013/04/cna_avis65.pdf
- Cohen Z, Vonshak A, Richmond A., (1987). Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry*, vol. 26, p. 2255-2258.
- Coustets M., Joubert-Durigneux V., Hérault J., Schoefs B., Blanckaert V., Garnier J.P., Teissié J., (2014). Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry*, p1-8.
- Cuellar-Bermudez S.P., Aguilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D.L., Nancy Ornelas Soto, Miguel A., Romero-Ogawa M.A., Parra-Saldivar R., (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, vol. 8, n° 2, p. 190-209.

D

- Daghbir R., Igounet L., Brar S.K., Drogui P., (2014). Novel electrochemical method for the recovery of lipids from microalgae for biodiesel production. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 45, p. 153-162.
- Dartsh P.C., (2008). Antioxydant potential of selected *Spirulina platensis*. *Phytother.Res.*, vol. 22, p. 627-633.
- De Haan, S.W.H., Willcock, P.R., (2002). Comparison of the energy performance of pulse generator circuits for PEF. *Innov. Food Sci. Emerg.*, vol. 3, p. 349-356.
- Déniel P., (2010). Des extraits végétaux plus verts. *L'Usine Nouvelle* n°3179. <http://www.usinenouvelle.com/article/des-extraits-vegetaux-plus-verts.N126133>
- Dey S., Rathod V.K., (2013). "Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*", *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 20, p. 271-276.
- Dimitrov D.S., (1984). Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: A thin viscoelastic model. *J. Membr. Biol.*, vol. 78, p. 53-60.
- Doevenspeck, H. (1960). "Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung der einzelnen Phasen aus dispersen Systemen." German Patent DE Germany, 1237-154.
- Doevenspeck, H. (1961). "Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses. *Fleischwirtschaft*, vol. 13, n° 12, p. 968-987.
- Dunn J.E., Pearlman J.S. (1989). Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. Maxwell Laboratories, Inc., San Diego, U.S. patent. 4838154 <http://www.freepatentsonline.com/4838154.html>.
- Duy, T.N., Lam P.K.S., Shaw G.R., Connell D.W., (2000). Toxicology and Risk Assessment of Freshwater Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 163, p. 113-186.

E

- El-Belghiti K., Moubarik A., Vorobiev E., (2008). Aqueous extraction of solutes from fennel (*foeniculum vulgare*) assisted by pulsed electric field. *J. Food Process. Eng.*, vol. 31, p. 548-563.
- Elez-Martínez P., Suares-Recio M., Martín-Belloso O., (2007). Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *J. Food Eng.*, vol. 78, p. 184-193.

- Elez-Martínez P., Escolá-Hernández J., Soliva-Fortuny R.C., Martín-Belloso O., (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* suspended in orange juice using high-intensity pulsed electric fields. *J. Food Protect.*, vol. 67.
- Elez-Martínez P., Escolá-Hernández J., Soliva-Fortuny R.C., Martín-Belloso O., (2005). Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Food Microbiol.*, vol. 22, p. 311-319.
- Elez-Martínez P., Sobrino-López Á., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O., (2012). Pulsed electric field processing of fluid food In « Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods » Edited by: P.J. Cullen, Brijesh K. Tiwari and Vasilis Valdramidis. Pages 63-108, ISBN: 978-0-12-381470-8
- El-Sheekh M.M., Fathy A.A., (2009). Variation of some nutritional constituents and fatty acid profiles of *Chlorella vulgaris* Beijerinck grown under auto and heterotrophic conditions. *International Journal of Botany*, vol. 5, p. 153-159.
- Estrada J.E., Bescós P., Villar A.M., Del Fresno (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protein extract. *Il Farmaco*, vol. 56, p. 497-500.

F

- Falquet J., Hurni J.P., (2006). The nutritional aspects of Spirulina. Antenna technologies. www.antenna.ch/documents/. 1-25p.
- FDA, (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. U.S. Food and Drug Administration. Washington, D.C.: USFDA.
- Flisar K., Meglic S.H., Morelj J., Golob J., Miklavcic D., (2014). Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for *E. coli* inactivation and microalgae lipid extraction”, *Bioelectrochemistry*, vol. 100, p. 44-51.
- Floreto E.A.T., Hirata H., Ando S., Yamasaki S., (1993). Effects of temperature, light intensity, salinity and source of nitrogen on the growth, total lipid and fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta). *Bot Mar*, vol. 36, p. 149- 158.
- Fox R.D., (1986). "Algoculture: la spirulina, un espoir pour le monde de la faim", Edisud, Aix-en-Provence
- Fox R.D., (1999). "Spirulina, production & potential", Edisud, Aix-en-Provence, 246 p.

- Franke H., Springer M., Pulz O., Tietz U., Mueller U., (1994). Polyunsaturated fatty acids from microalgae, *International Food Ingredients*, vol. 4, p. 41-45.
- Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., Hirokawa, T., *et al.* (2003) Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *J Appl Phycol*, vol. 15, p. 319-324.

G

- Gachovska T., Ngadi M., Raghavan V., (2006). Pulsed electric field assisted juice extraction from alfalfa. *Can Biosyst Engr.*, vol. 48, n° 3, p. 33-7.
- Gang Y., Zheng L., Fei L., Chen L., Fu-x in D., Nai-ju Y., (1999). Isolation and Characterization of C-phycocyanin from *Spirulina Platensis*. *Chemical Research in Chinese Universities*. Vol. 15, p. 35-38.
- Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A.H., Elst K., Van Ginneken L., Van Impe J.F., Devlieghere F., (2009). Influence of type of microorganism, food ingredients and food properties on high pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*; vol.129, p. 253-263.
- Gardeva E.G., Toshkova R.A., Yossifova L.S., Minkova K., Ivanova N.Y., Gigova L.G., (2014). Antitumor activity of C-phycocyanin from *Arthronema africanum* (Cyanophyceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, p. 675-684.
- Giner-Seguí, J., Elez-Martínez, P., Martí'n-Belloso, O., (2009). Modeling within the Bayesian framework, the inactivation of pectinesterase in gazpacho by pulsed electric fields. *J. Food Eng.*, vol. 95, p. 446-452.
- Girardin-Andreani C., (2005). Spiruline : système sanguin, système immunitaire et cancer. *Phytotherapie*, vol. 4, p. 158-161.
- Go'ngora-Nieto, M.M., Sepu'veda, D.R., Pedrow, P., Barbosa-Ca'novas, G.V., Swanson, B.G., (2002). Food processing by pulsed electric fields: treatment delivery, inactivation level and regulatory aspects. *LWT- Food Sci. Technol.*, vol. 35, p. 375-388.
- Goettel M., Eing C., Gusbeth C., Straessner R., Frey W., (2013). Pulsed electric field assisted extraction from intracellular valuables from microalgae. *Algal. Res.*, vol.2, n° 4, p. 401-408.
- Goja A.M., Yang H., Cui M., Li C., (2013), Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. *J. Bioprocess. Biotechnol*, vol. 4, p. 1-8.

- Golberg A., Sack M., Teissie J., Gianpiero P., Uwe P., Gintautas S., Töpfl S., Miklavcic D., Eugene V., Frey W., (2016). Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development. *Biotechnol Biofuels*, vol. 9, n° 94 DOI 10.1186/s13068-016-0508-z
- Golovanov M.V., (1995). The analysis of structure electric double layer of the living cell. *Biophysics*, vol.40, n° 2, p.72-376.
- Gouveia L., Batista A.P., Sousa I., Raymundo A., Bandarra N.M., (2009). Microalgae in novel food products. In *Algae: Nutrition, Pollution control and Energy sources*. Editor: Kristian.N Hagen , p.265-300, chap14.
- Grahl T., Markl H., (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, p. 148-157.
- Grimi N., Dubois A., Marchal L., Jubeau S., Lebovka N.I., Vorobiev E., (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, vol. 153, p. 254-259.
- Grimi N., Lebovka N.I., Vorobiev E., Vaxelaire J., (2009). Effect of a pulsed electric field treatment on expression behavior and juice quality of Chardonnay grape. *Food Biophysics*, vol. 4, p. 191-198.
- Grimi N., Mamouni F., Lebovka N., Vorobiev E., Vaxelaire J., (2010). Acoustic impulse response in apple tissues treated by pulsed electric field. *Biosystems Eng.*, vol. 105, p. 266-272.
- Grossman A.R., Schaeffer M.R., Chiang G.G., Collier J.L., (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.*, vol. 57, p. 725-749.
- Guan X., Zhang W., Zhang X., Li Y., Wang J., Lin H., Tang X., Qin S., (2009). A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant C-phycoerythrin of *Spirulina*, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, p. 1093-1100.
- Gur C.S., Erdogan D.K., Onbasilar I., Atilla P., Cakar N., Gurhan I.D., (2013). In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude *Spirulina* extract and C-phycoerythrin. *J. Medicinal Plants Res.*, vol. 7, p. 425-433.
- Gusbeth C.A., Eing C., Göttel M., Frey W., (2013). Boost of algae growth by ultra short pulsed electric field treatment. *Plasma Science (ICOPS), 2013 Abstracts IEEE International Conference* Date of Conference: 16-21 June 2013. DOI: [10.1109/PLASMA.2013.6633325](https://doi.org/10.1109/PLASMA.2013.6633325)

- Guschina I.A., Harwood J.L., (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res.*, vol. 45, p. 160-186.

H

- Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R., (2008). A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular, No. 1034, Rome, FAO. 2008. 33p.
- Halawlaw Y.I., (2014). *Spirulina* microalga: A food for future. *Pinnacle Biotechnology*, vol. 1, n°2, p. 249-255.
- Harwati T.U., (2013). Cultivation of microalgae: lipid production, evaluation of antioxidant capacity and modeling of growth and lipid production. PhDThesis, Faculty of Life Sciences at the Technical University Carolo-Wilhelmina at Brunswick. 130 p.
- Hayashi T., Hayashi K., (1996). Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, vol. 59, p. 83-87.
- Heinz V., Alvarez I., Angersbach A., Knorr D., (2002). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - Basic concepts for process design. *Trends in food science and technology*, vol. 12, p. 3-4.
- Hemlata G.P., Bano F., Fatma T., (2011). Studies on *Anabaena* sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin. *J. Algal Biomass Utln.*, vol. 2, n° 1, p. 30 -51.
- Ho S.Y., Mittal G.S., Cross J.D., Griffiths M.W., (1995). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science*, vol. 60, n°6, p. 1337-1343.
- Huang K., Wang J., (2009). Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: a review. *J. Food Eng.*, vol. 95, p. 227-239.
- Hudson B.J.F., Karis I.G., (1974). The lipids of the alga *Spirulina*, *Journal of Science, Food and Agriculture*, vol. 25, p. 759-763.
- Hülsheger H., Potel J. Niemann E.G., (1983). Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, vol.22, p. 149-162.

J

- Jacotot B., Campillo B., (2003). Nutrition humaine, Abrégés, Connaissances et pratiques. Paris: Masson.

- Jaeger H., Balasa A., Knorr D., (2008). Food industry applications for pulsed electric fields In E. Vorobiev, N. Lebovka (eds.), *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*, DOI: 10.1007/978-0-387-79374-0 7, C _ Springer Science+Business Media, LLC. 280 p
- Jayaram S., Castle G.S.P., Margaritis A., (1992). Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnology Bioengineering*, vol. 40, n° 11, p. 1412-1420.
- Jayasooriya S.D., Bhandari B.R., Torley P., D'Arcy B.R., (2004). Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *Int. J. Food. Prop.*, vol.7, n° 2, p. 301-319.
- Jeeji B.N., (1985). Competitive exclusion or morphological transformation? A case study with *Spirulina fusiformis*, *Arch. Hydrobiol., Suppl. 71, Algol. Stud.*, vol. 191, p. 38-39.
- Jemai A.B., Vorobiev E., (2006). Pulsed electric field assisted pressing of sugar beet slices: towards a novel process of cold juice extraction. *Biosystems Engineering*, vol. 93, n°1, p.57-68.
- Jeyamkondan S., Jayas D.S., Holley R.A., (1999). Pulsed electric field processing of foods: a review. *J. Food Protect.*, vol. 62, p. 1088-1096.
- Joannes C., Sipaut C. S., Dayou J., Yasir S. Md., Mansa R. F., (2015) The Potential of Using Pulsed Electric Field (PEF) Technology as the Cell Disruption Method to Extract Lipid from Microalgae for Biodiesel Production. *International Journal of Renewable Energy Research*. Vol.5, n°2, p. 1-24.
- Jourdan J.P., (2011). « Cultivez votre spiruline » manuel de culture artisanale de spiruline. 223 p.

K

- Kent M., Welladsen H.M., Mangott A., Li Y., (2015). Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS ONE*, vol. 10, n°2.
- Kilpatrick K.A., (1985). The development of a method to measure marine cyanobacterial phycoerythrin extracted in solvents, M.S. thesis, Texas A&M University, p 148.
- Kitada K., Machmudah S., Sasaki M., Goto M., Nakashima Y., Kumamoto S., Hasegawa T., (2009). Supercritical CO₂ extraction of pigment components with

- pharmaceutical importance from *chlorella vulgaris*. *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 84, p. 657-661.
- Kjeldahl J., (1883) A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. *Z Anal Chem.*, vol. 22, p.366.
 - Knorr D., Angersbach A., Eshtiaghi M.N., Heinz V., Lee D.U., (2001). Processing concepts based on high intensity electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 12, p. 129-135.
 - Knorr D., Geulen M., Grahl T., Sitzmann W., (1994). Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 5, p.71-75.
 - Knorr D., Toepfl S., Heinz V., (2005). Application of pulsed electric field technology for food industry. *Food Engineering Series*, vol. 20, p. 1-49.
 - Koo S.Y., Cha K.H., Song D.G., Chung D., Pan C.H., (2012). Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *chlorella ellipsoidea*. *J Appl Phyc.*, vol. 24, p. 725-730.
 - Koru E., (2009). *Spirulina* microalgae production and breeding in commercial. *Turk. J. Agric.* May-June 2008, Issue: 11, Year: 3, pp:133-134, Çamdibi-Izmir/Turkey (in Turkish).
 - Koru E., (2012). *Earth Food Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Standarts*. Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/food-additive/earth-food-spirulina-arthrospira-production-and-qualitystandarts>. Ege University Fisheries Faculty, Dept. of Aquaculture Algae Culture Lab. Bornova, Izmir Turkey. *INTECH Open Access Publisher*, vol 11, p. 191-202
 - Koru E., Cirik S., Turan G., (2008). The use of *Spirulina* for fish feed production in Turkey, University-Industry Co-Operation Project (USIGEM), Project principal investigator and consultant by Edis Koru, pp.100, Bornova-İzmir/Turkey (in Turkish).
 - Kotnik T., Pucihar G., Rebersek M., Miklavic D., Mir M.L., (2003). Role of pulse shape in cell membrane electroporation. *BBA-Biomembranes*, vol. 1614, p. 193-200.
 - Kristiansen M., (1993). Pulsed power applications Proceedings of 9th IEEE International Pulsed Power Conference, , pp. 6-10

- Kumar M., Kulshreshtha J., Singh G.P., (2011). Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, p.1128-1135.
- Kumari R.P., Sivakumar J., Thankappan B., Anbarasu K., (2013). C-phycoocyanin modulates selenite-induced cataractogenesis in rats. *Biological Trace Element Research* 2013-01-01. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/papers/23086307>

L

- Lai Y.S., Parameswaran P., Li A., Baez M., Rittmann, B.E., (2014). Effects of pulsed electric field treatment on enhancing lipid recovery from the microalga, *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, vol. 173, p. 457-46.
- Lavoie I., Laurion I., Warren A., Vincent W.F., (2007). Les fleurs d'eau de Cyanobactéries, revue de littérature. INRS rapport no 916, xiii, 124 p.
- Lebovka N.I., Bazhal M.I., Vorobiev E., (2002). Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, vol. 54, n°4, p. 337-346.
- Lee A.K., Lewis D.M., Ashman P.J., (2012). Review disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, vol. 46, p. 89- 101.
- Lee J.Y., Yoo C., Jun S.Y., Ahn C.Y., Oh H.M., (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, vol. 101, p. S75-S77.
- Lee S.H., Kang M.C., Moon S.H., Jeon B.T., Jeon Y.J., (2013). Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. *Algae*, vol. 28, n° 4, p. 371-378.
- Levy C., (2010). Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires. Thèse de Doctorat, Discipline: Biotechnologie, Microbiologie. Ecole Doctorale, "Science des procédés-science des aliments".Université Montpellier II, 191p.
- Li B., Chu X., Gao M., Li W., (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoocyanin. *Acta Biochim Biophys Sin.*, vol. 42, p. 80-9.

- Li D.M., Qi Y.Z., (1997). *Spirulina* industry in China: Present status and future prospects. *J. Appl. Phycol.*, vol. 9, p. 25-28.
- Li S.Q., Zhang Q.H., Tony Z.J., Turek E.J., Lau M.H., (2005). Elimination of *Lactobacillus plantarum* and achievement of shelf stable model salad dressing by pilot scale pulsed electric fields combined with mild heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 6, p. 125-133.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R., (1985). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents. *Biol.Soc. Trans.*, vol. 11, p. 591-592.
- Lindgren M., Aronsson K., Galt S., Ohlsson T., (2002). Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers. *Innov. Food Sci. Emerg.*, vol. 3, p. 233-245.
- Luengo E., Condón-Abanto S., Álvarez I., Raso J., (2014). Effect of pulsed electric field treatments on permeabilization and extraction of pigments from *Chlorella vulgaris*. *The Journal of Membrane Biology*, vol. 247, n° 12, p. 1269-1277.
- Luengo E., Martínez J.M., Bordetas A., Álvarez I., Raso J., (2015). Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 29, 15-22
- Luque-Garcia J.L., De Castro M.L., (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 22, n° 1, p. 41-47.

M

- M'baye B.K., Lô B., Bassene E., (2011). Etude quantitative de quelques pigments de la Spiruline cultivée en Mauritanie en vue d'une valorisation nutritionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 5, n° 5, p. 2035-2038.
- Macias-Sanchez M.D., Mantell C., Rodriguez M., Martínez de laOssa E., Lubián L.M., Montero O., (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, vol. 77, p.948-952.
- Madkour FF, Kamil A, Nasr HS (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egypt. J. Aquat. Res.* Vol. 38, p.51-57

- Maged E.A., Ayman M.H., Eissa A., (2012). Pulsed electric fields for food processing technology (Chapitre11) in structure and function of food engineering. © 2012 Mohamed and Eissa, licensee InTech.
- Mäki-Arvela P., Hachemi I., Murzin D.Y., (2014). Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. Review, *Chem Technol Biotechnol* www.soci.org. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.4461.
- Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K., (2016). Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.*, vol. 109, p. 282-296.
- Markov M.S., (2010). Advanced electroporation techniques in biology and medicine. *CRC Press*, 133 p.
- Martínez J.M., Luengo E., Saldaña G., Álvarez I., Raso J., (2016). C-phycoyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Research International*, Available online 28 September 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.029>
- Mercer P., Armenta R.E., (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 113, p. 539-547.
- Michel T., (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de Doctorat. Ecole doctorale sciences et technologies institut de chimie organique et analytique. Université d'Orléans. [En ligne] 286p.
- Microphit, (2016). Microalgues : Composés bioactifs d'intérêt. Site web <http://www.microphyt.eu/microalgues/composes-bioactifs-dinteret>.
- Minkova K.M., Tchernov A.A., Tchordadjieva M.I., Fournadjieva S.T., Antova R.E., Busheva M.C., (2003). Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, vol. 102, p.55-59.
- Moraes C.C., Luisa Sala G.P. Cerveira S.J.K., (2011). C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 28, n° 01, p. 45-49.
- Mühling M., Belay A., Brian A.W., (2005). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina)* strains. *Journal of Applied Phycology*, vol. 17, p.137-146.

- Murugan T., (2011). Screening for antifungal and antiviral activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmacy Research*, vol. 4 Issue 11, p. 41-61.

N

- Nelissen B., Wilmotte A., Neefs J.M. De Wachter R., (1994). Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *System. Appl. Microbiol.*, vol. 17, p. 206-210.
- Ngadi M.O., Yu L.J., Amiali M., Ortega-Rivas E., (2010). Processing effects on safety and quality of foods. 16. Food quality and safety issues during pulsed electric field processing. Taylor & Francis Group, LLC.

O

- Orcutt D.M., Patterson G.W., (1974). Effect of light intensity upon *Nitzschia clostermium* (*Cylindrotheca fusiformis*). *Lipids*, vol. 9, p. 1000-1003.
- Ou Y., Lin L., Yang X., Pan Q., Cheng X., (2013). Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAy mice. *Pharm Biol*, vol. 51, n° 5, p. 539-44.
- Ou Y., Zheng S., Lin L., Jiang Q., Yang X., (2010). Protective effect of C-phycoyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact.*, vol. 185, p. 94-100.

P

- Palla J.C., Busson F., (1969). Etude des caroténoïdes de *Spirulina Platensis* (Gom.) Geitler (Cyanophycées) C.R. Acad. Sc. Paris, t.269 p.1704-1707.
- Paniagua M.J., Dujardin E., Sironval C., (1993). "Le Tecuitlatl., concentré de spirulines source de protéines comestibles chez les Aztèques", *Cahiers de l'Agriculture*; vol. 2, p. 283-287.
- Parniakov O., Barba F.J., Grimi N., Marchal L., Jubeau S., Lebovka N, Vorobiev E., (2015 a). Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 27, p. 79-85.

- Parniakov O., Barba F.J., Grimi N., Marchal L., Jubeau S., Lebovka N, Vorobiev E., (2015 b). Pulsed electric field and pH assisted selective extraction of intracellular components from microalgae *Nannochloropsis*. *Algal Research*, vol. 8, p. 128-134.
- Patil G., Raghavarao K.S.M.S., (2007). Aqueous two-phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochem Eng J.*, vol. 34, p.156.
- Penton-Rol G., Marin-Prida J., Pardo-Andreu G., Martinez-Sanchez G., Acosta-Medina E.F., Valdivia-Acosta A., Lagumersindez-Denis N., Rodriguez-Jimenez E., Llopiz-Arzuaga A., Lopez-Saura P.A., (2011). C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils, *Brain Res. Bull.*, vol. 86, p. 42-52.
- Petit B., Ritz M. Federighi M., (2002). Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments : les Champs électriques et magnétiques pulsés. *Revue Méd Vét.*, vol. 153, p. 547-556.
- Pétrier C., Gondrexon N. Boldo P., (2008). Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*, AF6310, 1-14.
- Pierlovisi C., (2007). L'homme et la spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques. PhD Thesis, Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris (162).
- Pinta M., (1973). Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. *Oléagineux*, 28e année, no 2
- Plaza M., Avalo B., Cifuentes A Ibanez E, (2008). Pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction of functional ingredients from *Chlorella vulgaris*. Chemical characterization using HPLC-DAD and GC-MS. http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Barcelona/ISASF%202008/PDF/Posters/Natural%20Products/P_NP_10.pdf
- Pothakamury U.R., Vega-Mercado H., Zhang Q., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G., (1996). Effect of growth stage and temperature on inactivation of E.coli by pulsed electric field. *J. Food. Prot.*, vol. 59, n° 11, p. 1167-1171.
- Pottecher F., (2014). Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications. Brevets WO 2014045177 A1.

- Prabakaran P., Ravindran A.D., (2013). Efficacy of different extraction methods of phycocyanin from *Spirulina platensis*. Pharma Research Library. *Int. J. Res. Pharm. Life Sci.*, vol.1, n° 1, p. 15-20.
- Prabuthas P., Majumdar S., Srivastav P.P., Mishra H.N., (2011). Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, vol. 2, n°5, p. 93-96, May 2011. Available online <http://www.academicjournals.org/jsppr>.
- Priyadarshani I., Rath B., (2012). Commercial and industrial applications of microalgae. *J. Algal Biomass Utiln.*, vol. 3, n° 4, p. 89-100.
- Pulz O., Gross W., (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol.65, n°6, p.:635-48.
- Puyfoulhoux G., Rouanet J.M., Besançon P., Baroux B., Baccou J.C., Caporiccio B., (2001). Iron availability from iron-fortified spirulina by an in-vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Agric. Food Chem.*, vol 49, Issue 3, p. 1625-29.

Q

- Qin B.L., Barbosa-Cañovas G.V., Swanson B.G., Pedrow P.D., Olsen R.G., (1998). Inactivating microorganisms using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE T. Ind. Appl.* , vol. 34, p. 43-50.
- Qin S., Timoshkin I.V., Maclean M., Wilson M.P., MacGregor S.J., Given M.J., Anderson J.G., Wang T., (2014). Pulsed electric field treatment of microalgae: Inactivation tendencies and energy consumption *IEEE Transactions on Plasma Sci* 1-6
- Quillet M., (1975). Research on carbohydrate substances produced by *Spirulina*. *Ann. Nutr. Alim.*, vol. 29, p. 553-561.
- Quoc, K.P., Dubacq J.P., (1997). Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the Cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1346, p. 237-246.

R

- Ragan. M.A., (1981). Chemical constituents of seaweeds. Pages 589-626 in C. S. Lobban and M. J. Wynne, eds. *The biology of seaweeds*. Blackwell. Oxford.
- Rastogi N.K., (2003). Application of high-intensity pulsed electrical fields in food processing. *Food Rev. Int.*, vol. 19, p. 229-251.

- Rego D., Redondo L.M., Geraldès V., Costa L., Navalhoa J., Pereira M.T., (2015). Control of predators in industrial scale microalgae cultures with Pulsed Electric Fields. *Bioelectrochemistry*, vol. 103, p. 60-64.
- Rich F., (1931). Notes on *Arthrospira platensis*. *Rev. Algo.*, n°6, p. 11-13.
- Richmond A., (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd.
- Rito-Palomares M., Nunez L., Amador D., (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 76, p.1273-1280.
- Rodríguez-Salgueiro S., Ramírez-Carmenate Z, González-Núñez L., (2017). An update on potential applications of *Spirulina* sp. and C-phycoyanin to treat kidney diseases. *Ann Res Antioxid*, vol. 2, n° 1, p.1-7.
- Rodríguez-Sánchez R., Ortiz-Butron R., Blas-Valdivia V., Hernandez-Garcia A., Cano-Europa E., (2012). Phycobiliproteins or C-phycoyanin of *Arthrospira (Spirulina) maxima* protect against HgCl₂-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chem.*, vol. 135, p. 2359-2365.
- Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V., (2003). C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 4, p. 207-216.
- Roodenburg B., (2011). Pulsed electric field treatment of packaged food. Doctorat thesis. University of Delft
- Ruhlman K.T., Jin Z.T., Zhang Q.H., (2001). Physical properties of liquid foods for pulsed electric fields treatment. In: G. V. Barbosa- Cánovas & Q. W. Zhang, Pulsed Electric Field in Food Processing: Fundamental Aspect and Application. *Technomic Publishing*, p. 45-56)
- Ruiz G., (2005). Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé. Faculté des Sciences et Techniques. Université de Limoges. 256p.
- Russell N.J., (2002). Bacterial membranes: the effect of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 79, p. 27-34.

S

- Sale A.J.H., Hamilton W.A., (1967). Effect of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 148, p. 781-788.
- Sarada R., Pillai M.G., Ravishankar G.A., (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp.: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, vol.34, n° 8, p. 795.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M., (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, p. 215S-217S.
- Scheldeman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Muhling M., Brian A.W., Belay A., Wilmotte A., (1999). *Arthrospira* (*Spirulina*) strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 172, iss. 2, p. 213-222.
- Seo Y. C., Choi W.S., Park J.H., Park J.O., Jung K-H., Lee H.Y., (2013). Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. *Int. J. Mol. Sci*, vol. 14, p.1778-1787.
- Sguera S., (2008). *Spirulina platensis* et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré - Nancy 1 Faculte De Pharmacie. 162 p.
- Shabana K.A., Arabi M.S., (2012). *Spirulina* - an overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 4, Issue 3, ISSN- 0975-1491
- Shalaby E.A., Shanab S.M.M., (2013). Antiradical and antioxidant activities of different *Spirulina platensis* extracts against DPPH and ABTS radical assays. *J Mar Biol Oceanogr.*, vol. 2, n°1, p. 1-8.
- Shalaby E.A., Shanab S.M.M., Singh V., (2010). Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *Spirulina platensis*. *J Med Plants Res*, vol. 4, n° 24, p. 2622-2632.
- Shang Y.F., Kim S.M., Lee W.J. Um B.H., (2011). Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (kjellman) setchell. *J Biosci Bioeng.*, vol. 111, p. 237-241.

- Sheng J., Raveender V., Rittmann B.E., (2011). Evaluation of cell-disruption effects of pulsed-electric-field treatment of *Synechocystis* PCC 6803. *Environ. Sci. Technol.*, vol 45, n° 8, p. 3795-3802. dx.doi.org/10.1021/es103339x.
- Shih C.M., Cheng S.N., Wong C.S., Kuo Y.L., Chou T.C., (2009). Anti inflammatory and anti hyperalgesic activity of C-phycoyanin, *Anesth. Analg.*, vol. 108, p. 1303-1310.
- Siegelman H.W., Kycia J.H., (1978). Algal biliproteins. In: Hellebust JA, Craigie JS, editors. Handbook of phycological methods. Cambridge: Cambridge University Press, 72–8. (ISBN-13: 9780521218559 | ISBN-10: 0521218551). 528 p.
- Silva L.A., Kuhn K.R., Moraes C.C., Burkert C.A.V., Kalil S.J., (2009). Experimental design as a tool for optimization of C-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. *J Braz Chem Soc.*, vol. 20, p. 5-12.
- Simopoulos A.P., (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.*; vol. 233, p. 674-688.
- Singh R., Kumar A., (2011). Pulsed electric fields, processing and application in food industry, *Eur. J. Food Res. Rev.*, vol. 1, n° 2, p. 71-93.
- Singleton V.L.; Rossi J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, p. 144-158.
- Soni B., Trivedi U., Madamwar D., (2008). A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycoyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Bioresource Technology*, vol.99, n° 1, p. 188.
- Sorto M., Gonnet J., (2007). Pilot project for the development of the Dihé food chain in Chad (GCP/CHD/029/EC).INRAN, Rome 29th November.
- Stanier R.Y., Van Niel C.B., (1962). The concept of a bacterium. *Arch Mikrobiol.*, vol. 42, p.17-35.
- Steward D.E., Farmer F.H., (1984). Extraction, identification, and quantitation of phycobiliprotein pigments in phototrophic plankton. *Limnol Oceanogr.*, vol. 29, p.392-397. doi: 10.4319/lo..29.2.0392.
- Strasky Z., Zemankova L., Nemeckova I., Rathouska J., Wong R.J., Muchova L., Subhanova I., Vanikova J., Vanova K., Vitek L., (2013). *Spirulina platensis* and

phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis, *Food Funct.*, vol. 4, p. 1586-1594.

- Szalontai B., Gombos Z., Csizmadia V., Bagyinka C., Lutz M., (1994). Structure and interactions of phycocyanobilin chromophores in phycocyanin and allophycocyanin from an analysis of their resonance Raman spectra, *Biochemistry*, vol. 33, n° 39, p. 11823–11832.

T

- Tandeau de Marsac N., (1983). Phycobilisom as and complamantary chromatic adaptation in cyanobacteria. *Bull. Inst. Pasteur*, vol. 81, p. 201-254.
- Tatsuzawa H., Takizawa E., Wada M., Yamamoto Y., (1996). Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas sp.* *J Phycol.*, vol. 32, p. 598-601.
- Thomas J.C., (1989). L'antenne collectrice d'énergie lumineuse à phycobiliprotéines chez les Cyanobactéries, *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, vol. 136, n°1, p. 31-49, DOI: 10.1080/01811789.1989.10826916
- Thomazeau S., (2006). Diversité phylogénétique et toxinique des Cyanobactéries du Sénégal et du Burkina Faso. Mémoire de Master, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, 44 p.
- Toepfl S., Heinz V., Knorr D., (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chem. Eng. Process*, vol. 46, p. 537-546.
- Tokus,Oglu Ö., Ünal M.K., (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of food science*, vol. 68, n° 4, p.1144-1148.
- Tomaselli L., (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy. In: *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology* (Vonshak, A., Ed.), pp. 1-15. Taylor and Francis, London, UK.
- Tomaselli L., Giovannetti L., Sacchi A. Bocci F., (1988). Effects of temperature on growth and biochemical composition in *Spirulina platensi* sstrain M2. In: *Algal Biotechnology*, T. Stadler, J.Mellion, M.C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan and D. Christiaen (eds), Elsevier Applied Science, London. pp. 303-314.
- Tomaselli L., Giovannetti L., Torzillo G., (1993). Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: *Spirulina Algae of Life*, F. Doumenge, H. Durand-Chastel and A.

Toulemont (eds), *Bulletin de l'Institut océanographique*, Spécial. 12, Monaco. pp. 65-75.

- Tornabene T.G., Bourne T.F., Raziuddin S. Bem-Amotz A., (1985). Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales). *Marine Ecology, Progress Series*, vol. 22, p. 121-125.
- Touya G., (2005). Contribution à l'étude expérimentale des décharges électriques dans l'eau et des ondes de pression associées Réalisation d'un prototype industriel 100kJ pour le traitement de déchets par puissances électriques pulsées. These de Doctorat, version 1 - 9 Dec 2005, 198 p.
- Turk M., (2010). Vers une amélioration du procédé industriel d'extraction des fractions solubles de pomme à l'aide de technologies électriques. Thèse de Doctorat. Spécialité : Génie des procédés industriels. Université de Campiègne UTC. 142p

V

- Valderrama J.O., Perrut M., Majewski W., (2003). Extraction of astaxantine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data*, vol. 48, p. 827-830
- Van Soest, P. J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Official Agron. Chem.*, vol.46, p. 829-835.
- Van Wagenen J., Miller T.W., Hobbs S., Hook P., Crowe B., Huesemann M., (2012). Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, vol. 5, p. 731-740.
- Vilkhuk K., Mawson R., Simons L., Bates D., (2006). Food innovation: emerging science, technologies & application (FIESTA), 3rd Innovative Foods Centre Conference held at Melbourne, Australia on 16–17 October, 2006.
- Vo T-S., Ngo D-H., Kim S-K., (2015). Nutritional and pharmaceutical properties of microalgal spirulina. Chapter 19. Handbook of Marine Microalgae. *Biothechnology advanced*. 585 p Copyright © 2015 Elsevier Inc.
- Vonshak A., (2002). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. Copyright © Taylor & Francis Ltd. 252p.
- Vorobiev E., Lebovka N.I., (2008). Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: fundamental aspects and perspectives of applications. In: Vorobiev, E.,

Lebovka, N.I. (Eds.), *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*, Springer Publishing Inc, New York, USA, p.39-82.

W

- Walter A., Cesar de Carvalho J., Vanete T.S., Ana B.B. de Faria, Ghiggi V., Soccol C.R., (2011). Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol.54, n°4, p. 675-682.
- Wang L., Weller C.L., (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 17, n°6, p. 300-312.
- Wang M., Yuan W., Jiang X., Jing Y., Wang Z., (2014) Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound, *Bioresource Technology*, vol. 153, p. 315-321.
- Wilmotte A., (2010). Diversifier ses pigments : la stratégie gagnante des Cyanobactéries. Sciences envies 22/28 mars 2010.

X

- Xiang Y.B., (2008). Effects of pulsed electric fields on structural modification and rheological properties for selected food proteins. Thèse de Doctorat. 205 p. Department of Bioresource Engineering Macdonald Campus, McGill University CANADA.
- Xu X., Beardall J., Hallam D.N., (1998). Modification of fatty acid composition in halophilic antractic microalgae. *Phytochemistry*, vol.49, p. 1249-1252.
- Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs A., (2002). Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*; vol. 77, p. 9-13.

Y

- Yang R.J., Li S.Q., Zhang Q.H., (2004). Effects of pulsed electric fields on the activity of enzymes in aqueous solution. *J. Food Sci.*, vol. 69, p.241-248.
- Yun O, Zeng X.A, Brennan CS, Han Z., (2016), Effect of pulsed electric field on membrane lipids and oxidative injury of *Salmonella typhimurium*. *Int J Mol Sci.*, vol. 22; n°8, p.17.

Z

- Zarrouk C., (1966). Contribution à l'étude d'une Cyanophyce. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* (Setchell et Gardner) Geitler. Thèse de Doctorat, University of Paris, Paris, France, p. 455.
- Zbinden M.D.A, Strum B.S.M, Nord R.D., Carey W.J., Moore D., Shinogle H., Stagg-Williams S.M., (2013). Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 110, p. 1605-1615.
- Zhang Q., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G., (1995). Engineering aspects pulsed electric field pasteurization. *J. Food Eng.*, vol. 25, p. 261-281.
- Zhao G., Chen X., Wang L., Zhou S., Feng H., Chen W.N. et Lau R., (2013). Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation, *Bioresource Technology*, vol. 128, p. 337-344.
- Zhou H.N., Xie Y.G., Wang Z.P., Shao B., Liu X.Y., Yu J.X. et Chen Z.Y., (2013). Evaluation of *Arthrospira (spirulina) platensis* production trait using C-PC hid operon. *Pak. J. Bot.*, vol. 45, n°2, p. 687-694.
- Zimmermann U., (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 105, p. 176-257.

Annexe 1

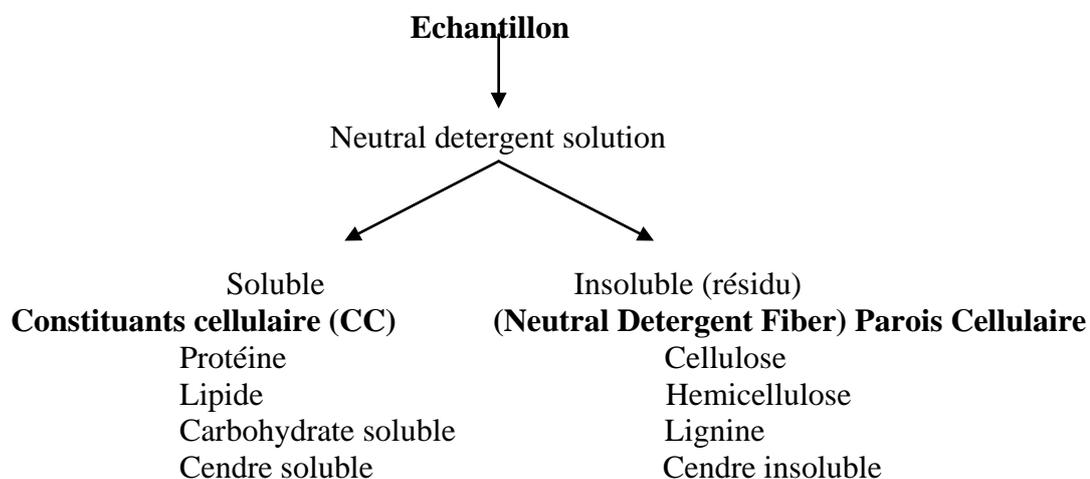
Composition des milieux de culture Hiri et Zarrouk.

| Component (g/L) | Hiri medium | Zarrouk's medium |
|--|-------------|------------------|
| NaHCO ₃ | 16 | 16,8 |
| NaCl | 1 | 1 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 0,1 | – |
| NaNO ₃ | – | 2,5 |
| CaCl ₂ /2H ₂ O | 0,1 | 0,02 |
| EDTA | – | 0,08 |
| FeSO ₄ /7H ₂ O | 0,01 | 0,01 |
| MgSO ₄ /7H ₂ O | 0,1 | 0,2 |
| K ₂ SO ₄ | 0,5 | 1 |
| K ₂ HPO ₄ | – | 0,5 |
| Urée azotée CO(NH ₂) ₂ | 0,1 | – |
| Micronutrient* | – | 1 ml |

*Micronutrient solution: H₃BO₃, 2.86; MnCl₂/4H₂O, 1.81; ZnSO₄/4H₂O, 0.222; Na₂MoO₄, 0.0177; CuSO₄/5H₂O, 0.079 (g/L). (Madkour et al., 2012)

Annexe 2

Procédure de Van – Soest (1963)



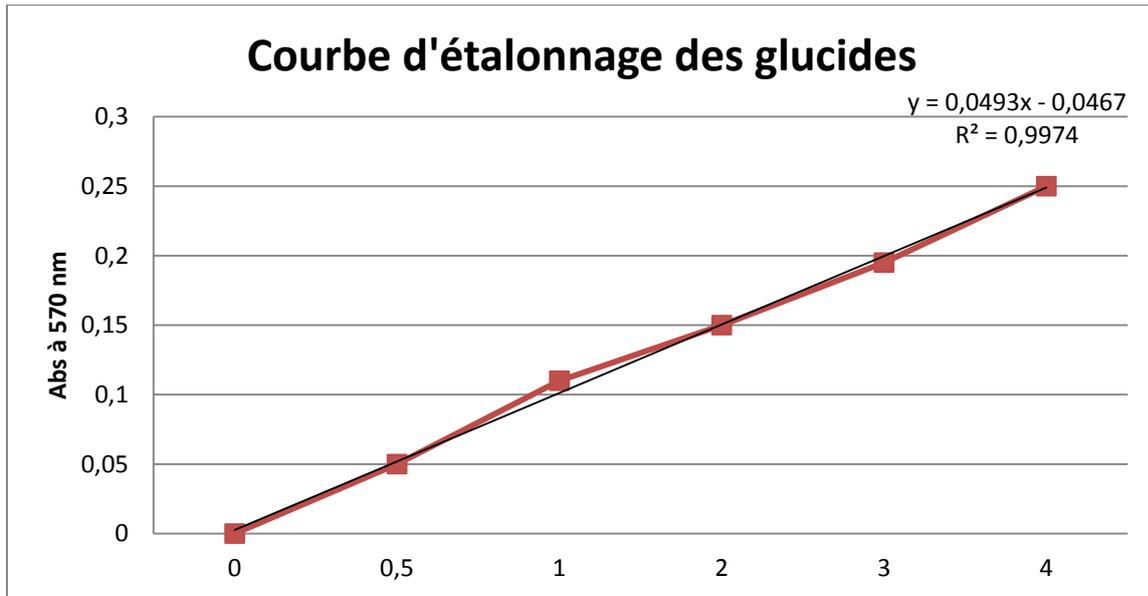
$$\text{NDF \%} = (\text{Poids du résidu} / \text{poids de la matière sèche}) \times 100$$

Composition du détergeant NDS (Neutral detergent solution):

30.0 g Sodium lauryl sulfate; 18.61 g Ethylene diamine tetraacetic Disodium Salt, Dihydrate (EDTA); 6.81 g Sodium tetraborate decahydrate; 4.56 g Sodium phosphate dibasic, anhydrous; et 10.0 ml triethylene glycol, le tout dans 1 L H₂O distillée. Agitation et chauffage pour faciliter la solubilisation des constituants. Ajuster le pH à 6.9 to 7.1.

Annexe 3

Droite d'étalonnage A570 nm = f (masse de glucose)



Annexe 4:

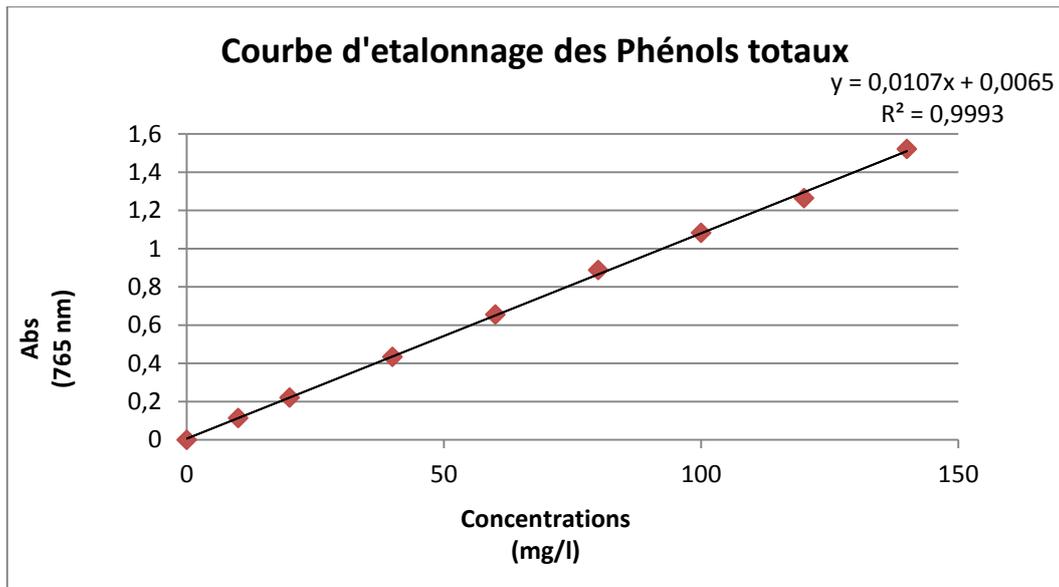
Conditions opératoires de l'analyse du profil en AG par CPG

| Conditions Opératoires pour les esters méthyliques | |
|---|-------------------------|
| Chromatographe | Chrompack CP 9002 |
| Détecteur | FID (250 °C) |
| Injecteur | SPLIT 1/100 (250C°) |
| Gaz vecteur | Azote 1ml/mn |
| Colonne Capillaire | DB23(50% Cyanopropyl) |
| Longueur | 30 m |
| Diamètre intérieur | 0,32 mm *0.25 UM |
| Epaisseur | 0,25 µm du film |
| Températures | |
| Injecteur | 250°C |
| Détecteur | 250°C |
| Four | 200 C° |
| Quantité injectée | 01 U1 |
| Vitesse du papier(Intégrateur) | 0.5 cm/ mn |

Annexe 5

Courbe d'étalonnage des phénols totaux

Droite d'étalonnage A765 nm = f (masse de l'acide gallique)



Annexe 6

Analyse de la variance pour PhP

| <i>Source</i> | <i>Somme des carrés</i> | <i>DDL</i> | <i>Moyenne quadratique</i> | <i>Rapport F</i> | <i>Proba.</i> |
|------------------|-------------------------|------------|----------------------------|------------------|---------------|
| A: Intensité CEP | 0,006983 | 1 | 0,006983 | 136,93 | 0,0000* |
| B: Température | 0,00024792 | 1 | 0,00024792 | 4,86 | 0,0497* |
| C: Temps | 0,000223144 | 1 | 0,000223144 | 4,38 | 0,0605 |
| AB | 0,000500386 | 1 | 0,000500386 | 9,81 | 0,0095* |
| AC | 0,000464387 | 1 | 0,000464387 | 9,11 | 0,0117* |
| BC | 0,000286488 | 1 | 0,000286488 | 5,62 | 0,0371* |
| ABC | 0,0000499892 | 1 | 0,0000499892 | 0,98 | 0,3434 |
| blocs | 0,0000821881 | 1 | 0,0000821881 | 1,61 | 0,2305 |
| Erreur totale | 0,000560978 | 11 | 0,000050998 | | |
| Total (corr.) | 0,00939848 | 19 | | | |

Un astérisque est placé à coté des valeurs qui répondent à des tests significatifs

Annexe 7

Analyse de la variance pour Pureté

| <i>Source</i> | <i>Somme des carrés</i> | <i>DDL</i> | <i>Moyenne quadratique</i> | <i>Rapport F</i> | <i>Proba.</i> |
|------------------|-------------------------|------------|----------------------------|------------------|---------------|
| A: Intensité CEP | 0,0131103 | 1 | 0,0131103 | 4,03 | 0,0698 |
| B: Température | 0,224676 | 1 | 0,224676 | 69,12 | 0,0000* |
| C: Temps | 0,002025 | 1 | 0,002025 | 0,62 | 0,4466 |
| AB | 0,021025 | 1 | 0,021025 | 6,47 | 0,0273* |
| AC | 0,009216 | 1 | 0,009216 | 2,84 | 0,1204 |
| BC | 0,0238702 | 1 | 0,0238702 | 7,34 | 0,0203* |
| ABC | 0,00416025 | 1 | 0,00416025 | 1,28 | 0,2820 |
| blocs | 0,0006728 | 1 | 0,0006728 | 0,21 | 0,6580 |
| Erreur totale | 0,0357573 | 11 | 0,00325066 | | |
| Total (corr.) | 0,334513 | 19 | | | |

Un astérisque est placé à coté des valeurs qui répondent à des tests significatifs

Annexe 8

Analyse de la variance ANOVA et Coefficients pour déterminer l'influence des différents paramètres sur l'extraction des PhP à partir de Spirulina.

| <i>Source</i> | <i>DDI</i> | <i>coefficients</i> | <i>F-Ratio</i> | <i>P value.</i> |
|------------------|------------|---------------------|----------------|-----------------|
| Coefficients | | +0,1166 | | |
| A: Intensité CEP | 1 | +0,0209 | 137,15 | 0,0000* |
| B: température | 1 | -0,0039 | 4,87 | 0,0476* |
| C: temps | 1 | +0,0037 | 4,38 | 0,0582 |
| AB | 1 | +0,0056 | 9,83 | 0,0086* |
| AC | 1 | +0,0054 | 9,12 | 0,0107* |
| BC | 1 | -0,0042 | 5,63 | 0,0353* |
| Blocs | 1 | | 1,61 | 0,2280 |
| Erreur totale | 12 | | | |
| Total (corr.) | 19 | | | |
| R^2 | | 93,50 | | |
| R^2 -adj | | 89,71 | | |
| SEE | | 0,0071 | | |
| MAE | | 0,0044 | | |

SEE : Erreur type d'estimation, MAE : erreur absolue moyenne

Annexe 9

Analyse de la variance ANOVA et Coefficients pour déterminer l'influence des différents paramètres sur la pureté de la CPC de Spirulina

| <i>Source</i> | <i>DDI</i> | <i>coefficient</i> | <i>F-Ratio</i> | <i>P value.</i> |
|------------------|------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Coefficients | | +0,583 | | |
| A: Intensité CEP | 1 | +0,029 | 3,94 | 0,0705 |
| B:temperature | 1 | -0,118 | 67,54 | 0,0000* |
| C:time | 1 | +0,011 | 0,61 | 0,4504 |
| AB | 1 | -0,036 | 6,32 | 0,0272* |
| AC | 1 | +0,024 | 2,77 | 0,1219 |
| BC | 1 | -0,039 | 7,18 | 0,0201* |
| Blocs | 1 | | 0,20 | 0,6609 |
| Erreur totale | 12 | | | |
| Total (corr.) | 19 | | | |
| R^2 | | 88,067 | | |
| R^2 -adj | | 81,106 | | |
| SEE | | 0,057 | | |
| MAE | | 0,029 | | |

SEE : Erreur type d'estimation, MAE : erreur absolue moyenne

Annexe 10

Test de Fisher (Analyse de la variance)

Analyse de variance pour PbP

| <i>Source</i> | <i>Somme des carrés</i> | <i>Ddl</i> | <i>Carré moyen</i> | <i>F</i> | <i>Probabilité</i> |
|---------------|-------------------------|------------|--------------------|----------|--------------------|
| Modèle | 0,00745407 | 3 | 0,00248469 | 20,45 | 0,0000 |
| Résidu | 0,00194442 | 16 | 0,000121526 | | |
| Total (Corr.) | 0,00939848 | 19 | | | |

Analyse de variance pour la pureté

| <i>Source</i> | <i>Somme des carrés</i> | <i>Ddl</i> | <i>Carré moyen</i> | <i>F</i> | <i>Probabilité</i> |
|---------------|-------------------------|------------|--------------------|----------|--------------------|
| Modèle | 0,239811 | 3 | 0,0799371 | 13,51 | 0,0001 |
| Résidu | 0,0947016 | 16 | 0,00591885 | | |
| Total (Corr.) | 0,334513 | 19 | | | |