



République Algérienne Démocratique Et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach - Alger

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر

DÉPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Option : Alimentation et Nutrition

Thème

Extraction et caractérisation des pigments de la spiruline par des méthodes physiques, enzymatique et par solvant supramoléculaire.

Présenté par : Melle BERROUANE Nour El Houda

Devant le jury composé de :

Président :	M. HAZZIT M.	Professeur (E.N.S.A. El Harrach)
Directeur de thèse :	M. BENCHABANE A.	Professeur (E.N.S.A. El Harrach)
Co- directeur :	M. AMIALI M.	Professeur (E.N.S.A. El Harrach).
Examineurs :	M. AIT- OUAZZOU A.	Maître de conférences A (Univ. Alger 1)
	M. AOUCHE A.	Professeur (E.S.S.A.I.A)
	Mme. YAHIAOUI K.	Professeur (U.M.B.B)

Soutenue publiquement le : 06 /07 / 2022

REMERCIEMENTS

الحمد لله الذي بعزته وجلاله تتم الصالحات

J'adresse mes sincères remerciements à :

Monsieur le Professeur **BENCHABANE Ahmed**, d'avoir accepté d'encadrer cette thèse.
Consciente de vos nombreuses responsabilités ; je vous remercie pour le temps que vous lui
avez consacré.

Monsieur le Professeur **AMIALI Malek**, d'avoir accepté de co-diriger cette thèse, en y
consacrant le temps et les moyens nécessaires pour sa réalisation.

Monsieur le Professeur **HAZZIT Mohamed**, d'avoir accepté de présider mon jury. Soyez
assuré de mon entière reconnaissance et de mon profond respect.

Madame et Messieurs les examinateurs pour m'avoir honoré en acceptant d'évaluer et de juger
mes travaux de recherches, soyez assurés de toute mon estime et mon profond respect :

Madame **YAHIAOUI Karima**, Professeure à l'Université M'hamed BOUGARA.
Monsieur **AOUICHE Adel**, Professeur à l'Ecole Supérieure des Sciences des Aliments et des
Industries Agroalimentaires.

Monsieur **AIT- OUAZZOU Abdenour**, Maître de conférences à l'Université Alger 1.

Professeure Soledad **RUBIO** et Dr **Ana BALLESTEROS-GOMEZ** de l'Université de
Córdoba, Espagne, pour leur accueil, leur temps et leurs conseils lors de mon stage au sein du
département de chimie analytique.

Docteur **Tanya GACHOVSKA** pour son temps, ses précieux conseils et son inestimable
contribution à la rédaction de l'article.

L'ensemble des enseignants et du personnel du Département de Technologie alimentaire.

Tous ceux qui m'ont soutenu, aidé et encouragé.

DEDICACES

À...

La mémoire de mon Père

Ma chère maman qui a tant fait pour ses enfants. Sois sûre de mon amour, mon respect et ma gratitude pour toi, Que dieu te garde pour nous.

Ma sœur Wassila et son mari Mohamed,

Mes frères Mohamed, Charif et Abdou ;

Ma tante Malika ;

Mes belles sœurs Farah et Kahina ;

Mon amie, Mme ATTAL Fella - Sara ;

Mes nièces et neveux : Melina, Syrène, Hana, Yacine, Zakaria, Abderrahmane, Wael, et Samy.

Tous ceux qui ont crû en moi, qui étaient présents dans les bons et les mauvais moments, qui m'ont apporté conseils et recommandations. Je vous suis reconnaissante de votre soutien et de vos encouragements tout au long de ce travail.

Nour El Houda

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et nomenclature

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction Générale 1

PARTIE 01: Synthèse bibliographique

Chapitre I : Monographie de la spiruline

I.1 Historique 5

I.2 Composés Bioactifs de la spiruline 5

I.2.1 Acides gras essentiels 5

I.2.2 Carbohydrates 5

I.2.3 Vitamines et minéraux 6

I.2.4 Protéines..... 6

I.2.5 Phycobiliprotéines..... 7

I.2.5.1 Structure des phycobiliprotéines 7

I.2.5.2 Purification des phycobiliprotéines..... 8

I.2.5.3 Application biomédicale, biotechnologique et nutraceutique des
phycobiliprotéines 9

I.2.5.4 Extraction et caractérisation de la C- phycocyanine..... 11

I.2.5.5 Structure de la C- phycocyanine 12

I.2.5.6 Paramètres physico-chimiques de l'extraction de la C- phycocyanine 13

a. Température 13

b. Type de solvant et son pH..... 13

c. Rapport biomasse / solvant 14

d. Forme de la biomasse algale 15

I.2.5.7 Effets thérapeutiques de la C-phycocyanine..... 15

I.2.6 Caroténoïdes 15

I.2.6.1 Les caroténoïdes de la spiruline 15

I.2.6.2 Structure et classification des caroténoïdes 16

I.2.6.3 Biosynthèse des caroténoïdes 17

I.2.6.4 Importance des caroténoïdes pour la santé humaine..... 17

I.2.6.5 Caroténoïdes comme antioxydants	18
I.2.6.6 Types de caroténoïdes	19
a. L'astaxanthine	19
b. Le β -carotène.....	19
c. La lutéine et la zéaxanthine.....	19
d. La canthaxanthine	20
e. La fucoxanthine.....	20
I.2.6.7 Purification des caroténoïdes	20
I.2.6.8 Stabilité au stockage	21
I.2.6.9 Marché et économie des caroténoïdes	21
I.2.6.10 Avantages et inconvénients des microalgues comme source de caroténoïdes....	22
I.2.6.11 Défis actuels et perspectives d'avenir	23
I.2.7 Composés phénoliques totaux.....	24
I.2.7.1 Classification des polyphénols.....	25
a. Acides phénoliques	25
b. Acides hydroxycinnamiques	26
c. Acides hydroxybenzoïques	26
d. Flavonoïdes	27
I.2.7.2 Rôle des composés phénoliques totaux.....	28
I.2.7.3 Activité antioxydante des polyphénols	28
I.2.7.4 Mode d'action des polyphénols	29
I.2.7.5 Présence et rôle dans les microalgues	29

Chapitre II : Les méthodes d'extraction des composés bioactifs de la spiruline

II.1 Introduction	30
II. 2 Définition de l'extraction verte	30
II. 3 Principes de l'extraction verte.....	31
II. 4 Classification des méthodes d'extraction des composés bioactifs de la spiruline	31
II. 4.1 Extraction humide.....	32
II. 4.2 Extraction conventionnelle par solvant	32
II. 4.3 Extraction par fluide supercritique	33
II. 4.4 Extraction assistée par le plasma froid	33
II. 4.5 Extraction assistée par la congélation /décongélation	34
II. 4.5.1 Principe	34
II. 4.6 Extraction assistée par les enzymes (EAE)	34
II. 4.6.1 Principe.....	35

II. 4.6.2 Avantages de l'extraction assistée par les enzymes	35
II. 4.7 Fraisage/ Broyage aux billes.....	35
II. 4.7.1 Définition et Principe.....	35
II. 4.8 Extraction assistée par les ultrasons (EAU)	36
II. 4.8.1 Mécanisme d'action des ultrasons.....	36
II. 4.8.2 Avantages de l'extraction assistée par ultrasons	37
II. 4.9 Extraction assistée par le champs électrique pulsé (CEP).....	37
II. 4.9.1 Définition du champ électrique pulsé	38
II. 4.9.2 Mode d'action du champ électrique pulsé.....	38
II. 4.9.3 Utilisation du champ électrique pulsé	40
II. 4.9.4 Avantages de l'utilisation du champ électrique pulsé.....	41
II. 4.9.5 Utilisation du champ électrique pulsé sur les microalgues.....	41
II. 4.9.6 Rentabilité.....	41
II. 4.10 Extraction par le solvant supramoléculaire des composés bioactifs.....	42
II. 4.10.1 Synthèse du solvant supramoléculaire.....	42
II. 4.10.2 Définition du phénomène de coacervation	42
II. 4.10.3 Avantages de l'utilisation des solvants SUPRAS	43

PARTIE 02: Etude expérimentale

Chapitre III : Extraction de la C-phycoyanine à partir de la biomasse sèche de la spiruline.

III.1 Introduction.....	44
III.2 Matériel et Méthodes.....	45
III.2.1 Biomasse algale.....	45
III.2.2 Préparation des échantillons.....	45
III.2.3 Extraction assistée par la congélation/ décongélation (C/D).....	46
III.2.4 Extraction assistée par les enzymes (EAE).....	46
III.2.5 Extraction assistée par les ultrasons (EAU)	46
III.2.6 Extraction assistée par champ électrique pulsé (EACEP).....	46
III.2.7 Extraction de la C-PC.....	48
III.2.7.1 Purification de la C- phycoyanine	48
a. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	48
b. Dialyse	49
III.2.7.2 Absorption spectrale.....	49
III.2.7.3 Analyse statistique.....	49
III.3 Résultats et Discussion	50
III.3.1 Extraction assistée par la congélation/ décongélation.....	50

III.3.2 Extraction Assistée par les enzymes	51
III.3.3 Extraction assistée par ultrasons (EAU).....	52
III.3.4 Extraction assistée par champ électrique pulsé	55
III.4 Conclusion	57
Chapitre IV: Extraction, Caractérisation et Identification des caroténoïdes et des polyphénols de la spiruline	
IV.1 Introduction.....	58
IV.2 Matériel et Méthodes	60
IV.2.1 Synthèse du solvant supramoléculaire à base d'acide octanoïque (SUPRAS).....	60
IV.2.2 Extraction par solvant SUPRAS des antioxydants.....	61
IV.2.2.1 Détermination de la teneur en caroténoïdes totales et chlorophylles dans l'extrait supramoléculaire	61
IV.2.3 Extraction éthanolique et méthanolique des antioxydants	62
IV.2.4 Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT)	62
IV.2.5 Activité antioxydante des extraits	63
IV.2.5.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•	63
IV.2.5.2 Mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS ou 2.2- Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	64
IV.2.6 L'analyse chromatographique de l'extrait SUPRAS.....	64
IV.2.6.1 Le système LC MS / MS pour l'identification des caroténoïdes.....	65
IV.2.6.2 Saponification des caroténoïdes du solvant supramoléculaire.....	66
IV.2.6.3 Préparation des courbes d'étalonnage des caroténoïdes	66
IV.2.6.4 Le système LC MS/ MS pour l'identification des polyphénols	67
IV.2.6.5 Collecte des données et interprétation des résultats.....	67
IV.2.7 Analyses statistiques	67
IV.3 Résultats et Discussion	68
IV.3.1 Propriétés analytiques et chimiques du SUPRAS synthétisé.....	68
IV.3.2 Détermination de la teneur en caroténoïdes totaux et chlorophylles dans l'extrait supramoléculaire	70
IV.3.3 Détermination de la teneur en les composés phénoliques totaux (CPT).....	72
IV.3.4 Evaluation de l'activité antioxydante	73
IV.3.4.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	74
IV.3.4.2 Mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS ou 2.2- Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	76
IV.3.5 Résultats statistiques	78
IV.3.5.1 Corrélation entre les teneurs en CPT et l'activité biologique DPPH.....	78
IV.3.5.2 Corrélation entre les teneurs en CPT et l'activité biologique ABTS.....	78
IV.3.5.3 Corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et l'activité antioxydante DPPH .	78

IV.3.5.4	Corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et l'activité antioxydante ABTS	78
IV.3.6	Identification des principaux caroténoïdes	78
IV.3.7	Identification des composés phénoliques majeurs	80
IV.4	Conclusion	82
	Conclusion générale et perspectives	83
	Références bibliographiques	86

Liste des tableaux

Tableau I. 1: Composition en protéines de la spiruline	6
Tableau I. 2: Les principaux acides hydroxycinnamiques,	26
Tableau I. 3: Les principaux acides hydroxybenzoïques	27
Tableau III. 1: Paramètres du prétraitement CEP en continu.	48
Tableau III. 2: Résultats de l'extraction assistée par congélation / décongélation	50
Tableau III. 3: Résultats de l'extraction assistée par les enzymes	52
Tableau III. 4: Résultats de l'extraction assistée par CEP	55
Tableau IV. 1: Teneur en caroténoïdes et chlorophylles de l'extrait SUPRAS	70
Tableau IV. 2: Teneur en composés phénoliques totaux des extraits de spiruline	72
Tableau IV. 3: Pourcentage d'inhibition (%) du radical DPPH	74
Tableau IV. 4: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS	76
Tableau IV. 5: Identification des caroténoïdes analysés par LC- APCI MS/MS dans l'extrait supramoléculaire de la spiruline.....	80
Tableau IV. 6: Identification des composés phénoliques analysés par LC- MS/MS dans l'extrait supramoléculaire de la spiruline.....	81

Liste des figures

Figure I. 1: Structure du phycobilisome.....	8
Figure I. 2: Les applications des phycobiliprotéines.....	11
Figure I. 3: Structure de la C-phycoyanine	12
Figure I. 4: Structure chimique des caroténoïdes des microalgues.	16
Figure I. 5: Classification et activités biologiques des polyphénols	25
Figure I. 6: Schéma général du piégeage des radicaux par les composés phénoliques.	28
Figure III 1: Système du champ électrique pulsé.....	47
Figure III 2: Résultats de l'extraction assistée par ultrasons	53
Figure IV. 1: Diagramme du protocole expérimental.....	60
Figure IV. 2: Elaboration du solvant supramoléculaire	61
Figure IV. 3: Instrument LC-MS pour l'identification des antioxydants (à gauche) et la conception du spectromètre de masse triple quadripôle 6420 (à droite)	65
Figure IV. 4: Description générale de la synthèse du solvant supramoléculaire.....	68
Figure IV. 5: Chromatogramme des caroténoïdes par analyse LC- APCI- MS/MS	79
Figure IV. 6: Chromatogramme des polyphénols par analyse LC-ESI-MS/MS	81

Liste des abréviations et nomenclature

AG : Acide Gallique

ANOVA : Analyse de la variance

APC : Allophycocyanine

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

BHA : Butyl-Hydroxyl-Anisol

BHT : Butyl -Hydroxyl -Toluène

C : capacitance

CAT : Catalase

C/D : Congélation / Décongélation

CEP : Champ électrique pulsé

Chl : Chlorophylle

CI₅₀ : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux

CoA: Co- enzyme A

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPPH : 2,2-diphenyl -1-ptycrylhydrazyl

EAE : Extraction assistée par les enzymes

EAG : Equivalent acide gallique

EAU : Extraction assistée par les ultrasons

EE : Extrait éthanolique

EDTA : L'acide éthylènediaminetétraacétique

ELISA : Dosage d'immuno - absorption par enzyme liée

EM : Extrait méthanolique

ESI: ionisation par électrospray

EOA : Espèce oxygénée actives

Eq : équivalent

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

ERN : Espèce Réactive de l'Azote

Fd : facteur de dilution

HPH : Homogénéisation Haute Pression

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

I % : Pourcentage d'inhibition

IUPAC : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

kHz : Kilo hertz

LC- MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse

M : Mole

MS : Matière sèche

ms : millisiemens

N : Normal

n : nombre de pulsation

nF : nano farad

nm : nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

Q : débit

PBPs : Phycobiliprotéines

PE : phycoérythrine

PFP : Pentafluorophenyl

psi : Livre par pouce carré

pH : Potentiel hydrogène

p/v: poids / volume

ROO· : Radical libre peroxyde

ROOH : Hydroperoxyde

SD : Ecart type

SFE : Extraction au fluide supercritique

SOD : Superoxyde dismutase

TR : Temps de rétention

tr : tours

TEAC : La capacité antioxydante en équivalent *Trolox*

US : Ultrason

UV : Ultraviolet

US\$: Dollar Américain

V : volt

VIS : Visible

ω-3: oméga-3

ω-6: oméga-6

Résumé

La spiruline est une cyanobactérie aux multiples activités biologiques. Cette caractéristique est principalement due aux composés bioactifs qu'elle renferme, parmi ces composés, la C- phycocyanine (C-PC), les composés phénoliques totaux (CPT) et les caroténoïdes sont une source potentielle d'antioxydants naturels. Afin de tirer profits des bienfaits de la spiruline, on a procédé en premier lieu à l'extraction de la C-PC en mettant en comparaison 04 techniques de prétraitement pour la perturbation de la membrane cellulaire afin d'obtenir les rendements et les puretés les plus élevés. Les techniques de prétraitement utilisées sont : la congélation/décongélation (C/D), l'extraction assistée par les enzymes (EAE), les ultrasons (EAU) et le champ électrique pulsé (EACEP). D'un autre côté, l'extraction des CPT et des caroténoïdes a été réalisée par 03 solvants différents : éthanol et méthanol dans l'appareil Soxhlet, et par le solvant supramoléculaire. Les CPT et les caroténoïdes totaux des extraits obtenus ont été quantifiés par méthodes spectrophotométriques, et une analyse qualitative par LC MS/ MS a été réalisée sur l'extrait supramoléculaire pour l'identification de ces composés. La détermination de l'activité antioxydante des 03 extraits a été réalisée *in-vitro* par les tests de piégeage des radicaux DPPH et ABTS. Les résultats obtenus ont été marqués par le rendement le plus élevé en C-PC de $129,5 \pm 7,78$ mg/g après un prétraitement par US à une fréquence de 40 kHz pendant 30 min, suivit par celui au CEP avec $84,00 \pm 2,13$ mg / g. La pureté la plus élevée de $2,47 \pm 0,21$ a été obtenue avec le prétraitement par C/D, suivi par celles aux US ($2,15 \pm 0,12$) et au CEP ($2,13 \pm 0,39$) respectivement. L'extraction des CPT et des caroténoïdes a montré une teneur élevée en CPT pour l'extrait méthanolique, comparativement à celles des 02 autres extraits, contrairement aux caroténoïdes où l'extrait supramoléculaire a enregistré le taux le plus élevé avec une teneur de $0,69 \pm 0,08$ mg/ g. L'activité antioxydante la plus élevée contre les radicaux DPPH et ABTS a été enregistrée pour l'extrait supramoléculaire avec des pourcentages d'inhibition de $76,70 \pm 1,07$ et $66,11 \pm 2,99$ % respectivement. L'analyse par LC- MS/MS de l'extrait supramoléculaire a révélé la présence de l'acide 4- hydroxybenzoïque et un pic relatif à l'acide gallique pour les CPTs, et la présence des echinenones, la zéaxanthine, la β - cryptoxanthine et un pic relatif au β - carotène pour les caroténoïdes.

Mots clés : C-phycocyanine, composés phénoliques totaux, caroténoïdes, activité antioxydante, extractions, solvant supramoléculaire, LC MS/MS.

Abstract

Spirulina is a cyanobacterium with multiple biological activities. This characteristic is mainly due to its bioactive compounds, among these compounds, C-phycoerythrin (C-PE), total phenolic compounds (TCP) and carotenoids are a potential source of natural antioxidants. In order to take advantage of the benefits of spirulina, we first proceeded to the extraction of C-PE by comparing 04 pre-treatment techniques for the disruption of the cell membrane and obtaining the highest yield and purities. The pre-treatment techniques used are: freezing / thawing (F/T), enzymatic (EAE), ultrasound (USAE) and pulsed electric field (PEFAE). On the other hand, the extraction of TPC and carotenoids was carried out by 03 different solvents: ethanol and methanol using the Soxhlet apparatus, and supramolecular solvent. The TPC and total carotenoids of the extracts obtained were quantified by spectrophotometric methods, and a qualitative analysis for the identification of these compounds was determined on the supramolecular extract by LC MS/MS. The determination of the antioxidant activity of the 03 extracts was carried out *in vitro* by the DPPH radical scavenging and the power of reduction of the radical ABTS tests. The results obtained were marked by the highest yield of C-PE with 129.5 ± 7.78 mg / g after a pretreatment by US at a frequency of 40 kHz for 30 min followed by PEF one with 84.00 ± 2.13 mg / g. The highest purity of 2.47 ± 0.21 was obtained with F/T, followed by US (2.15 ± 0.12) and PEF (2.13 ± 0.39). On the other side, the extraction of TPCs and carotenoids showed the highest polyphenol content in the methanolic extract, unlike the carotenoids where the supramolecular extract recorded the highest rate, with a content of 0.69 ± 0.08 mg / g. The highest antioxidant activity against DPPH and ABTS radicals was recorded for the supramolecular extract with inhibition percentages of 76.70 ± 1.07 and $66.11 \pm 2.99\%$ respectively. LC-MS/MS analysis of the supramolecular extract revealed the presence of 4-hydroxybenzoic acid and a peak relative to gallic acid for CPTs, and the presence of echinenones, zeaxanthin, β -cryptoxanthin and a peak relating to β -carotene for carotenoids.

Keywords : C-phycoerythrin, polyphenols, carotenoids, extractions, supramolecular solvent. antioxidant activity, LC MS/MS.

الملخص

سبيرولينا هي بكتيريا زرقاء لها أنشطة بيولوجية متعددة. ترجع هذه الخاصية بشكل أساسي إلى المركبات النشطة بيولوجيًا التي تحتوي عليها، من بين هذه المركبات الفيكوسيانين (C-PC)، المركبات الفينولية الكلية (CPT) والكاروتينات التي تعتبر مصدر محتمل لمضادات الأكسدة الطبيعية. لغرض الاستفادة من فوائد السبيرولينا، شرعنا أولاً في استخراج C-PC من خلال مقارنة 04 تقنيات ما قبل المعالجة للحصول على أكبر معدلي استخلاص ونقاوة. تقنيات المعالجة المسبقة المستخدمة هي: التجميد / الذوبان (C/D)، الإنزيمات (EAE)، الموجات فوق الصوتية (US) والمجال الكهربائي النبضي (CEP). من ناحية أخرى، تم استخراج CPTs والكاروتينات باستعمال 03 مذيبات استخلاص مختلفة: الإيثانول والميثانول في جهاز Soxhlet، والمذيبات فوق الجزيئية الذي يعتبر بديل أكثر احتكامًا للبيئة وللمركب المستخلص. تم قياس كمية CPTs والكاروتينات الكلية للمستخلصات التي تم الحصول عليه باستخدام طرق القياس الطيفي، وتم إجراء تحليل نوعي بواسطة تقنية LC MS / MS على المستخلص فوق الجزيئي لتحديد طبيعة هذه المركبات. تم إجراء تحديد نشاط مضاد الأكسدة للمستخلصات الثلاثة في المختبر، عن طريق اختبار الكسح الجذري DPPH واختبار قدرة الاختزال الجذري ABTS. تميزت النتائج التي تم الحصول عليها بأعلى إنتاجية لـ C-PC بلغت 129.5 ± 7.78 مغ / غ بعد المعالجة المسبقة بالموجات فوق الصوتية لمدة 30 دقيقة بتردد 40 كيلو هرتز، تليها CEP بـ 84.00 ± 2.13 مغ / غ. كما تم الحصول على أعلى درجة نقاوة قدرها 0.21 ± 2.47 باستخدام المعالجة بتقنية التجميد / الذوبان، المعالجة US (0.12 ± 2.15)، ثم CEP (0.39 ± 2.13). من ناحية أخرى، أظهر استخراج CPTs والكاروتينات نسبة عالية من مادة البوليفينول للمستخلص الميثانولي، مقارنة بالمستخلصات الأخرى، على عكس الكاروتينات حيث سجل المستخلص فوق الجزيئي أعلى معدل بمحتوى 0.69 ± 0.08 مغ / غ. تم تسجيل أعلى نشاط مضاد للأكسدة ضد جذور DPPH و ABTS للمستخلص فوق الجزيئي بنسب تثبيط 1.07 ± 76.70 و 2.99 ± 66.11 % على التوالي. كشف تحليل LC-MS / MS للمستخلص فوق الجزيئي عن وجود حمض p-hydroxybenzoic وذروة نسبية لحمض الغاليك بالنسبة لـ CPTs، ووجود echineones، zeaxanthine، β -cryptoxanthine وذروة تتعلق بـ β -carotène للكاروتينات.

الكلمات المفتاحية: الفيكوسيانين، البوليفينول، الكاروتينات، نشاط مضاد الأكسدة، الاستخلاص، المذيب فوق الجزيئي

Introducción General

Au cours des dernières décennies, l'intérêt grandissant de l'alimentation sur la santé humaine a conduit à divers changements dans l'alimentation et le développement de nouveaux aliments, les aliments fonctionnels, capables d'apporter des bienfaits pour la santé au-delà de leur valeur nutritionnelle. La mondialisation de l'industrie alimentaire a entraîné une augmentation de la demande en aliments fonctionnels pour répondre aux besoins des consommateurs (Adadi et *al.*, 2019).

Il est à noter que les aliments fonctionnels sont riches en composés bioactifs (CBA) qui procurent des bienfaits pour la santé au-delà de la nutrition essentielle lorsqu'ils sont consommés à des niveaux suffisants dans le cadre d'un régime alimentaire normal (Diplock et *al.*, 1999). Au fait, les CBA sont des éléments majeurs tels que les vitamines et les composés phytochimiques ; ils sont dérivés de plantes, d'animaux ou d'autres sources telles que les micro-organismes, qui sont « Généralement Considérés Comme Sûrs (Generally Recognized As Safe : **GRAS**) » (Banwo et *al.*, 2021).

En effet, les CBA jouent un rôle central dans le développement d'aliments fonctionnels grâce à leur capacité d'interagir avec un ou plusieurs composants des tissus vivants en fournissant un large éventail d'effets potentiels. Ils présentent un intérêt certain au vu de leurs diverses activités biologiques et fonctionnelles comme antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique, anticancéreux, antiviral et anti-tumoral. Ainsi, le corps humain est protégé des niveaux élevés des radicaux et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent facilement réagir avec d'autres molécules pour entraîner des dommages dans la cellule.

Par ailleurs, l'utilisation d'organismes photosynthétiques tels que les macros et les microalgues, a reçu plus d'intérêt, ces dernières années, en raison de la diversité de leur contenu phytochimique avec diverses structures chimiques et activités biologiques (antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, antidiabétique...etc.) (Hong et *al.*, 2011 ; Hu et *al.*, 2019 ; Silva et *al.*, 2020 ; Souza et *al.*, 2020).

Dans ce sens, les espèces de microalgues, telles que la spiruline, sont également connues pour produire divers composés bioactifs et des produits chimiques fins (Phang et *al.*, 2015). Ces matériaux ont des applications potentielles en nutrition comme aliments fonctionnels, car ils sont capables de fournir des avantages physiologiques et pharmacologiques pour la santé humaine. Pour cela, la spiruline est l'une des microalgues les plus populaires. Son nom vient d'un mot latin signifiant petite spirale et pour l'OMS, c'est l'un des meilleurs aliments sur terre (Chacon-Lee et Gonzalez-Marino, 2010).

La production mondiale annuelle est supérieure à 3000 tonnes (Chen et *al.*, 2016), avec une valeur potentielle de 5 000 à 33 000 US\$. g^{-1} (Rizzo et *al.*, 2015), cette valeur commerciale dépend fortement de son grade de pureté variant du grade alimentaire (0,7) jusqu'au grade analytique (4,0).

Les principaux composants nutritionnels de la spiruline sont les protéines, les acides aminés essentiels, les minéraux et les acides gras essentiels ω -3 et ω -6, entre autres composants (Cuellar-Bermudez et *al.*, 2015). Elle contient également les vitamines A, C et E et des pigments accessoires tels que les phycobiliprotéines, les caroténoïdes et les polyphénols. L'une des phycobiliprotéines les plus abondantes est la C-phycocyanine (C-PC), constituant jusqu'à 20% de son poids sec. La C-PC, est un complexe pigment-protéine hydrosoluble naturel bleu, qui est utilisé comme colorant alimentaire (Martelli et *al.*, 2014). La C-PC agit comme un complexe qui absorbe la lumière dans les régions du spectre visible qui sont mal absorbées par les chlorophylles. Elle est également le principal photorécepteur lors de la photosynthèse et se trouve, avec d'autres phycobiliprotéines, dans le complexe supramoléculaire appelé phycobilisome, situé dans la membrane thylakoïdale (Sekar et Chandramohan, 2008). Les caroténoïdes sont un groupe de polyisoprénoïdes pigmentés jaune, orange-rouge, synthétisés par les plantes, les algues, les cyanobactéries, les bactéries et les champignons. Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux (Rodriguez-Concepcion et *al.*, 2018).

Ces composés, en raison de leur grande polyvalence structurelle et fonctionnelle, sont de la plus haute importance dans la nature (Esteban et *al.*, 2015). Néanmoins, ces pigments ne peuvent être extraits que par la rupture des cellules en milieu aqueux. Cet intérêt pour de nouveaux composés bioactifs d'origine naturelle a généré le besoin de développer de nouveaux procédés d'extraction capables à la fois de fournir des extraits inoffensifs et sûrs en termes de durabilité et de respect de l'environnement.

Il est à relever que les composés bioactifs naturels sont synthétisés en petites quantités et sont récupérés avec d'autres composés pendant l'extraction; ce qui rend leur séparation et leur purification ultérieures fastidieuses et laborieuses. Ces composés sont généralement incorporés dans les matrices cellulaires avec des macromolécules (par exemple les protéines et les fibres) et sont difficiles à extraire. L'extraction est un processus de transfert de masse qui dépend principalement de l'accessibilité du solvant aux composés bioactifs cibles.

L'extraction implique la diffusion du solvant dans la matrice, suivie de la dissolution des composés bioactifs dans le solvant et enfin sa séparation des composés bioactifs (Lam, 2007).

L'extraction a été utilisée probablement depuis la découverte du feu. Égyptiens et Phéniciens, Juifs et Arabes, Indiens et Chinois, Grecs et Romains, et même Mayas et Aztèques, tous possédaient des procédés innovants d'extraction et de distillation utilisés même pour les parfums, les cosmétiques ou les aliments.

De nos jours, on ne trouve plus de ligne de production dans les domaines agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétiques, nutraceutiques ou bioénergétique, qui n'utilisent pas de procédés d'extraction, tels que la macération, l'extraction par solvant, par la vapeur ou par l'hydrodistillation, par pression à froid, par le pressage...etc. Avec l'augmentation des coûts de l'énergie et la volonté de réduire les émissions de gaz à effet de serre, les industries alimentaires sont mises au défi de trouver de nouvelles technologies afin de réduire la consommation d'énergie, de répondre aux exigences légales en matière d'émissions, de sécurité et de contrôle des produits /processus, et pour la réduction des coûts ainsi que l'amélioration de la qualité et de la fonctionnalité des produits.

Actuellement, l'extraction verte des produits naturels pourrait être un nouveau concept pour relever les défis du 21^e siècle, afin de protéger à la fois l'environnement et les consommateurs et, en même temps, renforcer la concurrence des industries pour qu'elles soient plus écologiques, économiques et innovantes (Picot-Allain et *al.*, 2021). La plupart des chercheurs ont signalé que les techniques actuelles de rupture cellulaire, telles que l'extraction assistée par les ultrasons, l'extraction assistée par les micro-ondes et l'extraction par le fluide supercritique, étaient des technologies rentables pour l'extraction de biomolécules à partir de microalgues. Cependant, la généralisation est très compliquée en raison des différences dans les conditions de fonctionnement selon les méthodes, ainsi que les nombreux facteurs non maîtrisés chez les différentes espèces de microalgues.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le premier et le deuxième chapitre sont consacrés aux données bibliographiques sur les composés bioactifs de la spiruline, avec un accent particulier sur les phycobiliprotéines, les caroténoïdes et les polyphénols, ainsi que les différentes techniques d'extraction utilisées.

Le troisième chapitre est relatif à l'extraction de la C- Phycocyanine de grade alimentaire par différentes techniques à savoir : la congélation/ décongélation, assistée par les enzymes, par les ultrasons, et par le champ électrique pulsé, afin de déterminer la meilleure technique d'extraction de ce pigment.

Le dernier chapitre concerne l'extraction simultanée des caroténoïdes et des polyphénols par les solvants supramoléculaires (SUPRAS). Une hypothèse est émise quant au potentiel qu'ont les SUPRAS à extraire efficacement et rapidement les deux types de pigments présents dans la poudre de spiruline et à évaluer *in vitro* l'activité antioxydante des extraits SUPRAS par le pouvoir du piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS, afin d'évaluer leur capacité à être incorporés comme additif antioxydant GRAS dans les formulations alimentaires. L'identification par des transitions caractéristiques en LC-MS/MS des caroténoïdes et des polyphénols extraits a également été réalisée.

***PARTIE 01: Synthèse
bibliographique***

*Chapitre I:
Monographie de la
spiruline*

I.1 Hitorique

Au XVI^e siècle, un chercheur allemand, le Dr Darwin, a découvert une algue bleu-vert en forme de spirale et l'a appelée spiruline. Plus tard, le Dr Christopher Hills, « Le père de la spiruline », a redécouvert ces algues dans le lac Tchad en Afrique, et les a popularisées en tant que complément alimentaire. Selon lui, la spiruline contient des milliards d'années de sagesse évolutive codées dans son ADN.

La spiruline est une microalgue filamenteuse cyanophycée, vieille de 300 millions d'années (famille des *Oscillatoriacées*). Son nom vient d'un mot latin signifiant minuscule spirale. On la trouve naturellement dans les eaux alcalines, riches en minéraux et non polluées (Kebede et Ahlgren, 1996). La spiruline a une taille microscopique mais peut atteindre une taille de 0,5 mm de long, ce qui peut la rendre visibles à l'œil nu. La spiruline a une organisation procaryote, une paroi cellulaire pluristratifiée, un système lamellaire photosynthétique, des ribosomes et des fibrilles de la région de l'ADN. C'est une excellente source de protéines, de vitamines, d'acides gras, de minéraux, de pigments photosynthétiques et de nombreux métabolites secondaires (Sánchez-Muros et *al.*, 2020).

I.2 Composés Bioactifs de la spiruline

I.2.1 Acides gras essentiels

Sept pour cent du poids total de la spiruline sont des lipides. Elle contient une grande quantité d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Les substances semblables aux vitamines qui ne peuvent pas être synthétisées dans le corps humain, également appelées acides gras essentiels (AGE), ils comprennent les acides linoléique, linoléique et arachidonique. Les AGE aident à réduire les taux de cholestérol total et de triglycérides. La membrane cellulaire de la spiruline est constituée en grande partie de lipides, ces derniers lorsqu'ils sont présents avec les vitamines E et A protègent les membranes cellulaires contre les attaques des radicaux libres (Pyne et *al.*, 2017).

I.2.2 Carbohydrates

Environ 15 à 20 % du poids sec de la spiruline sont des glucides. Elle contient du glucose, du fructose, du saccharose, du glycérol, du mannitol et du sorbitol. Le myo-inositol est un glucide qui est une excellente source de phosphore organique. Des études récentes indiquent que le spirulane calcique (Ca-SP) est un nouveau polysaccharide sulfaté présent dans la spiruline (Pyne et *al.*, 2017).

I.2.3 Vitamines et minéraux

La spiruline contient de la vitamine B₁ (thiamine), B₂ (riboflavine), B₃ (nicotinamide), B₆ (pyridoxine), B₉ (acide folique), B₁₂ (cyanocobalamine), vitamine C (Acide ascorbic), vitamine D (Calciférol), la vitamine E (tocophérol), et la provitamine A (β -carotène). La spiruline est la seule source algale de la vitamine B₁₂. Elle contient également la plus grande quantité de bêta-carotène, bien plus que les carottes. C'est aussi une très bonne source de vitamine E, semblable au germe de blé.

La spiruline est une source adéquate de nombreux minéraux comme le fer, le zinc, le sodium, le potassium, le phosphore, le manganèse, le magnésium, le cuivre et le calcium. La très haute teneur en fer rend la spiruline économiquement importante. Le calcium, le phosphore et le magnésium sont présents en quantités comparables à celles trouvées dans le lait (Pyne et *al.*, 2017).

I.2.4 Protéines

La spiruline contient généralement une quantité élevée de protéines variant entre 55 et 70 % en poids sec (Phang et Chu, 1999). Contrairement aux autres protéines d'origine végétale, la spiruline est une protéine parfaite car elle contient tous les acides aminés essentiels (Tab.I.1). Son statut de source végétale de protéines complètes fait d'elle un complément alimentaire idéal pour les végétariens.

Tableau I. 1: Composition en acides aminés de la spiruline (Lupatini et *al.*, 2017)

Acides aminés	Composition (g/ 100g)
Leucine	4,94
Isoleucine	3,20
Valine	3,51
Tryptophane	0,93
Théanine	2,97
Lysine	3,02
Méthionine	1,15
Phénylalanine	2,78
Total	22,5

I.2.5 Phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines (PBPs) sont une famille de protéines colorées couramment présentes dans les algues, notamment les cyanobactéries, les rhodophytes, les cryptomonads, les cyanelles, etc. Ces molécules sont des protéines, nativement, hautement fluorescentes, solubles dans l'eau, avec des groupes prosthétiques linéaires (bilines) liés à des résidus de cystéine spécifiques (Hemlata et *al.*, 2011).

Les phycobiliprotéines sont les principales chromoprotéines capturant la lumière dans un certain type de microalgues (Moraes et *al.*, 2011). Ces composés sont classés selon différents critères (tels que la structure, les spectres d'absorption, la couleur, etc.). De plus, sur la base de la longueur d'onde d'absorbance, généralement, les phycobiliprotéines sont classées en trois principaux types à savoir la phycoérythrine (PE ; $\lambda_{\max} = 490 - 570$ nm), la C-phycoyanine (C-PC ; $\lambda_{\max} = 610 - 625$ nm) et l'allophycoyanine (APC ; $\lambda_{\max} = 650 - 660$ nm), qui diffèrent par leurs propriétés spectrales et structurales (Chu, 2012).

I.2.5.1 Structure des phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines de nombreuses algues sont organisées en structures subcellulaires appelées phycobilisomes. Ces structures permettent aux pigments d'être disposés géométriquement de manière à optimiser la capture de la lumière et le transfert d'énergie. Toutes les phycobiliprotéines absorbent directement la lumière incidente, mais elles participent en outre à une chaîne de transfert d'énergie au sein du phycobilisome (Viskari et *al.*, 2001). Le transfert d'énergie se produit alors comme suit : Phycoérythrine → Phycocyanine → Allophycoyanine → Chlorophylle *a* (Borowitzka et *al.*, 2013).

Les phycobiliprotéines sont composées d'un certain nombre de sous-unités, chacune ayant un squelette protéique auquel des chromophores tétrapyrroles linéaires sont liés par covalence. Toutes les phycobiliprotéines contiennent soit de la phycocyanobiline ou des chromophores de phycoérythrobiline, et peuvent également contenir l'une des trois bilines mineures. Chaque biline possède des caractéristiques spectrales uniques qui peuvent être encore modifiées par les interactions des sous-unités et du chromophore avec l'apoprotéine. Cela signifie que les caractéristiques spectrales spécifiques de chaque type de phycobiliprotéines sont le résultat de la composition de ses sous-unités (Liu et *al.*, 2005). Ils sont tous composés d'hétéro-sous-unités α et β et existent couramment dans le trimère ($\alpha\beta$)³ ou l'hexamère ($\alpha\beta$)⁶ constitué du monomère équimolaire ($\alpha\beta$) (Zeng et *al.*, 2012) où ($\alpha\beta$) est traditionnellement désigné comme le monomère des phycobiliprotéines.

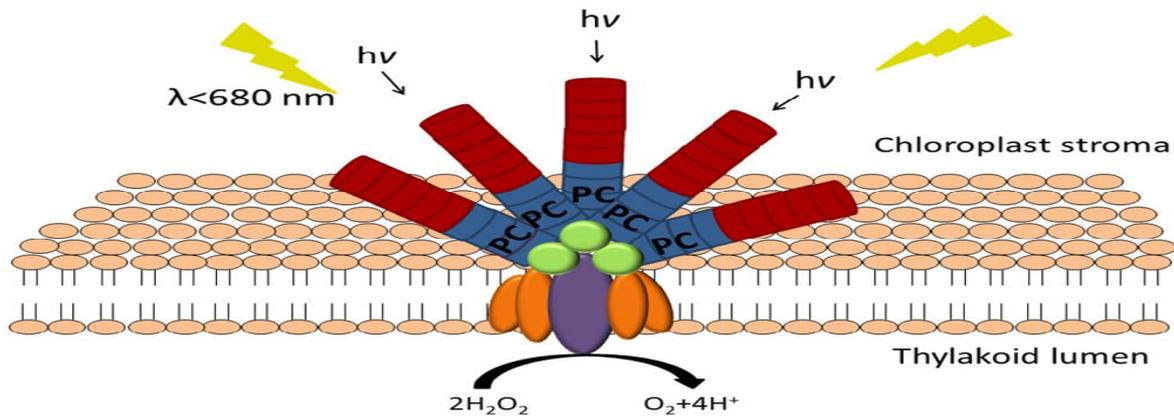


Figure I. 1: Structure du phycobilisome (Vernes et *al.*, 2015)

Selon la figure I.1, les phycobiliprotéines (PBPs) sont composés de centaines d'éléments similaires aux chromophores, qui sont des protéines. Ils sont assemblés en une mode qui permet un transfert d'énergie très efficace. Les PBPs sont impliquées dans une cascade d'énergie transfert de la phycoérythrine (PE, cylindres rouges) à phycocyanine (PC, cylindres bleus) et allophycocyanine (APC, sphère verte) et enfin au centre de réaction dans photosystèmes II (ellipse violette) et I (ellipses orange).

Parmi les différentes phycobiliprotéines, la C-phycocyanine (C-PC) est le composé le plus important qui se présente sous forme d'un pigment bleu naturel, également considéré comme l'un des principaux pigments de la spiruline. Elle est principalement présente dans les cyanobactéries, considérées comme la forme de vie la plus ancienne sur la terre (Kuddus et *al.*, 2013).

Les espèces de spiruline principalement utilisées pour produire la phycocyanine sont les espèces *Arthrospira platensis* et *Arthrospira maxima* (Martelli et *al.*, 2014). Outre ces espèces, il existe d'autres microalgues qui sont utilisées pour produire la phycocyanine à savoir *Pyrophyridium* sp. *Synechocystis* sp. *Phormidium ceylanicum*, *Limnothrix* sp, *Synechococcus lividus* et les espèces appartenant au genre *Nostoc* (Manirafasha et *al.*, 2016).

I.2.5.2 Purification des phycobiliprotéines

Les procédures de purification des phycobiliprotéines (PBPs) les plus couramment utilisées comprennent le fractionnement au sulfate d'ammonium, la séparation chromatographique et l'extraction aqueuse en deux phases.

Le fractionnement au sulfate d'ammonium est largement utilisé dans la purification des PBPs avant un traitement ultérieur. La stabilité colloïdale de la surface de la protéine pourrait être perturbée par l'augmentation de la concentration de l'ammonium dans la solution (Burgess, 2009). Habituellement, le fractionnement au sulfate d'ammonium comporte deux étapes : la première étape consiste à précipiter les impuretés avec 20 à 30 % (p/v) de sulfate d'ammonium, qui peut être éliminé par centrifugation, et la deuxième étape consiste à précipiter la plupart des PBPs du surnageant en augmentant la concentration du sulfate d'ammonium entre 60 et 70% (p/v). Un traitement de fractionnement au sulfate d'ammonium pourrait aider à éliminer de grandes quantités d'impuretés. Par conséquent, ce traitement est recommandé pour la purification des PBPs.

Diverses technologies chromatographiques ont été développées pour purifier les PBPs, y compris la chromatographie de filtration sur gel, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie sur hydroxyapatite, la chromatographie d'adsorption, la chromatographie d'interaction hydrophobe, etc. La chromatographie par filtration sur gel, également connue sous le nom de chromatographie d'exclusion, sépare les protéines principalement en fonction de leur taille alors que la chromatographie échangeuse d'ions sépare les protéines principalement en fonction de leur affinité aux ions. Ces deux méthodes chromatographiques sont le plus souvent utilisées lors de la purification des PBPs en laboratoire.

1.2.5.3 Application biomédicale, biotechnologique et nutraceutique des phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines ont acquis une importance remarquable dans diverses activités menées par des chercheurs, il y a de nombreuses années (Santiago-Santos et *al.*, 2004). De manière concise, les phycobiliprotéines trouvent une application dans les aliments et les cosmétiques en tant que colorants naturels (largement utilisés pour remplacer les colorants synthétiques) (Patil et *al.*, 2006) ; dans la recherche biomédicale comme marqueur fluorescent et dans les maladies induites par le stress oxydatif comme agents thérapeutiques (Moraes et *al.*, 2011) en raison de leurs propriétés pharmaceutiques et biologiques potentielles.

Ces applications principales incluent les réactifs pharmacologiques et biologiques, les sondes fluorescentes et les colorants naturels (dans les aliments, les produits de maquillage, les produits de santé, les produits pharmaceutiques, les textiles, et les détergents). En outre, d'autres études ont montré que les phycobiliprotéines avaient également des applications

potentielles sur l'amélioration de la mémoire, la détection rapide de la photoélectricité et les réseaux nerveux manuels (Silveira et *al.*, 2007).

Les phycobiliprotéines sont considérées comme des sondes fluorescentes plus efficaces car elles induisent des propriétés fluorescentes exceptionnelles pour les techniques de marquage par rapport aux fluorophores organiques, en particulier lorsqu'une sensibilité élevée ou une détection multicolore est requise. Ceci est dû à leurs propriétés telles que l'absorption large et élevée de la lumière adaptée à de nombreuses sources lumineuses. Ils sont 10 à 20 fois plus brillants que les fluorophores organiques, ne se chevauchent pas par rapport aux colorants organiques, permettent une utilisation simultanée avec les chromophores conventionnels, de plus, ils sont photostables lorsque leur émission de fluorescence est difficile à étouffer car la période de rétention de la fluorescence est plus longue; de plus, ils ont une très haute solubilité dans l'eau, ce qui les rend stables même après la conjugaison de sites multiples (Scheer et *al.*, 2008).

Les phycobiliprotéines servent de marqueurs fluorescents précieux dans de nombreuses applications en cytométrie de flux, tri cellulaire activé par la fluorescence, l'histochimie et, dans une certaine mesure, en immuno-essai et en détection d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). En somme, les phycobiliprotéines sont des sondes fluorescentes potentiellement prometteuses car elles se complètent, ce qui signifie qu'un type peut intervenir en cas de limitation d'application d'un autre type en raison de leurs propriétés différentes

(Fig. I.2).

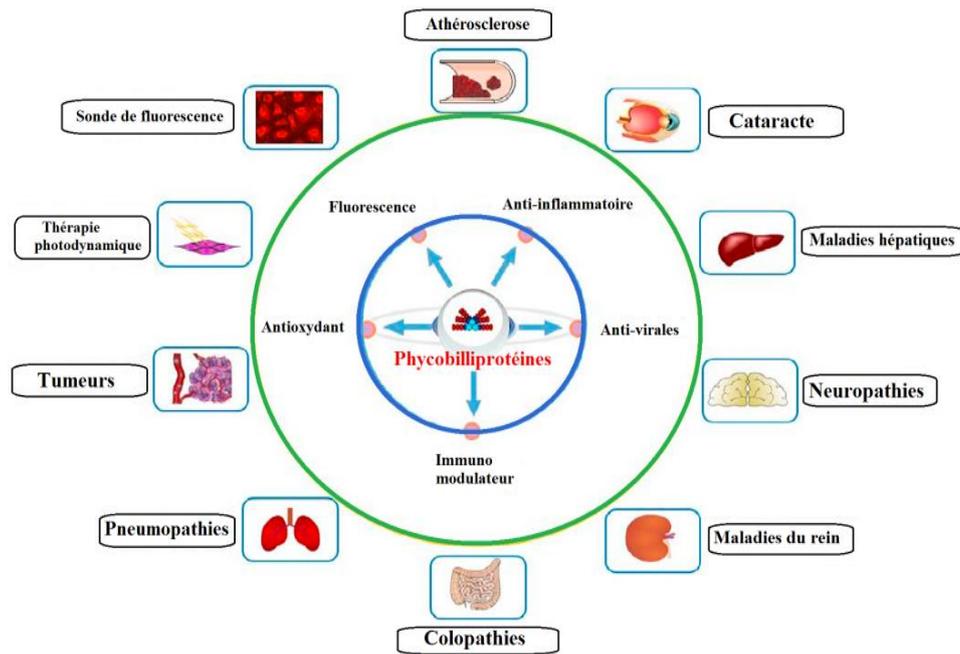


Figure I. 2: Les applications des phycobiliprotéines (Li et al., 2019)

Thangam et al. (2013) ont étudié l'effet cytostatique de la C-PC sur les cellules cancéreuses et ont découvert que la C-PC inhibait la croissance du HT-29 (cancer du côlon) et la A549 (cancer du poumon), détectés par microscopie à fluorescence, arrêtant la réplication de l'ADN dans les cellules tumorales.

L'allophycocyanine (APC) recombinante s'est avérée capable de traiter les tumeurs. L'APC recombinante a inhibé de manière significative les cellules d'hépatome H22, et les taux d'inhibition variaient de 36 % à 62 % lorsque la dose d'APC était de 6,25 à 50 mg /kg /jour (Ge et al., 2005).

Le gène de la phycoérythrine (PE) a été exprimé avec succès dans l'espèce *E. coli* BL21, et les tests de cytotoxicité tumorale ont montré que la PE recombinante pouvait inhiber la croissance des cellules cancéreuses HeLa, et le taux d'inhibition augmentait de 37,3 à 63,26 % à mesure que la concentration en protéines augmentait (Ruobing et al., 2007). Ces études indiquent que la PBP native et la PBP recombinante ont une valeur médicale potentielle dans les applications anti-tumorales.

1.2.5.4 Extraction et caractérisation de la C- phycocyanine

La C- phycocyanine est l'une des classes principales de phycobiliprotéines dans de nombreuses cyanobactéries et en tant que phycobiliprotéine secondaire chez certaines algues

rouges. Elle peut être extraite des cyanobactéries comme *Arthrospira platensis*, qui a été largement utilisée dans des applications commerciales telles que l'industrie alimentaire, l'industrie cosmétique comme colorant bleu naturel, l'immunodiagnostic et comme réactifs analytiques (Kuddus et al., 2013). Les propriétés biologiques et pharmacologiques de la C-phycoyanine incluent : un pigment protéique fluorescent non toxique, soluble dans l'eau, doté de puissantes propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Romay et al., 1998).

I.2.5.5 Structure de la C- phycoyanine

La phycoyanine est composée d'une protéine et d'un composant non protéique connue sous le nom de phycoyanobiline (PCB). La structure de la PCB est similaire à celle du bilirubine et biliverdine (Lakshmi et al., 2008). Le PCB est un tétrapyrrole à chaîne ouverte responsable de la couleur bleue intense de la C- PC.

Le composant protéique de la C-PC se compose de deux sous-unités homologues: les chaînes α et β globines liées de manière covalente par liaison thioéther à la PCB (Fig. I.3). La PCB via la cystéine 84 et la chaîne β est reliée à deux PCB via les cystéines 84 et 155 par des liaisons thioéther. En revanche, Tang et al. (2012) ont décrit qu'elle est liée à la cystéine 195, tandis que Shen et al. (2008) ont suggéré que les PCB sont liés aux cystéines 82 et 153. Les deux chaînes ont une structure en hélice α et la structure tridimensionnelle des structures sont similaires chez tous les organismes. Selon sa structure primaire, la sous-unité α a deux résidus cystéine et deux résidus méthionine. La sous-unité β contient trois résidus cystéine et cinq résidus méthionine (Huang et al., 2007).

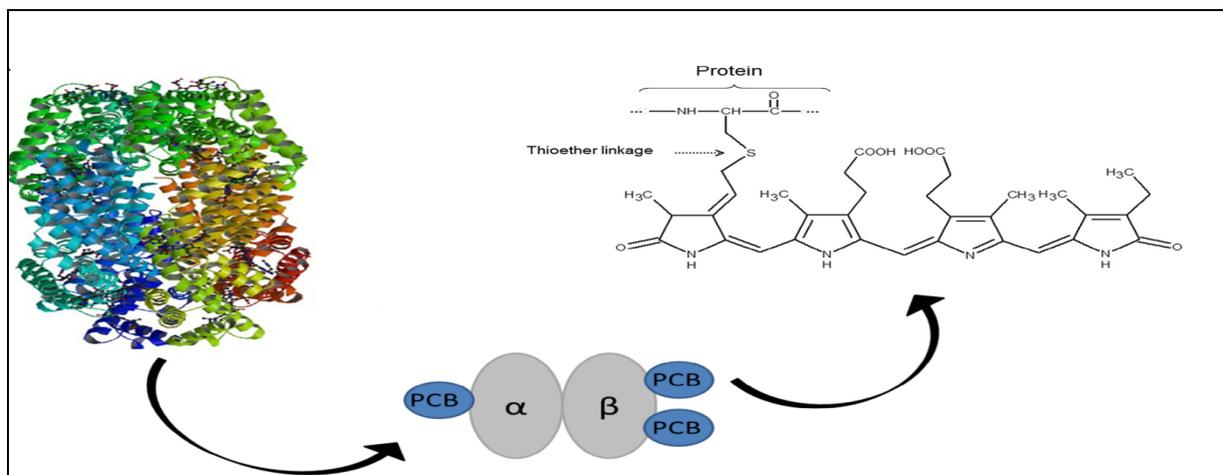


Figure I. 3: Structure de la C-phycoyanine (Wang et al., 2001)

I.2.5.6 Paramètres physico-chimiques de l'extraction de la C- phycocyanine

L'extraction de la C-PC est principalement influencée par les facteurs physiques et les paramètres chimiques : température, pH, type de solvant, rapport biomasse / solvant et la forme de la biomasse (sèche ou fraîche).

a. Température

Il est bien connu que la température influence l'extraction des composés intracellulaires dus à des modifications de la structure de la membrane cellulaire en augmentant le taux de transfert de masse des composés internes vers le milieu d'extraction. Dans le cas de l'extraction de la C-PC, le rendement augmente avec la température jusqu'à un maximum, ce qui entraînera sa dégradation et sa dénaturation. En effet, il a été rapporté qu'une augmentation du rendement d'extraction survient lorsqu'il y a une élévation de la température de 30 à 50 °C (Su et *al.*, 2014).

Au-dessus de 50 °C, une dénaturation de la structure des protéines de la C-PC se produit, entraînant des modifications de la stabilité du chromophore et des changements de couleur (Su et *al.*, 2014). Ces réactions de dégradation sont probablement liées à des modifications des structures secondaires, tertiaires et quaternaires favorisées par les températures élevées (Ferreira-Santos et *al.*, 2020). Par conséquent, les températures élevées peuvent être évitées, en préférant les méthodes d'extraction qui s'effectuent à des températures relativement basses.

La plupart des méthodes de rupture mécanique, telles que le broyage par billes, les ultrasons et l'homogénéisation, ont été réalisées à 25-30 °C (Ilter et *al.*, 2018 ; Pan-utai et Iamtham, 2019 ; Tavanandi et Raghavarao, 2020). De plus, la température a une forte influence sur la pureté de l'extrait brut ; une augmentation de la température permet l'extraction de protéines cytoplasmiques et d'autres composés d'interférence, diminuant ainsi la pureté de la C-PC (Silveira et *al.*, 2007).

b. Type de solvant et son pH

Le pH affecte directement la solubilité de la C-PC en raison de l'influence de la force ionique du solvant sur la structure des protéines. Les meilleures conditions de pH se situent entre 6 et 7 (Su et *al.*, 2014 ; Vali Aftari et *al.*, 2015), car la C-PC est instable à des pH inférieurs à 5 et supérieurs à 8 (Patil et Raghavarao, 2007).

Le point isoélectrique de la C-PC varie entre 4,1 et 6,4 selon les espèces de cyanobactéries (Fernandez-Rojas et *al.*, 2014). A proximité du point isoélectrique, les protéines interagissent moins avec l'eau, ce qui rend leur extraction plus difficile (Silveira et *al.*, 2007).

La solution tampon la plus couramment utilisée est le phosphate de sodium (pH 6 - 8). Outre les solutions tampons, de l'eau distillée et d'autres solutions aqueuses, telles que le CaCl₂ (1,5 %, p/v) et le NaCl (0,15 M) ont également été utilisés comme solvant. Certaines études ont été menées pour optimiser le pH et le type de solvant pour l'extraction de la C-PC à partir de *Spirulina platensis* (Silveira et *al.*, 2007; Ilter et *al.*, 2018) avec des résultats contradictoires. Certains chercheurs ont découvert qu'une solution aqueuse à 1,5% de CaCl₂ entraîne un rendement d'extraction plus élevé par rapport à l'eau distillée et au tampon phosphate de sodium (pH = 7). D'autres chercheurs ont obtenu le même rendement d'extraction en utilisant du tampon phosphate de sodium (pH = 7), de l'eau distillée, une solution de NaCl (0,15 M) et une solution de CaCl₂ (10 g/ L) ; en revanche, des rendements plus faibles ont été observés avec du tampon acétate (pH = 5) (Silveira et *al.*, 2007).

c. Rapport biomasse / solvant

En général, plus le rapport biomasse/solvant est élevé et plus le rendement d'extraction l'est aussi. Cependant, un rapport biomasse/solvant élevé conduit à la réduction de la pureté des extraits. Peu de chercheurs ont évalué le rapport solide liquide pour l'extraction de la C-PC à partir de la spiruline, et les résultats sont ambigus. Un tampon phosphate de sodium (pH = 6,8) avec un rapport de 1:6, 1:8 et 1:10 (p:v) a été évalué, et le rapport 1:10 a donné le rendement d'extraction le plus élevé. Cependant, le rapport 1:6 a conduit à la pureté d'extrait la plus élevée, l'augmentation de la disponibilité des solvants peut extraire plus de composés, principalement des protéines d'interférence (Tavanandi et *al.*, 2018).

Dans une étude ultérieure (Tavanandi et Raghavarao, 2020), les chercheurs ont évalué le rapport biomasse / solvant dans d'autres conditions d'extraction (combinaison solvant, tensioactifs et enzymes). De la même manière que dans l'étude précédente, le rapport 1: 6 a permis d'obtenir des extraits plus purs ; cependant, avec ce rapport, le rendement d'extraction était comparable aux autres rapports évalués.

D'autres chercheurs ont évalué les rapports d'extraction 1:50, 1:25 et 3:50 en utilisant un tampon au phosphate de sodium (pH = 7) et Ultra-Turrax comme méthode de rupture cellulaire, le rendement d'extraction et la pureté les plus élevés ont été obtenus en utilisant le ratio biomasse/solvant de 1:50 (Pan-utai et Iamtham, 2019).

d. Forme de la biomasse algale

La biomasse sèche est généralement utilisée pour l'extraction de la C-PC, et peu d'études ont été réalisées avec de la biomasse fraîche (Sarada et *al.*, 1999; Jaeschke et *al.*, 2019). On ne sait toujours pas si l'utilisation de la biomasse lyophilisée ou fraîche a un impact sur le rendement d'extraction. Cependant, la réhydratation de la poudre (pendant 2 h) dans le tampon d'extraction a entraîné des rendements d'extraction plus élevés, par rapport aux résultats obtenus avec la biomasse sèche (Tavanandi et Raghavarao, 2020). Le séchage conventionnel n'est pas recommandé car une exposition plus longue à des conditions de température élevée (jusqu'à 60 °C) peut avoir un impact sur la teneur en C-PC (Ilter et *al.*, 2018).

I.2.5.7 Effets thérapeutiques de la C-phycoyanine

Romay et *al.* (1998) ont d'abord rapporté les propriétés anti-oxydantes de la phycoyanine et évalué son potentiel en tant que source d'antioxydants *in vivo* et *in vitro*. Il a été constaté que la phycoyanine éliminait efficacement les radicaux libres OH[•] et alcoxydes, entraînant une réduction de la peroxydation et de l'inflammation.

Nishanth et *al.* (2010) ont trouvé que la phycoyanine inhibe la cyclooxygénase-2 (COX-2) et stimulait l'expression des cytokines, et l'expression améliorée de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT), deux enzymes essentielles au système antioxydant naturel des mammifères. Ces résultats indiquent que la phycoyanine a des actions anti-radicalaires et anti-oxydantes, suggérant que la phycoyanine a un excellent effet thérapeutique sur diverses maladies causées par l'accumulation de radicaux libres.

I.2.6 Caroténoïdes

Les premières études portant sur les caroténoïdes remontent au début du XIXe siècle, en particulier en ce qui concerne les couleurs naturelles des différentes plantes (Takaichi et *al.*, 2006). En 1831, Henrich W.F. Wackenroder a isolé le β -carotène du jus de carotte pour la première fois, après quoi de nombreux autres caroténoïdes ont été découverts, isolés et correctement caractérisés. En 2017, environ 1117 caroténoïdes naturels provenant de 683 sources (archées 8 ; bactéries 170 ; et eucaryotes 505) ont été décrits (Yabuzaki, 2017).

I.2.6.1 Les caroténoïdes de la spiruline

Les caroténoïdes tels que le β -carotène, l'échinénone, la β -cryptoxanthine, le β -carotène-5,6-époxyde, la 3-hydroxyéchinénone, la lutéine, la zéaxanthine, la diatoxanthine, la

canthaxanthine, la myxoxanthophylle et l'oscillaxanthine ont été isolés et identifiés à partir de *Spirulina* sp. Les principaux caroténoïdes identifiés chez *S. platensis* sont le β -carotène, la zéaxanthine et la β -cryptoxanthine (Ranga Rao et al., 2010). Lors de leur consommation, ces caroténoïdes aident à contrôler les dommages photo-oxydants des cellules, l'amélioration immunitaire, l'élimination des radicaux libres, la régulation hormonale et l'amélioration de la croissance cellulaire, ainsi que la maturation et la multiplication des cellules (Eriksen, 2008).

I.2.6.2 Structure et classification des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes lipophiles qui peuvent être classés en fonction de leurs caractéristiques chimiques et nutritionnelles. Chimiquement, ils sont classés comme carotènes et xanthophylles. La première classe, les carotènes, est la plus connue, contenant des atomes de carbone et d'hydrogène dans sa structure chimique, comme par exemple l' α -carotène, le β -carotène, le γ -carotène, le δ -carotène et la torulène. La troisième classe, les xanthophylles, additionnées à la présence de carbone et d'hydrogène, elle contient également de l'oxygène dans leur structure chimique, comme la torularhodine, l'astaxanthine et la canthaxanthine (Delgado et al., 2016, Cataldo et al., 2018).

La structure chimique de chaque classe des caroténoïdes les plus courants est illustrée à la figure I.4. En fonction de leurs propriétés nutritionnelles, les caroténoïdes sont généralement classés comme pro -vitamine A, c'est-à-dire, β -carotène, β -cryptoxanthine et α -carotène, ou non-provitamine A, c'est-à-dire le lycopène, la lutéine, la zéaxanthine (Toti et al., 2018) et les cétocaroténoïdes, tels que la canthaxanthine et l'astaxanthine.

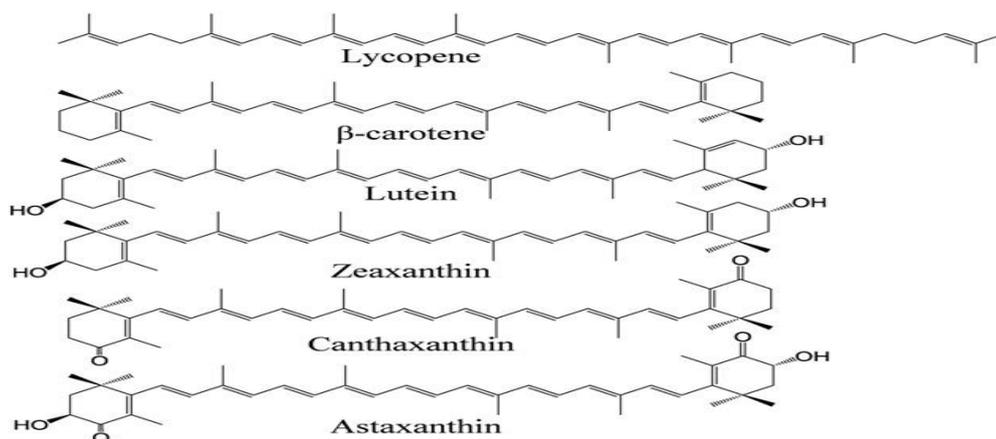


Figure I. 4: Structure chimique des caroténoïdes des microalgues (Gong et Bassi. 2016)

I.2.6.3 Biosynthèse des caroténoïdes

La biosynthèse des caroténoïdes microbiens est dérivée de l'acétyl CoA, obtenu à partir d'acides gras via la voie de la β -oxydation dans les mitochondries des micro-organismes (Lovisa et Kalluri, 2018). Par la suite, la biosynthèse des terpénoïdes se produit, suivant la voie de l'acide mévalonique (MVA), dont dérivent les précurseurs isoprénoïdes C5, isopentényl pyrophosphate (IPP) et diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) via le MVA, ou, selon l'organisme, à travers la Voie du 2 -C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) (Liang et *al.*, 2017). Ensuite, l'IPP est condensé avec du DMAPP, générant du pyrophosphate de géranyle en C10 (GPP), et s'allongeant davantage en pyrophosphate de farnésyle en C15 (FPP) et diphosphate de géranylgéranyle en C20 (GGDP) (Gharibzahedi et *al.*, 2013).

I.2.6.4 Importance des caroténoïdes pour la santé humaine

Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la récolte de la lumière et le transfert d'énergie pendant la photosynthèse et dans la protection de l'appareil photosynthétique contre les dommages photo-oxydants (Henríquez et *al.*, 2016), en neutralisant les radicaux libres tout en agissant comme agents antioxydants en empêchant les dommages oxydatifs aux cellules (Vachali et *al.*, 2012). Bien que les caroténoïdes présentent une multitude de propriétés bénéfiques et intéressantes pour la santé, ils sont principalement connus pour leurs caractéristiques colorantes naturelles, étant les principales molécules responsables de la pigmentation et des couleurs des plantes et de la biomasse microbienne.

Même si les caroténoïdes ont de nombreuses applications en tant que colorants alimentaires, cosmétiques et additifs alimentaires (Ye et *al.*, 2008), ce n'est que récemment que les avantages des caroténoïdes pour la santé humaine ont été mieux compris. Semblables aux rôles protecteurs joués par les caroténoïdes dans les microalgues et les plantes, ces pigments assurent un rôle protecteur pour l'Homme.

La consommation des caroténoïdes soit dans les aliments ou en tant que supplément nutritionnel peut exercer des effets positifs sur la santé, en tant que précurseur de la vitamine A, en prévenant les maladies dégénératives ou liées à l'âge en tant que signalisation rétinodépendante, en aidant à la communication cellulaire et en régulant l'expression des gènes (Sy et *al.*, 2015).

I.2.6.5 Caroténoïdes comme antioxydants

Les caroténoïdes sont connus pour se comporter comme de puissants antioxydants, à travers de multiples mécanismes, y compris le piégeage des radicaux libres, l'extinction de l'oxygène singulet et la chélation des métaux. Les caroténoïdes sont caractérisés par un système de doubles liaisons conjuguées, avec des électrons π délocalisés sur la chaîne polyène responsable de la haute réactivité et disponibles pour être attaqués par des réactifs électrophiles (Monego et *al.*, 2017).

Les pigments antioxydants sont fréquemment rapportés pour réduire les risques du SIDA, du diabète, de la cataracte, de la dégénérescence maculaire et de la neurodégénérescence (Varela et *al.*, 2015). Une carence en ces pigments peut entraîner une exophtalmie, une cécité nocturne et, dans les cas graves, une kératinisation de la conjonctive et de la cornée (Britton, 1995) qui sont généralement liés à leurs activités antioxydantes (Zhang et *al.*, 2014 ; Manayi et *al.*, 2015).

L'interaction avec les espèces radicalaires oxydantes se fait par don d'hydrogène allylique formant un radical caroténoïde stabilisé. En détail, quatre mécanismes principaux sont impliqués dans les propriétés de piégeage des caroténoïdes, notamment (Ribeiro et *al.*, 2018) :

1. L'oxydation se produit lorsque des espèces radicalaires oxydantes à potentiel redox élevé retirent un électron du caroténoïde (Car) par des espèces radicalaires ($R^{\bullet+}$) pour former des cations radicalaires caroténoïdes ($Car^{\bullet+}$) ;
2. la réduction des caroténoïdes se produit à la suite des réactions de réduction par l'acquisition d'un électron pour former un anion radical caroténoïde ($Car^{\bullet-}$) ;
3. l'abstraction de l'atome d'hydrogène est un moyen de former un radical neutre stabilisé par résonance (Car^{\bullet}) via le prélèvement d'hydrogène allylique ;
4. l'addition du radical se produit en ajoutant un radical libre, tel que le peroxy (ROO^{\bullet}), l'hydroxyle (HO^{\bullet}) à la chaîne polyène pour former un adduit avec les caroténoïdes ($ROO-Car-ROO$).

I.2.6.6 Types de caroténoïdes

A l'heure actuelle, les principaux caroténoïdes d'intérêt sur le marché sont le β -carotène, l'astaxanthine, la lutéine (avec la zéaxanthine), le lycopène et la canthaxanthine. La fucoxanthine est un autre caroténoïde qui peut être produit par les microalgues. Bien qu'elle ne constitue pas une part importante du marché, la fucoxanthine a été commercialisée en tant qu'aliment fonctionnel anti-obésité et pour ses activités anticancéreuses et anti-inflammatoires potentielles (Heo et *al.*, 2010).

a. L'astaxanthine

Reconnue pour la couleur rosâtre des poissons aquatiques et des crevettes, l'astaxanthine présente une activité antioxydante plusieurs fois plus forte que la vitamine E et le β -carotène : c'est l'antioxydant le plus puissant des caroténoïdes. Il a le potentiel d'améliorer la production d'anticorps, d'agir comme un anti-vieillessement, de protéger du soleil, comme il montre également des effets anti-inflammatoires lorsqu'il est administré avec de l'aspirine (Li et *al.*, 2011).

b. Le β -carotène

Responsable de la prévention de l'accumulation des toxines dans le foie, de l'amélioration potentielle du système immunitaire, le β -carotène a un rôle préventif contre les maladies oculaires comme la cécité nocturne et la cataracte (Dufossé et *al.*, 2005). Cependant, des études récentes ont relié l'apport à long terme de β -carotène à un risque accru d'apparition de cancer ainsi qu'à un taux de mortalité accru (Liu, 2013).

c. La lutéine et la zéaxanthine

Ces deux bioproduits deviennent également de plus en plus importants sur le marché des nutraceutiques puisqu'ils sont maintenant reconnus comme ayant un rôle important dans la santé oculaire (Manayi et *al.*, 2015). En tant que pigment prédominant dans la macula, la lutéine a prouvé cliniquement qu'elle prévenait la cataracte et la dégénérescence maculaire. Ces composés peuvent également fonctionner comme de puissants antioxydants pour réduire les risques d'environ 60 maladies chroniques (Ye et *al.*, 2008). En général, ces deux xanthophylles ne sont pas considérées comme toxiques et sont relativement sans danger pour la consommation humaine.

d. La canthaxanthine

Ce pigment peut protéger les personnes contre certaines maladies du sang. Cependant, il a été signalé qu'il était peut-être dangereux dans la consommation quotidienne et peut potentiellement causer la cécité ou une anémie aplasique lorsqu'il est consommé en grande quantité dans le but de créer une couleur bronzée de la peau (Zhang et *al.*, 2014).

e. La fucoxanthine

La fucoxanthine, le caroténoïde le plus abondant, représentant près de 10% du total des caroténoïdes sur terre, La fucoxanthine est étroitement organisée avec la chlorophylle a, les protéines d'antennes, les diadinoxanthines et les diatoxanthines formant un complexe fucoxanthine-chlorophylle a / C-protéine (FCP); c'est un complexe collecteur de lumière qui capture les photons et les transfère au centre des réactions photosynthétiques (Wang et *al.*, 2019).

La composition pigmentaire du complexe FCP diffère de celle du complexe de collecte de lumière chez les plantes terrestres et les algues vertes où la chlorophylle b et la lutéine fonctionnent respectivement comme pigment accessoire et caroténoïde (Joshi-Deo et *al.*, 2010). Outre les rôles fondamentaux de la fucoxanthine dans la photosynthèse et la photoprotection, elle détient un large spectre de bioactivités, telles que des activités antioxydantes, anti-obésité, antidiabétiques et anti-inflammatoires, et montre également des effets thérapeutiques et préventifs sur divers types de cancers et de tumeurs (M'eresse et *al.*, 2020).

La recherche sur les bienfaits pour la santé de la fucoxanthine dans la prévention des maladies ainsi que sur les applications dans les industries alimentaires et cosmétiques a été revue récemment (Bae et *al.*, 2020 ; Xiao et *al.*, 2020 ; Lourenço-Lopes et *al.*, 2021). Avec un marché en croissance, il a été estimé que le prix de la fucoxanthine s'est élevé de 40 000 à 80 000 US \$ kg⁻¹ (Abu-Ghosh et *al.*, 2021). La fucoxanthine a été autorisée ou est considérée comme nutraceutique par les autorités correspondantes dans différents pays et dans l'Union Européenne (Abu-Ghosh et *al.*, 2021).

I.2.6.7 Purification des caroténoïdes

La méthode actuelle de purification des caroténoïdes est développée sur la base de la méthode Willstatter (Burdick, 1956). Les solvants organiques sont utilisés pour la séparation des caroténoïdes après saponification pour la solution contenant les caroténoïdes bruts.

Après extraction des microalgues, de la soude caustique ou de la potasse sont généralement ajoutés à l'extrait des microalgues comme agents de saponification afin de libérer les caroténoïdes de leur forme ester naturelle. Dans cette étape, la température est généralement maintenue en dessous de 60 °C pour éviter la dégradation des caroténoïdes (Yuan et Chen, 2000). Les conditions de saponification telles que le temps, la température, et la concentration alcaline, en tant que facteurs affectant le rendement, a été étudié dans de nombreuses études. Les concentrations du KOH variant de 2,5 à 40 % sont le plus souvent utilisées réagissant pendant des heures à des températures en dessous de 60 °C. Les solvants sont ensuite concentrés pour une purification ultérieure, une recristallisation ou pour la chromatographie et peuvent être utilisés pour purifier davantage le produit brut. En raison de la présence d'eau résiduelle dans le solvant organique, le Na₂SO₄ peut être ajouté puis filtré en tant que Na₂SO₄·(H₂O)₂ pour éliminer les traces d'eau (Nobre et *al.*, 2006).

Le processus décrit de purification en plusieurs étapes prend du temps et nécessite une grande quantité de solvants. Des méthodes de purification plus avancées ont été également rapportées tels que l'absorption sélective de la lutéine sur la phase solide ; la chromatographie sur colonne (Fernández-Sevilla et *al.*, 2010) ; et l'HPLC en phase inverse ou chromatographie à contre-courant à grande vitesse pour une petite quantité de caroténoïdes de haute pureté (Li et *al.*, 2006).

I.2.6.8 Stabilité au stockage

La dégradation des caroténoïdes est catalysée par l'oxygène et la lumière et est également accélérée par la chaleur (Shen et Quek, 2014). Dias et al. (2014) ont étudié la stabilité des caroténoïdes à long terme. L'atmosphère inerte, les températures basses (-20 °C), la faible luminosité et la présence d'hydroxytoluène butylé (BHT) comme antioxydant sont des conditions appropriées pour le stockage des caroténoïdes jusqu'à 6 mois.

I.2.6.9 Marché et économie des caroténoïdes

En raison de la couleur vibrante et des propriétés de renforcement de la santé liées aux antioxydants, la forte demande en caroténoïdes a augmenté ces dernières années. Parmi les dix meilleurs caroténoïdes commercialisés, le β-carotène, la lutéine, l'astaxanthine et la canthaxanthine pourraient être efficacement produites par des microalgues (Zaghdoudi et *al.*, 2015).

À ce jour, deux histoires à succès de commercialisation des caroténoïdes produites à partir des microalgues sont connues, à savoir : l'astaxanthine d'*H. pluvialis* et le β -carotène de *D. salina*. Le coût de l'astaxanthine synthétique est supérieur à 1000 \$/kg, tandis que le prix de vente est estimé au double de ce prix (Li et al., 2011). Le coût de production de l'astaxanthine à partir de microalgues a été estimé à 718 \$/kg, alors qu'il peut être encore diminuée en réduisant le coût des microalgues selon Kleinegris et al. (2011). En plus de l'augmentation du taux de production et de la teneur en pigment, quelques tentatives ont été menées pour réduire son coût. Actuellement, les étapes de récolte et d'extraction représentent le goulot d'étranglement pour réduire davantage le coût de la production des caroténoïdes (Barba et al., 2015). De plus, l'acceptation par les consommateurs de nouveaux aliments fonctionnels pourrait également affecter le développement du marché des caroténoïdes des microalgues.

1.2.6.10 Avantages et inconvénients des microalgues comme source de caroténoïdes

Les microalgues ont le potentiel de servir de réservoir naturel de produits biochimiques avec un potentiel de santé varié. Par rapport aux plantes supérieures, les microalgues ont un taux de croissance plus rapide. Les microalgues, en particulier les souches appartenant aux chlorophytes, telles que *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis* et *Chlorella pyrenoidosa* ont été développées avec succès dans la production en masse du β -carotène, de l'astaxanthine, de la canthaxanthine, de la lutéine et d'autres caroténoïdes.

Par rapport aux plantes supérieures, les microalgues ont généralement une plus grande teneur en caroténoïdes spécifiques (mg/g). La teneur en lutéine des fleurs de souci est généralement de 0,3 mg / g, tandis que pour les microalgues, elle est généralement supérieure à 4 mg/g (Ho et al., 2014). L'astaxanthine et le β -carotène ont été rapportés à plus de 50 mg/g dans des conditions de stress spécifiques de culture pour les microalgues (Kyriakopoulou et al., 2015). Les microalgues ont également une teneur en caroténoïdes plus élevée que les macroalgues comme source alternative. Par exemple, certaines microalgues ont une teneur jusqu'à 15 fois plus en fucoxanthine (18,23 mg/g) que les algues productrices prédominantes (Gómez-Loredo et al., 2015).

La production de caroténoïdes à partir des microalgues demande moins de main-d'œuvre que les plantes supérieures car elle ne nécessite pas de coupe, de séchage et les nombreuses autres opérations agricoles courantes. De plus, certains pigments comme

l'astaxanthine sont rarement trouvés dans les plantes supérieures, ce qui fait des microalgues une source polyvalente de caroténoïdes.

1.2.6.11 Défis actuels et perspectives d'avenir

La mise en place d'une filière industrielle verte et durable est devenue l'objectif de développement de l'industrie des caroténoïdes. Des innovations technologiques majeures ont permis aux micro-organismes de fournir des produits industriels à haut rendement qui ne pouvaient pas être synthétisés ou dont les rendements étaient faibles, tels que l'ingénierie enzymatique et l'ingénierie métabolique, la mutagenèse traditionnelle et la biotechnologie moderne, la régulation des processus biologiques et de fermentation, la synthèse et les transformations du génome microbien, synthèse de la biotechnologie synthétique et de la vie artificielle. Bien que le cycle de production des caroténoïdes naturels à partir de micro-organismes soit court, et le rendement élevé, les problèmes suivants se posent toujours :

- 1- Le coût de production est élevé et ne peut concurrencer les méthodes traditionnelles de synthèse chimique ;
- 2- les micro-organismes sont faciles à dégrader et nécessitent un contrôle et un entretien stricts du processus de culture ;
- 3- le mécanisme de régulation des gènes clés nécessite une étude plus approfondie.

Afin de résoudre les problèmes mentionnés ci-dessus, des souches des microorganismes ayant un haut rendement en caroténoïdes peuvent être obtenues par des moyens biotechnologiques modernes.

Les directives de recherche spécifiques comprennent :

- 1- Des méthodes de biologie synthétique peuvent être utilisées pour améliorer l'activité des enzymes clés pour produire les métabolites requis par le métabolisme synthétique. Grâce à des méthodes de biologie synthétique, des souches avec des cycles de production courts et des caroténoïdes à haut rendement peuvent être synthétisées de manière hétérogène. De plus, l'ingénierie métabolique des microalgues est généralement facilitée par la discipline de la biologie synthétique, qui suit le système de construction d'assemblage, de résultats d'analyse et d'amélioration des cycles de conception ultérieurs (Lin et *al.*, 2019) ;
- 2- le développement ultérieur de multiples combinaisons de bioinformatique, génome, transcriptome, protéome, métabolome et analyse de données dans les micro-organismes

réalisera une puissante plate-forme de génie génétique pour atteindre des taux de croissance et un rendement plus élevé en caroténoïdes, ce qui aidera les futures applications industrielles (Lin et *al.*, 2019) ;

3- des progrès significatifs ont été réalisés dans l'ingénierie métabolique et la biologie des systèmes, mais en raison des contraintes économiques, le domaine de l'informatique a réduit l'écart entre l'ingénierie métabolique et la biologie synthétique. Les progrès des outils mathématiques et de la bioinformatique aideront à concevoir des stratégies d'ingénierie métabolique pour améliorer la production de caroténoïdes et d'autres métabolites secondaires (Sankari et *al.*, 2018) ;

4- le développement de nouvelles boîtes à outils pour modifier la morphologie microbienne afin de répondre aux besoins industriels. Cette étape consiste principalement à rechercher des gènes cibles à partir de voies métaboliques via une plate-forme d'information biologique, puis à établir une technologie systématique d'édition de gènes et des outils métaboliques pour un développement à haut débit. Cependant, toute souche génétiquement modifiée doit être soigneusement vérifiée avant son utilisation (Wurtzel. 2019) ;

5- pour la technologie de culture microbienne, il est nécessaire de concevoir à l'avenir une technologie de micro-bioréacteur afin de réduire le coût et la durée du processus biologique, et de produire des caroténoïdes et des produits bénéfiques pour la santé humaine à grande échelle.

Le développement d'une technologie durable de culture d'algues à grande échelle devrait être conçu pour augmenter la productivité des caroténoïdes grâce à un système de contrôle biologique photosynthétique. De plus, afin de produire des caroténoïdes hautement actifs, leur stabilité ne doit pas être négligée lors de l'extraction et du stockage. En aval le traitement est confronté à d'énormes défis, en particulier la récolte et la perturbation des cellules. Il est important de noter que de nouvelles méthodes d'extraction peuvent fournir des orientations importantes pour de futures recherches, comme les solvants verts. Si les solvants non toxiques peuvent être étudiés et l'activité biologique peut être conservée, cette méthode peut avoir un bon potentiel.

I.2.7 Composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires produits par les plantes, les microalgues et les macroalgues. Les composés phénoliques sont généralement synthétisés pour protéger les cellules contre les rayons ultraviolets et les agents pathogènes.

Le terme « composés phénoliques » englobe toutes les substances avec divers groupes phénols et substituants hydroxyles dans leur structure chimique et sont également connus sous le nom d'hydroxybenzène. Ces molécules partagent des propriétés similaires aux phytostérols, cependant, elles sont particulièrement efficaces dans le piégeage des radicaux en raison de leur propriétés biologiques variées. En effet, même si l'oxygène est essentiel à la vie, il peut avoir un impact négatif sur les organismes vivants en induisant un stress oxydatif dans les cellules, qui est une cause majeure de plusieurs cancers (Sansone et Brunet, 2019). Ces molécules fournissent des antioxydants biologiques qui présentent un intérêt particulier dans la recherche anticancéreuse, antidiabétique et anti-inflammatoire (Galasso et *al.*, 2019).

I.2.7.1 Classification des polyphénols

Sur la base du nombre de cycles phénoliques et d'éléments de conjugaison de ces cycles, les polyphénols peuvent être classés en quatre groupes (Fig. I.5), comprenant les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (Manach, 2004). Parmi eux, les acides phénoliques et les flavonoïdes sont les plus courants (Dykes et Rooney, 2007).

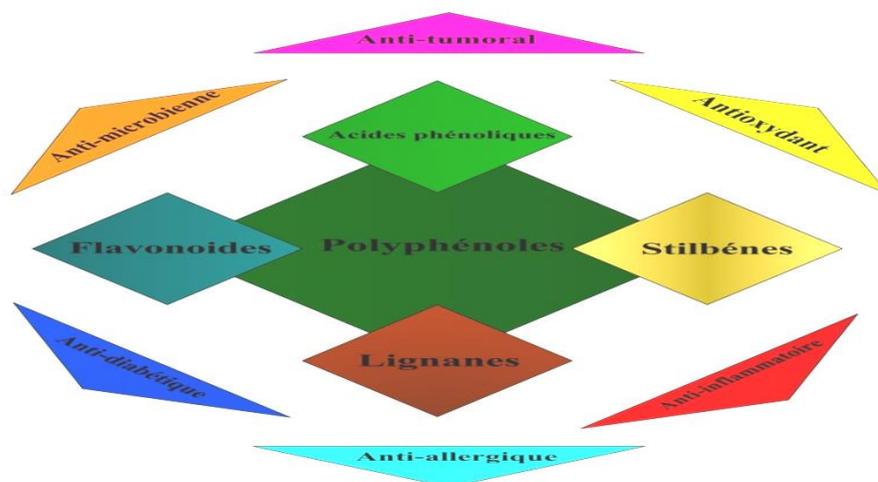


Figure I. 5: Classification et activités biologiques des polyphénols

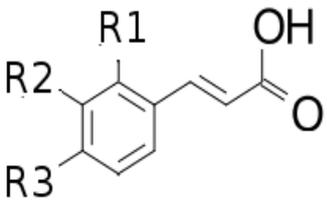
a. Acides phénoliques

Les acides phénoliques naturels ont deux charpentes carbonées distinctes, qui existent uniquement sous forme d'acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique, sous forme conjuguée ou libre (Nooshkam et *al.*, 2020).

b. Acides hydroxycinnamiques

Dérivant de l'acide cinnamique, ils ont une structure générale de base de type (C6-C3), existant souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau I.2 représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

Tableau I. 2: Les principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide ferulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

c. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (Tab. I.3). On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique. Le principal composé est l'acide gallique dont la teneur est comprise entre 100 et 230 mg/kg (Banwo et *al.*, 2021).

Tableau I. 3: Les principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	A. benzoïque
	H	H	OH	H	A. p hydroxy - benzoïque
	H	OH	OH	H	A. protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	A. vanillique
	H	OH	OH	OH	A. gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	A. syringique
	OH	H	H	H	A. salicylique
	OH	H	H	OH	A. gentisique

d. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et *al.*, 2006). À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et *al.*, 2001). Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams. 2000). Les chercheurs ont accordé beaucoup d'attention aux implications des flavonoïdes pour la santé en raison des preuves fournies par les études épidémiologiques sur leurs nombreux avantages pour la santé. Leur structure est largement représentée par un squelette carboné C6-C3-C6, qui peut se présenter sous forme d'aglycones et de glycosides (Natalello et *al.*, 2020).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Il existe six grandes sous-classes de flavonoïdes alimentaires, selon les caractéristiques des aglycones qui comprennent: (1) des anthocyanidines (cyanidine, delphinidine, malvidine,

péonidine, pétunidine et pélargonidine), (2) flavanones (hespéridine, ériodictyol et naringénine), (3) flavones (lutéoline et apigénine), (4) isoflavones (daidzéine, génistéine et glycitéine), (5) flavan-3-ols (épigallocatechine, épicatechine, catéchine, galocatechine, épicatechine-3-gallate, théaflavine 3'-gallate, théarubigines, théaflavine 3-3'-digallate et théaflavine) et (6) flavonols (Quercétine, kaempférol, myricétine et L'isorhamnétine) (Banwo et *al.*, 2021).

I.2.7.2 Rôle des composés phénoliques totaux

L'intérêt pour les polyphénols naturels est attribuable à leurs activités biologiques attractives (Ejima et *al.*, 2014). Les polyphénols présentent des propriétés antioxydantes (Carloni et *al.*, 2013) antiallergiques (Magrone et Jirillo, 2012), antibactériennes (Yi et *al.*, 2014), anti-inflammatoires (Kim et *al.*, 2013), antitumorales (Davalli et *al.*, 2012; Anantharaju et *al.*, 2016), antidiabétiques (Lin et *al.*, 2016) et antivirales (Yang et *al.*, 2014).

Les espèces réactives à l'oxygène/azote (ROS/RNS) sont générées dans le processus du métabolisme cellulaire. Les RNS peuvent créer un stress oxydatif et endommager les biomolécules précieuses, telles que les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant le vieillissement cellulaire et diverses maladies dégénératives (Lin et *al.*, 2016).

I.2.7.3 Activité antioxydante des polyphénols

Les polyphénols sont classés comme antioxydants primaires et possèdent la capacité de piéger les radicaux libres (ROS/RNS) via le mécanisme de transfert d'atomes d'hydrogène (Shahidi et Ambigaipalan. 2015) (Fig. I.6). La capacité antioxydante des polyphénols est principalement due à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs dans les réactions d'oxydation. Les formes quinones oxydées des polyphénols peuvent subir des réactions avec divers groupes fonctionnels, y compris l'amine et le thiol, via l'addition de Michael ou la réaction de base de Schiff (Ding et *al.*, 2016 ; Yang et *al.*, 2016).

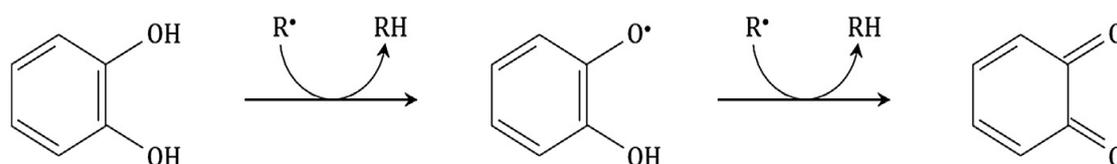


Figure I. 6: Schéma général du piégeage des radicaux par les composés phénoliques.

(R représente un anion superoxyde, un peroxyde, un alcoxyde ou un radical hydroxyle).

I.2.7.4 Mode d'action des polyphénols

Les polyphénols présentent des propriétés chimiques et physiques intéressantes. Les polyphénols contiennent d'abondants groupes hydroxyles phénoliques, qui pourraient agir comme donneurs dans la liaison hydrogène. Les anneaux aromatiques des polyphénols pourraient interagir avec les sites hydrophobes des molécules substrats via des interactions hydrophobes (Zhou et *al.*, 2012). L'électronégativité des atomes d'oxygène dans les hydroxyles aromatiques ou la dissociation des hydroxyles aromatiques pourrait permettre aux polyphénols de participer à des interactions électrostatiques avec des molécules chargées positivement (Ernel-unal et Sukhishvili. 2008).

Les ortho-dihydroxyles aromatiques dans les polyphénols peuvent se complexer avec les acides boroniques pour former des boronate-esters sensibles au pH (Guo et *al.*, 2015), tandis que les hydroxyles aromatiques déprotonés possèdent une densité de charge élevée et peuvent servir de chélateurs de métaux pour générer des complexes de coordination métal-polyphénol sensibles au pH (Guo et *al.*, 2014). Les hydroxyles aromatiques peuvent réagir avec les acides carboxyliques via l'estérification et les halogénures/époxydes d'alkyle via l'éthérification (Liu et *al.*, 2014).

I.2.7.5 Présence et rôle dans les microalgues

Généralement, les composés phénoliques ont été associés aux plantes, bien que leur description dans les algues manque encore d'informations et reste concentrée sur les macroalgues plutôt que sur les microalgues. Les données existantes sur les composés phénoliques des algues comprennent les phlorotannins tels que les fucols, les phloréthols, les fucophloréthols, les fuhalols et les phlorotannins halogénés et sulfités présents dans les algues brunes, en plus de la rutine, de l'héspéridine, de la morine, de l'acide caféique, du catéchol, de la catéchine et du gallate d'épigallocatechine détectés dans certaines macroalgues rouges. (Ibañez et Cifuentes. 2013). Chez les microalgues, les polyphénols ont jusqu'à présent reçu peu d'attention (Goiris et *al.*, 2015), bien que seuls quelques rapports sur les microalgues vertes aient été publiés, apportant un aperçu du potentiel des espèces étudiées pour la production de polyphénols (Kováčik et *al.*, 2010 ; López et *al.*, 2015 ; Zakaria et *al.*, 2017). De plus, la présence de phénols simples (Klejdus et *al.*, 2009), ainsi que de flavonoïdes dans les microalgues a été reconnue, mais à de faibles niveaux (Goiris et *al.*, 2014).

*Chapitre II : Les
méthodes
d'extraction des
composés bioactifs
de la spiruline*

II.1 Introduction

Les avancées technologiques récentes et le développement de nouvelles méthodes pour l'amélioration de la production, la détection, la séparation et / ou la caractérisation ont révolutionné le criblage des composés bioactifs naturels (CBN) et ont permis d'obtenir des extraits naturels qui pourraient être potentiellement utilisés (Wang et Weller. 2006). Des exemples de ces technologies comprennent principalement l'ingénierie métabolique et les méthodes pour optimiser l'isolement de ces espèces moléculaires.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'extraction, les plus importants sont la méthode de rupture cellulaire, le type de solvant, le rapport solvant / biomasse et le temps d'extraction. Cependant, il est important d'étudier les facteurs affectant l'extraction en tant que groupe afin d'optimiser le processus, de minimiser les coûts et d'optimiser le rendement (Moraes et *al.*, 2008). Parmi les techniques d'extraction classiques appliquées aux espèces de microalgues, on peut citer la macération/diffusion, l'extraction au Soxhlet, exprimée à différentes températures et pressions. Cependant, les techniques conventionnelles ne sont pas très efficaces, plutôt coûteuses et nécessitent un temps de traitement long. Pour le traitement à des températures élevées, le risque de dégradation des biomolécules extraites ne peut être exclu. De plus, des procédures coûteuses de déshydratation et de séchage préliminaires sont généralement nécessaires pour extraire les constituants hydrophobes des microalgues (Safi et *al.*, 2014).

Récemment, plusieurs revues ont traité de la perturbation cellulaire des microalgues en bio-raffineries (Günerken et *al.*, 2015). Les techniques existantes peuvent être grossièrement divisées en méthodes chimiques, enzymatiques, mécaniques et autres méthodes physiques (ultrasons, micro-ondes, champs électriques pulsés, décharges électriques à haute tension...etc.).

II. 2 Définition de l'extraction verte

Une définition générale de la chimie verte est l'invention, la conception et l'application de produits chimiques et de procédés pour réduire ou éliminer l'utilisation et la génération de substances dangereuses. En ce qui concerne l'extraction verte de produits naturels, cette définition peut être modifiée comme suit : « L'extraction verte est basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction qui réduiront la consommation d'énergie, permettront l'utilisation de solvants alternatifs et de produits naturels renouvelables et garantiront un extrait / produit sûr et de haute qualité » (Chemat et *al.*, 2012).

Trois solutions majeures ont été identifiées pour concevoir et mettre en place l'extraction verte à l'échelle du laboratoire et de l'industrie afin d'approcher une consommation optimale des matières premières, de solvants et d'énergie :

- 1- L'amélioration et l'optimisation des procédés existants ;
- 2- l'utilisation d'équipements spécifiques;
- 3- l'innovation dans les procédés et les procédures mais aussi dans la découverte de solvants alternatifs.

II. 3 Principes de l'extraction verte

La liste des « six principes de l'extraction verte des produits naturels » doit être considérée pour l'industrie et les scientifiques comme une orientation pour établir un label, une charte et une norme innovantes et vertes. C'est aussi une réflexion pour innover non seulement dans les processus mais aussi dans tous les aspects de l'extraction solide-liquide. Les principes ont été identifiés et décrits non pas comme des règles mais plutôt comme des exemples innovants à suivre, découverts par des scientifiques et appliqués avec succès par l'industrie (Chemat et *al.*, 2012).

Principe 1 : L'innovation par la sélection de variétés et l'utilisation de ressources naturelles renouvelables;

Principe 2 : Utilisation de solvants alternatifs fait principalement d'eau ou d'agro-solvants;

Principe 3 : Réduire la consommation d'énergie par la récupération d'énergie et l'utilisation de technologies innovantes;

Principe 4 : Production de co-produits au lieu de déchets pour inclure le bio- et l'agro-raffinage industriel;

Principe 5 : Réduire les opérations unitaires et privilégier des procédés sûrs, robustes et maîtrisés;

Principe 6 : Viser un extrait non dénaturé et biodégradable sans contaminants.

II. 4 Classification des méthodes d'extraction des composés bioactifs de la spiruline

Depuis des temps immémoriaux, l'humanité a trouvé des moyens de récupérer des composés précieux à partir des ressources naturelles. L'extraction peut être considérée comme un tremplin dans les procédures analytiques et le développement ultérieur du produit.

II. 4.1 Extraction humide

Les méthodes d'extraction par voie humide ont été développées pour surmonter les pertes dues à de la forte consommation d'énergie. Les effets des algues humides sur l'efficacité de l'extraction ne sont pas encore clairs. D'un côté, l'hypothèse est que la présence d'eau résiduelle va nuire à l'efficacité de l'extraction car l'eau forme une barrière qui interdit le transfert de masse du solvant de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Soh et Zimmerman (2011) ont étudié l'effet de la teneur en humidité (jusqu'à 20%) sur l'efficacité d'extraction ; aucun changement évident n'a été observé dans leur étude. Contrairement à l'extraction par le solvant supercritique, les méthodes de rupture mécanique des cellules et l'extraction par solvant sont très efficaces avec l'extraction humide. Sarada et al. (1999) ont également conclu que l'utilisation de la biomasse fraîche peut réduire jusqu'à 50 % la perte en pigment au cours du processus de séchage.

La lyophilisation est la méthode de séchage préférée en raison de ses conditions douces par rapport au séchage par pulvérisation ou au four, qui conduisent souvent à la dégradation des produits thermosensibles et à la perte de lipides volatils couplés à la granulométrie non uniforme.

II. 4.2 Extraction conventionnelle par solvant

L'extraction par solvant conventionnelle est peu coûteuse et facile à étendre, le souci est que ces processus peuvent prendre beaucoup de temps, nécessiter un traitement supplémentaire comme l'évaporation pour concentrer l'extrait et utiliser une grande quantité de solvants, ce qui entraîne une charge environnementale, donc d'autres méthodes d'extraction plus avancées doivent être développées (Halim et al., 2012).

Les mélanges binaires Chloroforme/méthanol, Hexane/ Isopropanol, l'éthanol et d'autres solvants ont été largement utilisés pour une extraction efficace (Sicaire et al., 2014). Les méthodes de Bligh et Dyer ainsi que celles au Soxhlet sont les plus souvent adoptées dans le génie chimique à petite échelle comme méthode d'extraction (Peña et al., 2015).

Les principes et considérations opérationnelles du solvant d'extraction des lipides ou des produits bioactifs à partir des microalgues ont été largement examinés, mais peu se sont concentrés spécifiquement sur l'extraction des caroténoïdes (Gil-Chávez et al., 2013).

II. 4.3 Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) a été bien illustrée dans la littérature pour la récupération de composés précieux à partir de microalgues (Patil et *al.*, 2013). Les fluides supercritiques ont une densité similaire aux fluides, mais une viscosité similaire à celle du gaz. Les forces de haute pression supercritiques liquide dans les cellules améliorent grandement le transfert de masse, donc le temps d'extraction peut être beaucoup plus court que pour l'extraction par solvant conventionnelle. En effet, Halim et *al.* (2012) ont rapporté qu'un traitement au SFE de huit minutes aurait de meilleurs résultats d'extraction que 5,5 h d'extraction conventionnelle par solvant.

Dans l'extraction au fluide supercritique, l'utilisation des solvants chimiques est minimisée ou éliminée. Le CO₂, pour son prix relativement peu coûteux, sa sécurité, sa non-toxicité et son inertie chimique ainsi que sa température critique appropriée, est devenu le solvant le plus populaire. Dans ce cas, l'extrait peut être facilement séparé du solvant si aucun co-solvant n'est ajouté car le CO₂ est gazeux dans les conditions normales. L'inconvénient du CO₂ comme solvant supercritique est sa faible polarité ce qui ne convient pas à l'extraction des composés polaires. Pour compenser cela, des co-solvants polaires peuvent être ajoutés, l'éthanol est un bon choix pour l'extraction des caroténoïdes en raison de sa polarité appropriée et sa non toxicité ; de plus, il est miscible au CO₂ et est homologué à usage nutraceutique et pharmaceutique. L'ajout de co-solvants peut ne pas être intéressant en termes d'extraction par séparation puisque l'éthanol est liquide à température ambiante. Pendant ce temps, l'ajout modifierait le point critique du mélange, nécessitant des conditions plus dures (Reverchon et De Marco, 2006).

II. 4.4 Extraction assistée par le plasma froid

L'extraction assistée par plasma froid est considérée comme une technologie verte émergente pour la récupération des composés naturels. Le plasma froid est un gaz partiellement ionisé composé d'ions, d'électrons, de photons ultraviolets et de radicaux neutres réactifs, tels que les molécules excitées et à l'état fondamental, produites à partir de l'application d'un champ électrique ou magnétique à un agent stérilisant (Bao et *al.*, 2020).

Dans l'extraction assistée par le plasma froid, le refroidissement des ions et des molécules non chargées est considéré comme plus efficace que le transfert d'énergie des électrons et le milieu reste à basse température, caractérisant cette technologie comme non thermique (Segat et *al.*, 2016).

L'extraction assistée par plasma froid peut être opérée à des pressions atmosphériques ou basse pression et ne nécessite donc pas de chambre de réaction coûteuse pour réguler la pression et la température (Rashid et *al.*, 2020). De plus, l'extraction assistée par plasma froid est considérée comme une technologie abordable avec une faible consommation d'énergie (allant de 15 à 900 W pour une utilisation à l'échelle du laboratoire) (Bao et *al.*, 2020).

II. 4.5 Extraction assistée par la congélation /décongélation

La rupture cellulaire peut être obtenue par des cycles de congélation et de décongélation de la biomasse algale. Habituellement, une suspension de biomasse de cyanobactéries dans un solvant (généralement de l'eau ou un tampon) est congelée à -18 °C pendant 12 à 24 h, puis décongelée à température ambiante pendant encore 12 à 24 h, ce qui correspond à un cycle de traitement.

II. 4.5.1 Principe

L'utilisation de cycles répétés conduit à la rupture des cellules en raison de la formation de gros cristaux de glace lors de la congélation et du gonflement suivi du rétrécissement des cellules lors de la décongélation. Même s'il s'agit d'une technique simple, elle est considérée comme très efficace pour l'extraction de la C-PC à partir de *S. platensis* (Sarada et *al.*, 1999 ; Ores et *al.*, 2016 ; Zheng et *al.*, 2020), et donc cette méthode est encore largement appliquée à l'échelle du laboratoire pour obtenir cette biomolécule même à partir d'autres cyanobactéries (Tavanandi et *al.*, 2019).

II. 4.6 Extraction assistée par les enzymes (EAE)

La spécificité de l'enzyme a été exploitée pour l'extraction de composés précieux à partir de plusieurs ressources naturelles. La méthode d'extraction assistée par les enzymes relève de la catégorie des technologies d'extraction vertes car elle présente l'avantage d'être respectueuse de l'environnement.

L'extraction assistée par les enzymes est affectée par un certain nombre de facteurs, notamment le pH du milieu, la température, le temps de traitement et la sélection des enzymes. Le choix de la bonne enzyme garantit l'extraction de composés spécifiques à partir d'une matrice complexe (Picot-Allain et *al.*, 2021).

II. 4.6.1 Principe

Le mécanisme possible de l'hydrolyse de la paroi cellulaire implique la formation du complexe enzyme-substrat, modifiant ainsi la conformation de l'enzyme de sorte que le substrat s'adapte bien à son site actif et permet une meilleure interaction avec l'enzyme. De tels changements conformationnels développent des contraintes sur le substrat, entraînant la rupture des liaisons de la paroi cellulaire (Sheldon et van Pelt, 2013).

Étant donné que cette technique d'extraction, plus verte, nécessite des conditions de température contrôlées ; elle trouve une large application dans l'extraction des composés thermosensibles tels que les pigments, les arômes, les huiles, etc. Cependant, l'application d'un complexe enzymatique spécifique désintègre la liaison des matériaux inutiles et permet la libération de composés sélectifs dans un milieu aqueux, améliorant ainsi la qualité du produit.

II. 4.6.2 Avantages de l'extraction assistée par les enzymes

Les techniques d'extraction assistées par les enzymes se sont avérées avoir un avantage sur les méthodes conventionnelles en termes de faible consommation d'énergie, de récupération des composants bioactifs plus élevée, avec une élimination sélective des composés indésirables du substrat.

Les autres avantages de la méthode d'extraction assistée par les enzymes comprennent une efficacité catalytique élevée, la préservation de l'efficacité originale des produits naturels et une réduction de la consommation du solvant. Cependant, malgré plusieurs avantages, la technique de l'EAE n'est pas largement utilisée en raison de son temps de traitement prolongé qui varie de 1 à 48 h, et de l'utilisation supplémentaire de procédés de séparation tels que la filtration et la centrifugation de l'extractant qui augmente encore les coûts. De plus, la disponibilité limitée des enzymes à l'échelle commerciale limite le développement de telles techniques d'extraction.

II. 4.7 Fraisage/ Broyage aux billes

II. 4.7.1 Définition et Principe

Le broyage à billes est une méthode de rupture cellulaire mécanique qui utilise une vitesse élevée, dès lors les billes entrent en collision avec les cellules qui sont perturbées par les forces de cisaillement générées par les collisions, le frottement entre les billes ou par la turbulence (Garcia et al., 2019). En raison de l'efficacité élevée de la rupture, le broyage des billes est fréquemment utilisé comme contrôle positif dans les études d'extraction à partir des

microalgues. Par conséquent, il a été utilisé pour déterminer la quantité totale de C-PC sur les cyanobactéries (Kaferbock et *al.*, 2020).

Bien que les études d'optimisation du broyage aux billes pour les cellules de spiruline n'aient pas été trouvées, l'influence des paramètres de traitement sur d'autres perturbations cellulaires de microalgues a été évaluée. Les conditions optimisées varient en fonction des caractéristiques de la cellule, de la viscosité moyenne et du débit. Par conséquent, l'interaction entre les paramètres est difficile à prévoir (Montalescot et *al.*, 2015).

Les billes sont normalement composées de verre, de zirconium, de céramique et d'acier, et la désintégration cellulaire peut être favorisée avec de petites billes (0,2 – 0,6 mm) en raison de l'augmentation du nombre de collisions (Garcia et *al.*, 2019). Il est rapporté que l'effet de la densité des billes sur la rupture des cellules peut être lié à la viscosité moyenne ; les billes à faible densité (verre) sont meilleures que les billes à haute densité (zircone), pour les milieux à haute viscosité (Günerken et *al.*, 2015).

II. 4.8 Extraction assistée par les ultrasons (EAU)

En tant que technologie verte, l'ultrasonication a attiré l'attention des chercheurs pour son application dans les industries agro-alimentaires et les industries annexes. Les ultrasons agissent en créant une compression et une décompression par ondes sonores à une fréquence > 20 kHz (Chemat et *al.*, 2011).

II. 4.8.1 Mécanisme d'action des ultrasons

Plusieurs mécanismes d'action des ultrasons ont été identifiés, parmi lesquels: la fragmentation, l'érosion, l'effet sonocapillaire, la sonoporation, la contrainte de cisaillement local et la destruction-détexuration de la matrice de la paroi cellulaire végétale (Chemat et *al.*, 2016).

Un effet global de ces mécanismes entraîne une perturbation de la paroi cellulaire. Cependant, l'ampleur relative de la contribution d'un mécanisme donné peut varier selon le type de biomasse et les paramètres du processus. En utilisant des ultrasons, il est possible d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés à moindre temps (Wang et *al.*, 2015) et souvent à des températures plus basses, ce qui convient mieux aux composés thermosensibles (Humbert et *al.*, 2001).

L'effet des ultrasons est attribué à des tourbillons de micro-échelle et à un transfert de masse accru, produits par la cavitation et l'effondrement de bulles pouvant induire un stress sur les cellules de microalgues. Cela peut s'expliquer par le fait que les ultrasons induisent une

rupture cellulaire en exposant les microalgues à l'intensité élevée des ondes ultrasonores, ce qui provoque de minuscules bulles de cavitation instables autour des cellules en milieu liquide. L'implosion de bulles émet des ondes de choc, génère de l'énergie chimique et mécanique, brisant la paroi cellulaire rigide et libérant les composés intracellulaires souhaités dans la solution (Phong et *al.*, 2017).

Dans les processus d'extraction assistée par ultrasons, les rendements les plus élevés ont été observés pour les biomolécules telles que les caroténoïdes provenant des pelures de la grenade (Goula et *al.*, 2017) et les anthocyanes de Blue Berry (Jiang et *al.*, 2017). En outre, les ultrasons présentent l'avantage de l'évolutivité directe en raison de leur capacité à générer des zones de cavitation de plus en plus fortes et donc appropriées pour une mise à l'échelle de ce processus (Peshkovsky et *al.*, 2013).

II. 4.8.2 Avantages de l'extraction assistée par les ultrasons

L'extraction assistée par les ultrasons est une méthode propre qui évite l'utilisation de grandes quantités de solvants et de récipients d'extraction volumineux comme le Soxhlet et la macération. L'impact environnemental réduit des extractions assistées par les ultrasons est clairement avantageux en termes de temps et d'énergie.

L'extraction assistée par les ultrasons est donc proposée comme une méthode d'extraction «respectueuse de l'environnement», adaptée à une extraction en laboratoire, mais pouvant également être transposée à l'échelle pilote et industrielle (Chemat et *al.*, 2016).

II. 4.9 Extraction assistée par le champ électrique pulsé (CEP)

Ces dernières années, de nombreux exemples réussis d'application du champ électrique pulsé (CEP) pour améliorer l'extraction de différents composants précieux à partir de microalgues ont été démontrés.

L'extraction assistée par le CEP pourrait être une autre méthode prometteuse pour l'extraction des composés bioactifs à partir d'algues. Le traitement CEP consiste à placer un matériel végétal ou une suspension biologique entre deux électrodes, ce qui provoque des dommages aux cellules par la rupture transitoire de la membrane cellulaire et mouvement électrophorétique d'espèces chargées entre les compartiments cellulaires induisant la rupture cellulaire. Ces caractéristiques du CEP sont bénéfiques pour l'extraction de substances actives dans les microalgues (Martínez et *al.*, 2017).

II. 4.9.1 Définition du champ électrique pulsé

Le champ électrique pulsé (CEP) est un traitement non thermique de très courte durée (de plusieurs nanosecondes à plusieurs millisecondes). Il a démontré un potentiel élevé d'amélioration de l'extraction de composants précieux à partir de différents objets biologiques (Amiali et Ngadi, 2012). Le traitement par CEP peut être une alternative promettante aux méthodes conventionnelles de la désintégration des cellules.

Le CEP constitue une autre technique dans laquelle les cellules sont exposées à de forts champs électriques pendant des laps de temps très courts. Les impulsions électriques rendent les cellules perméables, impliquant ainsi une augmentation du transfert de matière à travers les membranes. Cette technique peut être appliquée en prétraitement de la biomasse micro-algale avant l'extraction par solvant.

L'exposition des cellules biologiques à de hautes intensités du CEP peut altérer la structure de la membrane cellulaire. A un haut voltage transmembranaire (0.5 - 1 V), l'alignement des phospholipides change, ce qui en résulte une perte de la protection de la membrane qui devient perméable, un phénomène connu sous l'appellation "électroporation" où : "electroperméabilisation" (Goettel *et al.*, 2013).

Selon la littérature, les paramètres majeurs du CEP affectant l'efficacité de l'electropermeabilisation sont (Frey *et al.*, 2013) :

- La puissance du champs électrique;
- le type de pulsation;
- la durée de pulsation;
- le nombre de pulsation employé et l'énergie appliquée.

II. 4.9.2 Mode d'action du champ électrique pulsé

Les premières étapes importantes dans l'application du CEP pour le traitement des matrices biologiques ont été faites il y a environ 50 ans. Dans cette ligne, certains groupes différents ont observé que le traitement par CEP induit une panne électrique des membranes cellulaires, connue sous le nom d'électroporation (Neumann et Rosenheck, 1972 ; Zimmermann *et al.*, 1973).

Cette capacité du CEP à induire une électroporation cellulaire a été utilisée pour tuer les micro-organismes (Hamilton et Sale, 1967). Plus tard, les différentes théories de l'électroporation membranaire ont été élaborés (Pavlin *et al.*, 2008) et l'application du CEP

pour induire des instabilités mécaniques, hydrodynamiques, osmotiques et viscoélastiques ont été démontrées (Pakhomov et *al.*, 2010).

Des travaux expérimentaux ont révélé que l'initiation de l'électroporation nécessite une certaine valeur seuil de la différence de potentiel à travers une membrane, c'est-à-dire le potentiel transmembranaire (u_m), typiquement, 0,5 -1,5 V (Weaver et Chizmadzhev, 1996). La valeur de u_m dépend de la taille et de la forme des cellules ainsi que de la concentration des cellules en suspension ou de la structure et des propriétés des tissus végétaux. Pour les cellules sphériques la valeur de u_m est directement proportionnelle à la taille des cellules.

Les valeurs seuil estimées expérimentalement de l'intensité du champ électrique sont de l'ordre de 100 à 500 V / cm pour les tissus cellulaires avec de grandes cellules (30 - 60 μm) (Lebovka et *al.*, 2016) et comprises entre 3 à 10 kV / cm pour les petites cellules microbiennes ($\approx 1-10\mu\text{m}$) (Barbosa-Canovas et Altunakar, 2006).

Selon le traitement CEP des conditions telles que le temps d'exposition (CEPt), une électroporation réversible avec obturation des pores (d'une durée de quelques secondes à plusieurs heures) et une électroporation irréversible avec un endommagement complet de la membrane pouvant se produire (Pavlin et *al.*, 2008).

Pendant le traitement CEP, la matière à traiter est placée entre deux électrodes et un champ électrique externe est appliqué, ce qui induit le mouvement des ions le long des directions des forces du champ électrique appliqué à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules. Cela provoque l'accumulation d'ions sur les membranes provoquant la polarisation de la cellule (Teissie et *al.*, 1985) qui se traduit par une réduction de l'épaisseur des membranes due aux forces d'attraction entre les ions de charges opposées de part et d'autre de la membrane (forces électro-compressives).

Lorsque la force du champ électrique dépasse la valeur seuil critique du potentiel transmembranaire d'environ 1 volt (Weaver. 2000), ces forces électro-compressives provoquent une panne électrique ou une déformation viscoélastique de la membrane cellulaire qui peut être observée sous forme de pores. Cette rupture électrique ou formation de pores, également connue sous le nom d'électroporation, augmente la perméabilité des membranes (Zimmermann et *al.*, 1976).

En plus de cette explication électromécanique de l'électroporation, une autre théorie explique l'électroporation basée sur la formation de pores hydrophiles à partir de pores hydrophobes dans la membrane. Les pores hydrophobes, qui se forment naturellement en

raison des fluctuations thermiques, dépassent une taille critique et deviennent hydrophiles car ils nécessitent moins d'énergie pour maintenir la structure et sont plus stables dans les conditions. Lorsque le CEP est appliqué, l'énergie nécessaire à la formation de pores est réduite en raison de l'augmentation du potentiel transmembranaire et de l'effet Joule de chauffage, ceci augmente le nombre et la taille des pores et réduit la taille critique. Cette expansion et cette accumulation de pores hydrophiles seraient responsables de l'électroporation (Joshi *et al.*, 2002).

La perméabilisation de la membrane cellulaire peut être réversible ou irréversible dépendant des conditions électriques, pour une extraction efficace des composés intracellulaires, une perméabilisation irréversible de la membrane cellulaire est nécessaire, cette rupture membranaire va promouvoir le relâchement de la matière intracellulaire et faciliter l'accès des solvants à l'intérieur de la cellule (Saulis *et al.*, 2003).

Le relâchement des substances ioniques à travers une membrane perméabilisée est un processus de diffusion, cependant, le temps d'attente est recommandé pour permettre une diffusion suffisante après traitement par CEP (Mercer *et al.*, 2011).

La force du champ électrique pour atteindre l'électroporation dépend de plusieurs facteurs comme les propriétés physicochimiques (si un aliment est liquide, viscoélastique ou solide, et ses caractéristiques diélectriques), les paramètres du processus (température, durée d'impulsion, amplitude et nombre d'impulsions), les paramètres des cellules (type, taille, forme et orientation) et les caractéristiques de la membrane (force ionique, épaisseur et structure) (Toepfl *et al.*, 2014).

Lors d'un traitement CEP à faible intensité, l'électroporation est souvent réversible, cependant, la rupture de la membrane se produit lorsque le rapport entre la taille des pores et la surface de la membrane devient trop grande. Pour la formation irréversible des pores, une force du champ électrique critique de 1–2 kV/cm est requise pour les cellules végétales et de 10–14 kV/cm pour les cellules microbiennes (1–10 μm) (Toepfl *et al.*, 2005).

II. 4.9.3 Utilisation du champ électrique pulsé

Le CEP n'a pas seulement été utilisé pour favoriser l'extraction des composés solubles des tissus végétaux, il a aussi été employé pour accélérer l'extraction des huiles végétales, comme l'huile d'olive et l'huile de Maïs (Guderjan. 2005). Bien que le CEP ait été utilisé pour l'extraction des lipides et les autres ingrédients cellulaires des plantes terrestres, son application sur les algues est relativement nouvelle.

II. 4.9.4 Avantages de l'utilisation du champ électrique pulsé

Actuellement, les processus assistés par CEP ont suscité un vif intérêt dans l'ingénierie alimentaire pour l'amélioration de l'extraction par diffusion, le traitement osmotique, l'extraction par pressage, le séchage et la congélation (Vorobiev et Lebovka, 2008).

Les principaux avantages du traitement assisté par CEP en comparaison avec les traitements classiques sont :

- ✓ L'augmentation du transfert de masse;
- ✓ un rendement d'extraction amélioré;
- ✓ la réduction du temps de traitement;
- ✓ la diminution de l'intensité des paramètres d'extraction conventionnels (c'est-à-dire la température d'extraction et la concentration du solvant);
- ✓ la réduction de la dégradation des composés thermosensibles;
- ✓ la réduction des coûts énergétiques et de l'impact environnemental.

II. 4.9.5 Utilisation du champ électrique pulsé sur les microalgues

Récemment, il y a eu un intérêt accru pour l'application de la technique du CEP concernant la récupération des composés à haute valeur ajoutée à partir des microalgues marines telles que les protéines, les caroténoïdes, les chlorophylles, les micros éléments, les lipides, les acides gras polyinsaturés et stérols, ainsi que les composés volatils et phénoliques. Ces composés présentent un grand intérêt pour différentes applications dans les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et celles des biocarburants.

Dans une autre étude concernant l'extraction des composés d'intérêts de la microalgue *Nannochloropsis* sp, le potentiel du traitement par CEP comme étape préliminaire d'extraction aqueuse en variant le pH des microalgues a également été évalué (Parniakov et al., 2016). Les extraits ont été analysés pour la teneur en pigments, protéines, glucides, composés phénoliques totaux et capacité antioxydante. Les données ont mis en évidence les avantages de l'extraction assistée par CEP dans des conditions normales (pH = 8,5) et l'extraction dans des conditions basiques (pH = 11) pour l'extraction sélective de différents composants intracellulaires.

II. 4.9.6 Rentabilité

Les techniques de rupture des cellules de microalgues acquièrent souvent un apport énergétique élevé. La rentabilité de ces techniques est liée à plusieurs facteurs tels que la

consommation d'énergie par kilogramme de poids sec, la concentration en biomasse sèche des suspensions de microalgues traitées, le temps nécessaire pour obtenir des rendements de perturbation raisonnables, etc. (D'Hondt et *al.*, 2017).

II. 4.10 Extraction par le solvant supramoléculaire des composés bioactifs

Les solvants supramoléculaires (SUPRAS) sont des liquides nanostructurés constitués d'agrégats d'amphiphiles (par exemple : acides carboxyliques, alcanols, sulfates d'alkyle, phénols d'alkyle, etc.) qui sont synthétisés à partir de solutions colloïdales par auto-assemblage et coacervation (Caballo et *al.*, 2017).

Les amphiphiles s'organisent dans les SUPRAS sous forme d'agrégats tridimensionnels via des liaisons non covalentes donnant une variété de morphologies possibles qui sont sensibles à l'environnement (Ballesteros-Gómez et Rubio, 2012).

Les SUPRAS ont des propriétés intrinsèques qui en font d'excellents candidats pour le développement d'extractions efficaces. Ils offrent des microenvironnements de polarités différentes, une concentration élevée en sites de liaison et une surface spécifique élevée en raison de leur caractère discontinu. En conséquence, des extractions rapides et efficaces peuvent être obtenues en utilisant de faibles volumes de SUPRAS.

Une propriété exceptionnelle des SUPRAS est qu'ils peuvent être adaptés pour donner des fonctions spécifiques, donnant ainsi la possibilité d'augmenter l'efficacité et la sélectivité (Ballesteros-Gómez et Rubio, 2012).

II. 4.10.1 Synthèse du solvant supramoléculaire

Les SUPRAS sont des liquides non miscibles à l'eau formés spontanément à partir de solutions aqueuses ou hydro-organiques d'amphiphiles via un processus d'auto-assemblage séquentiel. Ces structures peuvent être formées de vésicules à couche unique ou de micelles inversées et seront ensuite disposées dans des liquides riches en colloïdes non miscibles plus gros qui se séparent de la solution aqueuse des échantillons dans un processus connu sous le nom de coacervation (Ruiz e *al.*, 2007).

II. 4.10.2 Définition du phénomène de coacervation

La coacervation, un phénomène décrit par les chimistes hollandais Bungenberg de Jong et Kruyt et défini par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée comme la séparation des systèmes colloïdaux en deux phases liquides (Une riche en colloïdes, c'est-à-dire le coacervat, et l'autre contenant peu de colloïdes) constituant un excellent moyen pour

réaliser des extractions. La coacervation se distingue de la précipitation, qui est observée sous forme de coagulum ou de floccs et se produit dans les systèmes colloïdaux instables.

Un certain nombre de macromolécules dont les protéines, les polysaccharides, les polymères synthétiques, les médicaments et les assemblages supramoléculaires (par exemple, les micelles) sont connus pour subir une séparation en phase liquide-liquide (Gander et *al.*, 2002).

La coacervation est classée en deux types : simple et complexe selon le mécanisme de séparation des phases. Le premier implique une macromolécule neutre ou chargée, et la coacervation est induite par un agent déshydratant (sel, un non-solvant, pH, ou température) qui favorise les interactions macromolécule-macromolécule par rapport aux interactions macromolécule-solvant (Wang et *al.*, 1999).

Le complexe de coacervation implique deux macromolécules de charges opposées, et la séparation des phases est principalement contrôlée par des facteurs électrostatiques (par exemple, les densités de charge macromoléculaire, la force ionique, etc.) (Mohanty et Bohidar. 2003).

II. 4.10.3 Avantages de l'utilisation des solvants SUPRAS

En comparaison avec les solvants organiques courants, les SUPRAS se caractérisent par un excellent pouvoir de solvataion, respectueux de l'environnement, non volatiles, une stabilité thermique élevée et une non-inflammabilité. Le mélange par vortex est un moyen efficace pour la dispersion du solvant d'extraction dans la phase aqueuse, il accélère également le transfert de masse des analytes et facilite les phénomènes de coacervation. La procédure d'extraction assistée par vortex fournit l'efficacité d'extraction souhaitée et un facteur de préconcentration élevé (Qin et *al.*, 2013 ; Ali et *al.*, 2017).

Diverses espèces telles que les sulfates d'alkyle, les sulfonates, les sulfocinates, les acides alcanoïques (C8-C16) et alcénoïques (C18), les tensioactifs ioniques et non ioniques ont la capacité de la coacervation et de la formation de SUPRAS qui peuvent être séparés de la solution en vrac sous l'action de la déshydratation par le changement de température ou l'ajout d'électrolytes (Zhao et *al.*, 2018). Les micelles non ioniques ont été largement utilisées pour la microextraction d'une large gamme d'analytes dans les procédures d'extraction en raison des propriétés uniques telles que la puissance d'extraction élevée, la non-volatilité et la facilité d'utilisation (Vieira et *al.*, 2017 ; Leite et *al.*, 2018).

*PARTIE 02: Etude
expérimentale*

*Chapitre III:
Extraction de la
C-phycocyanine à
partir de la
biomasse sèche de la
spiruline.*

III.1 Introduction

De nombreuses études ont été menées sur les techniques de rupture des parois cellulaires des microalgues, telles que le traitement physique (micro-ondes, homogénéisation haute pression, sonication, champ électrique pulsé, congélation/ décongélation), le traitement biologique (traitement enzymatique) et le traitement chimique (traitement acide et traitement alcalin) pour récupérer certains composants (Gonzalez-Fernandez et *al.*, 2012). En comparant les différentes méthodes d'extraction, il est clair que chaque méthode présente des avantages et des inconvénients distincts.

Les méthodes de congélation/décongélation et enzymatiques sont souvent recommandées comme des méthodes simples, efficaces et qui sont largement utilisées pour l'extraction de la C-PC à partir de la spiruline. Pour ces raisons, elles sont communément appelées "méthodes conventionnelles". Cependant, ces méthodes conventionnelles n'ont pas permis l'obtention de produits de qualité très pure, pour cela, les technologies innovantes et émergentes telles que les ultrasons (US) et le champ électrique pulsé (CEP) ont attiré l'attention des chercheurs pour une éventuelle application dans les industries alimentaires et connexes (Chemat et *al.*, 2011).

Chaque microorganisme a des caractéristiques particulières en ce qui concerne l'emplacement des protéines intracellulaires. Par conséquent, le protocole d'extraction pourrait varier en fonction de la protéine souhaitée.

Plusieurs auteurs ont étudié les différentes techniques pouvant fournir les meilleurs rendements et les meilleures puretés lors de l'extraction de la C-PC. Cette extraction nécessite une étape préliminaire de rupture cellulaire pour permettre un accès complet aux composants internes et faciliter le processus de récupération des biomolécules d'intérêt. Ainsi, de nombreuses techniques d'affaiblissement cellulaire ont été étudiées. Il est donc utile et nécessaire de savoir que la paroi de la spiruline est composée de muréine (peptidoglycane) sans aucune cellulose (Safi et *al.*, 2014). En effet, l'extraction de la C-PC a été rapportée comme difficile en raison de l'extrême résistance de la paroi cellulaire, bien que différentes méthodes aient été étudiées, aucune d'entre elles n'a été considérée comme une procédure standard (Martinez et *al.*, 2017). L'extraction des phycobiliprotéines implique la rupture cellulaire et la libération de ces protéines à l'intérieur de la cellule.

En considérant diverses applications biologiques de la C-PC, le but de cette étude est l'extraction et la purification de la C-PC à partir de la spiruline. Cependant, les principaux

défis concernant l'extraction de la C-PC sont liés au choix de la méthode pour l'obtention de la pureté et du rendement d'extraction les plus élevés. En contre partie, des informations très limitées peuvent être trouvées sur les méthodes d'extraction de la C-PC à partir de la biomasse sèche de *S. platensis*, donc, à notre connaissance, il s'agit de la première tentative d'étude de l'effet de quatre techniques de prétraitement, appliquées dans les mêmes conditions expérimentales (type et pH du solvant, ratio biomasse/solvant, nature de la biomasse algale) pour l'extraction de la C-PC à partir de la spiruline.

III.2 Matériel et Méthodes

Toutes les étapes suivantes du prétraitement de la biomasse algale de la spiruline pour la récupération de la C-PC ont été réalisées dans le Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (LRTNH) de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA).

III.2.1 Biomasse algale

La biomasse sèche de *S. platensis* a été procurée de Cyanothec Corporation Hawaii, USA, et conservée dans des poches en phtalates d'aluminium au réfrigérateur ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

L'extraction des phycobiliprotéines a été conduite en utilisant quatre (04) méthodes différentes : la congélation/ décongélation (C/D), l'extraction enzymatique (EE), l'extraction assistée par ultrasons (EAU) et l'extraction assistée par champ électrique pulsé (EACEP). L'efficacité de ces méthodes d'extraction a été comparée à l'extraction sans aucun prétraitement.

III.2.2 Préparation des échantillons

Les échantillons à extraire ont été préparés selon le ratio solide liquide de 1/100, en mélangeant 1g de spiruline dans 100 mL de tampon phosphate de sodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: 100 mM, pH = 6,8, Sigma Aldrich ; Allemagne) (Tavanandi et al., 2018). Afin d'éviter la sédimentation de la microalgue, les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un agitateur de laboratoire (WiseShake, Wisd-SHO-2D, Corée) et équipés de billes en verre pour augmenter la surface de contact.

La conductivité électrique des échantillons finaux a été ajustée, avec le tampon à $24 \pm 0,4$ mS/m. La conductivité a été mesurée par un conductimètre (197i WTW, Weilheim, Allemagne). Pour éviter toute destruction des molécules photosensibles, toutes les extractions ont été réalisées à l'obscurité.

III.2.3 Extraction assistée par la congélation/ décongélation (C/D)

Le prétraitement par la congélation-décongélation consiste à soumettre les échantillons à quatre cycles de 6h chacun de congélation et de décongélation. La congélation a été effectuée à -18°C, et la décongélation à température ambiante (~20°C).

III.2.4 Extraction assistée par les enzymes (EAE)

Le prétraitement enzymatique a été réalisé selon le protocole modifié décrit par Jerley et Prabu (2015), en ajoutant 100 µg/mL de lysozyme (ROTH, Allemagne) et une solution de 100 mM d'EDTA de sodium (Biochem, France) à l'échantillon préalablement préparé; l'EDTA sert d'inhibiteur des métallo-enzymes et protège la protéine contre l'hydrolyse, tandis que le lysozyme, appartenant à la famille des O-glycosyl hydrolases, rompt spécifiquement certaines liaisons de la paroi cellulaire, provoquant ainsi leur rupture (Bot et *al.*, 2017). La digestion enzymatique a été réalisée à 30° C pendant 24 h.

III.2.5 Extraction assistée par les ultrasons (EAU)

Le prétraitement par les ultrasons a été réalisé à l'aide d'un bain sonicateur (Ultrasonic Cleaner Set, WUC-D06H, Corée), avec des dimensions de 29 x 15 x 15,6 cm³. Les échantillons ont été placés dans le bain sonicateur à une température de + 18 °C. Les échantillons ont été traités à trois fréquences : 20, 30 et 40 kHz, pendant cinq temps de traitement différents : 20, 30, 40, 50 et 60 min, puis ont été incubés à + 4 ° C toute une nuit.

III.2.6 Extraction assistée par champ électrique pulsé (EACEP)

Le système du champ électrique pulsé pour le prétraitement de la suspension algale se compose d'un générateur d'impulsions à décroissance exponentielle, d'une chambre de traitement en continu et d'un équipement de mesure.

La figure III.1 montre le schéma du système CEP utilisé dans cette expérimentation. Le générateur d'impulsions se compose d'un transformateur haute tension de 10 kV, d'une diode haute tension, d'une résistance de 3,5 kW, d'un condensateur de 20 nF. Un champ électrique de 24 kV/cm a été appliqué aux échantillons préalablement préparés.

Le prétraitement CEP des échantillons a été effectué dans une chambre de traitement en continu à champ commun constituée d'électrodes cylindriques en acier inoxydable, séparées par un isolant (1 mm d'épaisseur ; Polythermide, Ultem, McMaster-Carr, Chicago, Ill., USA). La chambre de traitement comporte deux zones de traitement, chacune avec un volume de 12,6 µL (Gachovska et *al.*, 2008). Les échantillons de spiruline ont été pompés à

travers la chambre de traitement à l'aide d'une pompe péristaltique (Carter Cassette pump Manostat, USA). La tension de sortie du transformateur est redressée par la diode et utilisée pour charger le condensateur. L'énergie stockée dans le condensateur est donnée par l'équation $CV^2/2$, où C est la capacité du condensateur et V est la tension de traitement. Lorsque la tension sur le condensateur dépasse la tension de claquage diélectrique à travers l'éclateur, une étincelle relie la chambre de traitement au condensateur, et le condensateur décharge son énergie, sous forme d'impulsion de décroissance exponentielle dans le liquide contenu dans les deux régions de traitement.

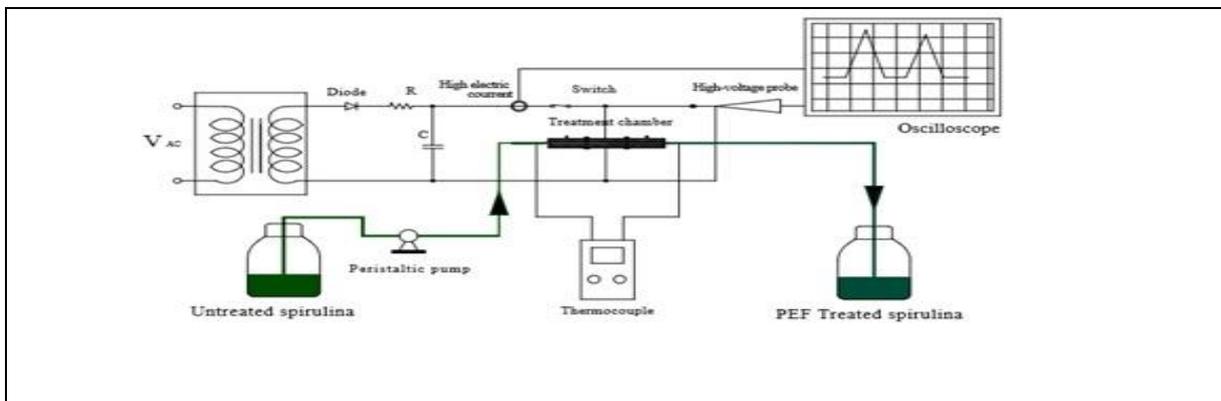


Figure III 1: Système du champ électrique pulsé

On a pris soin d'ajuster le débit de telle sorte que la particule s'écoulant le plus rapidement dans la région de traitement reçoive au moins une impulsion afin d'être traitée. La constante de temps, ou largeur d'impulsion, de l'impulsion de décroissance exponentielle est calculée par RC , où R est la résistance de la chambre de traitement et C la capacité.

La durée de l'impulsion d'environ $5,36 \mu s$ a été observée pendant le traitement. Le nombre d'impulsions (n) reçues par le liquide dans chaque zone de traitement est donné par l'équation (1) :

$$n = \frac{f \cdot v}{Q} \quad (1)$$

Où f est la fréquence d'impulsion (400 Hz), v est le volume de la zone de traitement ($12,6 \mu L$) et Q est le débit ($0,69 \text{ mL/s}$) (Tab. III.1).

Tableau III. 1: Paramètres du prétraitement CEP en continu

Q (mL/s)	E (kV/cm)	F (Hz)	n (μs)	τ (μs)	t (μs)
0,69	24	400	80	5,36	400

La tension de traitement a été mesurée à l'aide d'une sonde haute tension (1000 :1 Tektronix P6015, Beaverton, OR, USA) et d'un oscilloscope (SIGLENT, SDS 1102 CHL, Chine.). Les températures à l'entrée et à la sortie de la chambre de traitement ont été contrôlées à l'aide d'un thermocouple (EXTECH dual K/J TM 300, Nashua, NH, USA), la température était de $18 \pm 2,0$ °C à la sortie du système de traitement. Le paramètre température est très important lors du prétraitement par CEP, car la molécule à extraire est thermosensible.

Pour chaque lot de traitement, le temps de séjour de l'échantillon dans la chambre de traitement est de 80 μs et le temps de traitement total est de 400 μs. Après le prétraitement par le CEP, les échantillons sont conservés à + 4° C pendant 6 h pour permettre une diffusion suffisante des composants extraits du cytoplasme.

III.2.7 Extraction de la C-PC

Les composants internes de tous les échantillons traités et témoins ont été centrifugés à 5 000 tr / min pendant 15 min à 4 ° C à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma, 3K30, Allemagne).

III.2.7.1 Purification de la C- phycoyanine

a. Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait brut a été soumis à une précipitation fractionnée par du sulfate d'ammonium solide ((NH₄)₂SO₄), tout d'abord une première saturation à 25% puis une deuxième à 50% (p/v) comme suit :

Du ((NH₄)₂SO₄) solide à 25% (p / v) a été ajouté à l'extrait brut sous agitation pendant 1 h, suivi d'une centrifugation à 10 000 tr/min pendant 15 min. Le précipité vert de cette première saturation a été éliminé et le surnageant bleu a été récupéré et soumis à une saturation à 50% (p/v) de ((NH₄)₂SO₄), de manière similaire à la saturation à 25%. Le surnageant vert-jaune résultant de la centrifugation est éliminé et on récupère le culot bleu qui représente la fraction phycobiliprotéines.

Il faut noter que d'après les calculs effectués, nous avons récupéré uniquement la fraction C-PC car les APC et les PE n'ont pas été trouvés dans cette fraction. Ceci est probablement dû au fait que la C-PC représente la phycobiliprotéine la plus dominante dans la spiruline.

b. Dialyse

Le précipité bleu a été dissout dans un petit volume du tampon d'extraction et dialysé contre cent fois son volume du même tampon en utilisant une membrane de dialyse. Une membrane de dialyse préalablement préparée a été utilisée (Humidification dans de l'eau distillée pendant 24 h). (Dialysis tubing cellulose membrane, *avg. flat width* 33mm, SIGMA-ALDRICH, Germany) pendant 24 h.

III.2.7.2 Absorption spectrale

Le rendement d'extraction de la C-PC ainsi que sa pureté ont été déterminés par spectrophotométrie à des longueurs d'onde de 280, 620 et 652 nm en utilisant les équations 2, 3 (Silveira et *al.*, 2007) et 4 (Boussiba et Richmond. 1979) respectivement.

$$[C-PC] \text{ (mg / mL)} = \frac{(A_{620} - (0,474 * A_{652}))}{5,34} \quad (2)$$

$$\text{Rendement (mg / g)} = \frac{[C-PC] * v}{DB} \quad (3)$$

Où : [C-PC] est la concentration de C-PC (mg / mL). v est le volume de solvant (mL). DB est la quantité de biomasse sèche (g).

$$\text{La pureté} = A_{620} / A_{280} \quad (4)$$

Où A_{620} représente la hauteur du pic maximale pour la C-PC et A_{280} indique une contamination des protéines riches en acides aminés aromatiques.

III.2.7.3 Analyse statistique

Les analyses de régression ont été réalisées à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Excel, Version 2013).

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée en utilisant les procédures des modèles linéaires généraux (MLG) de l'analyse statistique Statgraphics centurion XVI. Dans tous les cas, les différences significatives étaient basées sur un seuil de 5 % ($p < 0,05$).

Les expériences ont été répétées en *triplicata*, et les moyennes de trois ensembles de données sont rapportées. Le test de Newman-Keuls a également été considéré pour identifier des moyennes d'échantillons significativement différentes les unes des autres.

III.3 Résultats et Discussion

L'ANOVA a été appliquée sur les résultats obtenus en utilisant les quatre techniques de prétraitements pour l'extraction de la C-PC (Annexes 01, 02, 03, 04, 05 et 06).

III.3.1 Extraction assistée par la congélation/ décongélation

Les résultats du rendement et de la pureté de la C-PC extraite après le prétraitement C/D sont présentés dans le tableau III.2.

Tableau III. 2: Résultats de l'extraction assistée par congélation / décongélation

Paramètres Traitement	Contrôle	C/ D
Rendement (mg/g) **	26,75 ± 5,30 ^B	62,5 ± 6,36^A
Pureté*	2,24 ± 0,36 ^B	2,47 ± 0,21^A

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher. Les étoiles représentent la signification selon le test ANOVA (* Significatif ; ** Hautement significatif ; *** Très hautement significatif).

Le rendement en C-PC obtenu par l'extraction assistée par la congélation/ décongélation ($62,5 \pm 6,36$ mg/g) est hautement significative par rapport au rendement du contrôle ($26,75 \pm 5,30$ mg/g). La présence de C-PC dans ce dernier pourrait être attribuée au choc osmotique qui s'est produit lorsque les cellules de spiruline ont rencontré la solution tampon phosphate.

Concernant la pureté, le prétraitement par congélation/ décongélation a enregistré la valeur la plus élevée par rapport aux autres prétraitements ($2,47 \pm 0,21$) et par rapport au témoin ($2,24 \pm 0,36$), marquant ainsi une différence significative avec ce dernier. Il apparaît qu'en raison du prétraitement C/D, la membrane cellulaire de la biomasse a été suffisamment rompue pour libérer la C-PC, mais pas suffisamment pour permettre la libération des autres protéines du cytoplasme et des organites intracellulaires, en résultant une pureté élevée (Tavanandi et al., 2018).

Les résultats de cette étude pour l'extraction de la C-PC par la C/D sont inférieurs à ceux obtenus par Da Costa Ores et al. (2016), avec un rendement de 101 mg/g atteint après quatre cycles de congélation et décongélation (24 h chacun) sur de la biomasse humide de spiruline, mais supérieur à 52,82 mg/g obtenu par Prabakaran et al. (2020). Bien que les auteurs aient réalisé d'autres étapes de purification (filtration membranaire, chromatographie sur colonne G100), ces différences pourraient être attribuées à la nature de la biomasse (humide ou sèche), au type de tampon d'extraction utilisé et/ou à son pH.

Nakagawa et al. (2016) ont rapporté que la rupture cellulaire causée par la C/D améliorait le rendement d'extraction de la C-PC. Le prétraitement par C/D présente certains avantages tels que : la simplicité, reproductibilité et robustesse étant indépendant de la quantité de la biomasse utilisée, exempt de matière corrodable et ne présente pas de pertes significatives dans la capacité biologique de la protéine (Moraes et al., 2011).

Le principe de base du prétraitement par C/D est la formation de fissures dans la membrane cellulaire dues à la pression exercée sur la paroi cellulaire par les fluides intracellulaires congelés ainsi que l'effet osmotique du tampon (Fratelli et al., 2020). L'effet du nombre de cycles de congélation-décongélation lors de l'extraction de la C-PC à partir de *S. platensis*, a montré que le rendement en C-PC augmentait avec le nombre de cycles, atteignant un maximum après quatre cycles, alors qu'il diminue juste après, probablement à cause de la dénaturation des protéines.

Dans la présente étude, la contrainte majeure dans l'application de cette méthode était le temps. En effet, les cycles d'extraction duraient 24 h. L'extraction par la C/D nécessite de longues périodes de prétraitement (4 à 48 h par cycle) et représente une consommation d'énergie élevée due à la congélation (Yu et al., 2017). Par conséquent, le prétraitement par la C/D n'est pas approprié pour une application dans la production à grande échelle.

III.3.2 Extraction Assistée par les enzymes

L'hydrolyse enzymatique est une autre méthode d'extraction qui peut être considérée comme verte et a la possibilité d'être utilisée à l'échelle de la production (Ibáñez et al., 2012). Les résultats de l'EE sont résumés dans le tableau III.3. Une différence très hautement significative a été notée pour les rendements d'extraction entre les différents prétraitements, mais aucune différence pour les puretés.

Tableau III. 3: Résultats de l'extraction assistée par les enzymes

Paramètres Traitement	Contrôle	EAE
Rendement (mg/g) ***	26,75 ± 5,30 ^B	63,3 ± 2,04^A
Pureté*	2,24 ± 0,36^A	1,66 ± 0,10 ^A

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher. Les étoiles représentent la signification selon le test ANOVA (* Significatif ; ** Hautement significatif ; *** Très hautement significatif).

En comparant les résultats de l'extraction enzymatique (EE) avec le contrôle, on remarque que le rendement le plus élevé est obtenu avec le prétraitement enzymatique. Concernant la pureté, les échantillons non traités ont enregistré la pureté la plus élevée.

Les résultats obtenus pour le rendement et la pureté de la C-PC correspondent à ceux observés par Kissoudi et al. (2017) avec un rendement en C-PC de 66,04 mg/g et une pureté de 1,38, lorsque la digestion enzymatique a été réalisée dans du tampon phosphate avec 1 mg / mL de lysozyme, tampon phosphate (0,1 M, pH = 7) pendant 12 h de digestion.

Les résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Devi et al. (2020) avec un rendement de 30 mg/g MS et un taux de pureté de 1,12. Tavanandi et al. (2018) ont enregistré une teneur en C-PC de 82,07 mg/g MS obtenue après 16 h d'incubation, une pureté de 1,19 qui est inférieure à ce que nous avons obtenu dans cette expérimentation.

La réaction enzymatique désintègre les parois cellulaires et augmente leur perméabilité, permettant ainsi la libération du contenu cellulaire sans altération des molécules internes (Vernès et al., 2015 ; Marić et al., 2018). L'hydrolyse enzymatique s'est avérée être une procédure efficace et non toxique pour améliorer l'efficacité d'extraction des composés intracellulaires (Zhang et al., 2018).

III.3.3 Extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'effet du prétraitement par les ultrasons (US) sur les rendements d'extraction et les puretés s'est avéré statistiquement significatif ($p < 0,05$) pour les différents paramètres de

traitement tels que la fréquence et la durée. Celles-ci étant des facteurs importants qui déterminent le mécanisme et l'effet du prétraitement par les ultrasons. Les prétraitements par les US ont été effectués à 20, 30 et 40 kHz à des durées différentes (20, 30, 40, 50 et 60 min). Les résultats sont représentés sur la figure III.2 (a) et (b).

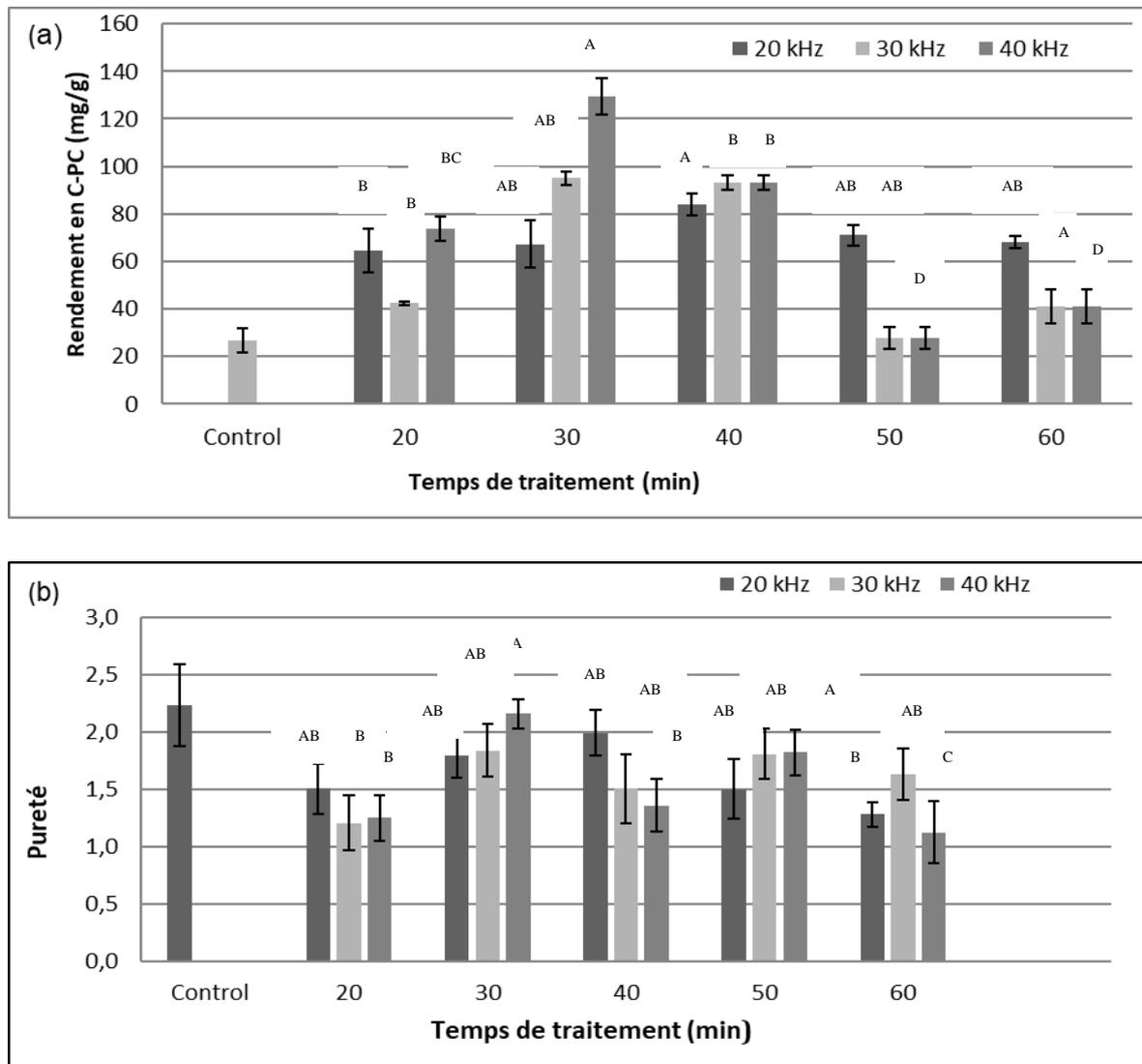


Figure III 2: Résultats de l'extraction assistée par ultrasons (a) Rendement en C-PC (mg/g) et (b) Pureté de la C-PC

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher.

On peut en déduire qu'un rendement maximum de C-PC de $129,5 \pm 7,78$ mg / g a été observé après un prétraitement US avec une fréquence de 40 kHz et une durée de 30 min. La pureté maximale de $2,15 \pm 0,12$ (Fig.III.2b) a été obtenue avec les mêmes paramètres (40 kHz pendant 30 min). Alors que la pureté minimale de $1,12 \pm 0,27$ a été obtenue lorsque la suspension a été traitée à 40 kHz pendant 60 min.

Au cours du prétraitement à 20 kHz, le rendement en C-PC ($84,00 \pm 4,58$ mg/g) et la pureté ($1,99 \pm 0,4$) les plus élevés ont été obtenus après 40 min de sonication. Au-delà de ce temps de traitement, il y a eu une diminution du rendement et de la pureté. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles obtenues par Da Costa Ores et al. (2016) ($90,00 \pm 0,4$ mg/g) pour la biomasse humide de spiruline avec les paramètres ultrasonores suivants : 20 kHz pendant 10 min et en utilisant le Tris-HCl 10 mM pH = 8,3 comme solvant d'extraction.

Pan-utai et Iamtham (2019), Bachchhav et al. (2020) ont enregistré un rendement en C-PC de 60 mg/g et 67 mg/g à la même fréquence (20 kHz) après 5 min et 4 min de traitement respectivement, en utilisant de la spiruline lyophilisée. Le même résultat a été obtenu dans cette étude mais après 20 min de sonication ($64,5 \pm 2,19$ mg/g). Cependant, Devi et al. (2020) ont enregistré un rendement de 44,54 mg/g et une pureté de 2 après 4 min de sonication.

Lors du passage à 30 kHz et après 30 min de prétraitement, le rendement et la pureté les plus importants ont été obtenu avec des valeurs de $95,00 \pm 2,83$ mg/g et $1,83 \pm 0,23$ respectivement.

Pour la fréquence la plus élevée de 40 kHz, un rendement de $129,5 \pm 7,78$ mg/g et une pureté maximale de $2,15 \pm 0,12$ ont été enregistrés après 30 min de prétraitement. Au-delà de ce temps, aucune augmentation des rendements et des puretés n'a été observée.

Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Moraes et al. (2011) : 47,75 mg/g (eau, 50 kHz et 40 min), Hadiyanto et Suttrisorhadi (2016) : $14,9 \pm 0,21$ mg/g (éthanol, 42 kHz, 42 min, 52,5°C), Ilter et al. (2018) : 98,17 mg / g (1,5% CaCl₂, 40 kHz, 16 min et 25°C), Gorgich et al. (2020) : 44,24 mg / g (tampon phosphate, 50 kHz et 20 min).

Il a été observé que l'augmentation de la fréquence conduit à une augmentation du rendement et de la pureté jusqu'à un point où un pic maximum a été observé. Des résultats similaires de promotion de la rupture cellulaire et d'augmentation du rendement d'extraction des molécules d'intérêt ont été rapportés par Rodrigues et al. (2018). Une augmentation supplémentaire de la fréquence diminue le rendement et la pureté, ce qui pourrait être dû à des conditions de sonication plus drastiques.

Une étude de faisabilité et d'estimation des coûts, en plus d'une estimation de l'empreinte environnementale, d'un plan d'extraction par ultrasons à grande échelle pour récupérer les protéines de la spiruline a été réalisée et a conclu que le processus pouvait être

appliqué dans la production industrielle en tant que méthode respectueuse de l'environnement. Par conséquent, en fonction des volumes de traitement, il pourrait être économiquement réalisable de mettre en œuvre l'US comme méthode assistée de l'extraction de la C-PC pour des applications industrielles, compte tenu du faible impact environnemental de cette technique et de sa forte valeur ajoutée (Vernes et *al.*, 2019)

III.3.4 Extraction assistée par champ électrique pulsé

Le CEP est une nouvelle technologie pour améliorer le processus d'extraction des composés biodisponibles à partir des microalgues. L'efficacité de cette méthode est affectée par l'intensité du champ électrique, la température et le temps de traitement (Martinez et *al.*, 2019).

Le rendement et la pureté de la C-PC obtenus après avoir soumis les cellules de la spiruline à des prétraitements CEP pendant 400 μ s sont présentés sur le tableau III.4.

Tableau III. 4: Résultats de l'extraction assistée par CEP

Temps de traitement (μ s) / Paramètres	80	160	240	320	400
Rendement (mg/g) ***	57 \pm 3,54 ^B	61,5 \pm 0,0 ^B	84 \pm 5,66 ^A	37,00 \pm 1,41 ^C	31,00 \pm 0,0 ^C
Pureté **	1,99 \pm 0,13 ^A	2,04 \pm 0,05 ^A	2,13 \pm 0,39 ^A	2,00 \pm 0,01 ^B	1,51 \pm 0,01 ^B

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher. Les étoiles représentent la signification selon le test ANOVA (* Significatif ; ** Hautement significatif ; *** Très hautement significatif).

De fortes variations ont été observées dans le rendement et la pureté de la C-PC des échantillons traités au CEP en fonction des différents temps de traitement. Une augmentation considérable des rendements et de la pureté a été observée avec une augmentation du temps de traitement. Cependant, dépassant les 240 μ s, on constate une baisse importante du rendement d'extraction et de la pureté.

Le rendement et la pureté maximum de la C-PC étaient respectivement de 84,00 \pm 2,13 mg/g et 2,13 \pm 0,39. Cela peut être dû au fait que la technologie CEP favorise

l'extraction d'autres molécules intracellulaires, ce qui peut entraîner une réduction de la pureté.

Jaeschke et al. (2019) ont obtenu des résultats statistiquement similaires ($85,2 \pm 5,7$ mg/g) en utilisant un prétraitement par le CEP sur de la biomasse humide de spiruline suspendue dans du tampon phosphate pH 7,2 avec 40 kV/cm et une durée d'impulsion de 1 μ s à 25° C après 6 h d'incubation. Néanmoins, Martinez et al. (2017) ont obtenu un rendement d'extraction de la C-PC de $151,94 \pm 14,22$ mg/g et une pureté de $0,46 \pm 0,019$ pureté en utilisant de l'eau comme solvant, avec un temps de traitement de 150 s, une intensité de champ électrique de 25 kV/cm à 40°C après 150 min de prétraitement par le CEP. Ce prétraitement est plus intense, avec une augmentation du champ électrique et du nombre d'impulsions (Asavasanti et al., 2011), conduisant à une électroporation plus intense ce qui diminue le temps d'incubation. Rappelons que les échantillons traités par le CEP dans cette étude ont été incubés pendant 6 h. En effet, l'efficacité de l'extraction par le CEP est liée à la durée d'incubation post-traitement qui permet la libération de la C-PC par diffusion dans le tampon d'extraction (Martinez et al., 2019).

Les résultats ont montré que le rendement en C-PC augmente avec l'augmentation du temps de traitement. Le CEP compromet l'intégrité cellulaire, ce qui peut faciliter l'extraction ultérieure des composés intracellulaires. Lorsque le champ électrique est établi dans les cellules environnantes, une charge de la membrane plasmique cellulaire se produit. Cela conduit à une tension transmembranaire élevée et, à son tour, à une perte d'intégrité de la membrane avec une augmentation de la conductivité et de la perméabilité (Grimi et al., 2014).

En général, le prétraitement par le CEP est moins efficace pour l'extraction des protéines de toutes les espèces de microalgues, par rapport aux prétraitements par les US. Cela peut refléter la faiblesse du mécanisme d'électroporation lui-même pour l'extraction des biomolécules à partir des cellules de microalgues à parois rigides (Günerken et al., 2015).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus suggèrent que de petits pores se sont formés lors du prétraitement, permettant ainsi la libération d'ions à travers la paroi cellulaire. La performance du CEP en ce qui concerne la libération de la C-PC n'était pas aussi efficace que celle des ultrasons. Ce phénomène est dû à la formation de pores et/ou à la désintégration qui est considérée comme un facteur limitant.

Une étude comparative entre les traitements par le CEP et celui de l'homogénéisation à haute pression (HPH) sur le rendement d'extraction en C-PC à partir de la biomasse fraîche de

la spiruline, confirme l'efficacité de l'extraction assistée par le CEP en enregistrant $12,65 \pm 0,6$ % et $11,35 \pm 0,7$ % de la C-PC à partir du poids sec des cellules, et des taux de pureté de 0,51 et 0,32 respectivement (Akaberi et al., 2020).

Carullo et al. (2021) ont amélioré l'extraction des composés hydrosolubles de la spiruline grâce à la combinaison d'une homogénéisation avec cisaillement (High Shear Homogénéisation) et du champ électrique pulsé. Les résultats ont conclu que le CEP exerce toujours un impact positif sur l'extraction sélective de la C-PC, tandis que le principal effet du prétraitement par HSH est d'améliorer quantitativement les rendements de récupération des composés intracellulaires lors de la fragmentation des trichomes de la spiruline.

III.4 Conclusion

L'objectif dans ce chapitre était de comparer la libération de la C-PC dans un milieu aqueux (tampon phosphate 100 mM, pH = 6,8) après l'application de quatre techniques de rupture cellulaire, les rendements et les puretés d'extraction ont été comparés à l'extraction sans prétraitement (contrôle). Les résultats obtenus ont démontré que les méthodes de prétraitement sont la clé d'une récupération maximale de la C-PC à partir des microalgues. En effet, il a été démontré qu'un prétraitement de 24 kV/cm par CEP pendant 240 μ s de la biomasse sèche de la spiruline, suivi de 6 h d'incubation nous a permis d'extraire la C-PC contenu dans les cellules, avec un rendement plus élevé ($84,00 \pm 2,13$ mg /g) que celui obtenu par congélation/décongélation et par prétraitement enzymatique. La pureté obtenue est la même qu'avec un prétraitement par les ultrasons (conditions 40 kHz/ 30 min).

Il a été mentionné dans le premier chapitre que la spiruline contenait des caroténoïdes et des composés phénoliques. De ce fait dans le prochain chapitre, nous allons procéder à la récupération, l'identification et la caractérisation de ses composés.

*Chapitre IV:
Extraction,
Caractérisation et
Identification des
caroténoïdes et des
polyphénols de la
spiruline*

IV.1 Introduction

Récemment, les microalgues ont acquis un intérêt croissant en tant que source de produits de grande valeur. La possibilité de les cultiver dans des terres non arables ainsi que la modulation de leur métabolisme suite à l'application de certains stress font des microalgues une matière première intéressante pour la production industrielle. Cet intérêt augmente à mesure que de nouvelles sources d'antioxydants naturels sont recherchées. Cependant, nous disposons encore d'un nombre limité d'espèces de microalgues exploitées pour obtenir ces composés. Compte tenu de ces faits, la composition des caroténoïdes et des polyphénols de la spiruline a été étudiée.

La microalgue *Arthrospira platensis* est une source potentielle d'antioxydants naturels, notamment les caroténoïdes et les composés phénoliques totaux (CPT). Cependant, leur récupération à partir de la matrice cellulaire est souvent sujette à plusieurs limitations, en particulier le choix du solvant pour la désintégration cellulaire et sa purification ultérieure. Traditionnellement, la désintégration chimique des cellules par des solvants conventionnels tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile, l'acétone et l'hexane est la plus utilisée pour la libération d'antioxydants intracellulaires. La majorité de ses solvants appartient à la classe des composés organiques qui sont hautement inflammables et cancérigènes, provoquant une irritation des yeux, des maux de tête et une réaction allergique cutanée (Kerton et Mariott. 2013).

La pression pour réduire la consommation des solvants organiques dans les laboratoires a encouragé le développement de processus de traitements d'échantillons plus respectueux de l'environnement. Bien que le solvant "vert" parfait n'existe pas, les solvants alternatifs doivent être peu toxiques, faciles à recycler, inertes et ne pas contaminer le produit (Kerton et Mariott. 2013). Dans ce contexte, beaucoup d'efforts ont été consacré pour le développement de solvants alternatifs tels que les fluides supercritiques, les liquides ioniques et les solvants supramoléculaires (SUPRAS). Récemment, ces derniers ont reçu une certaine attention en tant qu'alternative verte aux solvants organiques traditionnels (Ballestros- Gomez et *al.*, 2010 ; Plotka- Wasylka et *al.*, 2017).

Les SUPRAS ont déjà fait leurs preuves en tant qu'extracteurs efficaces de contaminants provenant d'une variété d'échantillons environnementaux, biologiques et agroalimentaires, mais également comme extracteurs de composés bioactifs et ceci en démontrant leur capacité à extraire, encapsuler et stabiliser efficacement l'astaxanthine de la

biomasse d'*Haematococcus pluvialis* pour produire des oléorésines SUPRAS riches en astaxanthine adaptées aux applications dans l'industrie alimentaire (Salatti-Dorado et al., 2019). De même, la pertinence des SUPRAS pour la récupération des polyphénols et des alcaloïdes du marc de café usé a également été récemment démontrée (Torres-Valenzuela et al., 2019).

Afin de surmonter les limites de l'utilisation des extractions conventionnelles par solvant, l'extraction par SUPRAS des antioxydants de la spiruline a été adoptée en réponse aux principaux objectifs suivants :

- Gain de temps, d'énergie et de biomasse grâce à une procédure de microextraction rapide et simple en une seule étape.
- Réalisation d'un processus écologique et rentable en sélectionnant des ingrédients à faible coût et autorisés par les aliments dans la formulation des SUPRAS.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que le SUPRAS pourrait représenter un procédé alternatif vert pour l'extraction des composés antioxydants de la spiruline.

La mesure précise des antioxydants dans les aliments, même à de faibles niveaux, a été considérée comme une tâche intéressante et stimulante dans l'industrie alimentaire. Actuellement, la technique la plus appliquée pour l'identification et la quantification des pigments est l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)-UV/VIS qui a été largement utilisée pour déterminer les caroténoïdes et les polyphénols dans les microalgues (Cerón-García et al., 2018). Récemment, le criblage d'extraits bruts à l'aide de techniques LC-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse) est devenu un outil puissant pour l'identification chimique en raison de leur spécificité et sensibilité élevées, de leur efficacité de séparation et de leur capacité d'information structurelle (Acero et al., 2019).

Les techniques LC-MS/APCI et LC-MS/ESI ont été appliquées avec succès pour le criblage des microalgues où des contributions importantes concernant les composants antioxydants présents dans ces micro-organismes ont été attentivement rapportées (Goiris et al., 2014). Cela suggère que la LC/MS est plus sensible, spécifique et sélective, ce qui la rend particulièrement importante pour l'étude des antioxydants obtenus à partir des microalgues, puisque ces composés sont généralement présents à l'état de traces et sont souvent contaminés par des matrices biologiques (Sivathanu et Palaniswamy, 2012).

IV.2 Matériel et Méthodes

Le protocole expérimental de l'extraction et de la caractérisation des composés antioxydants de la spiruline s'est déroulé comme suit (Fig. IV.1).

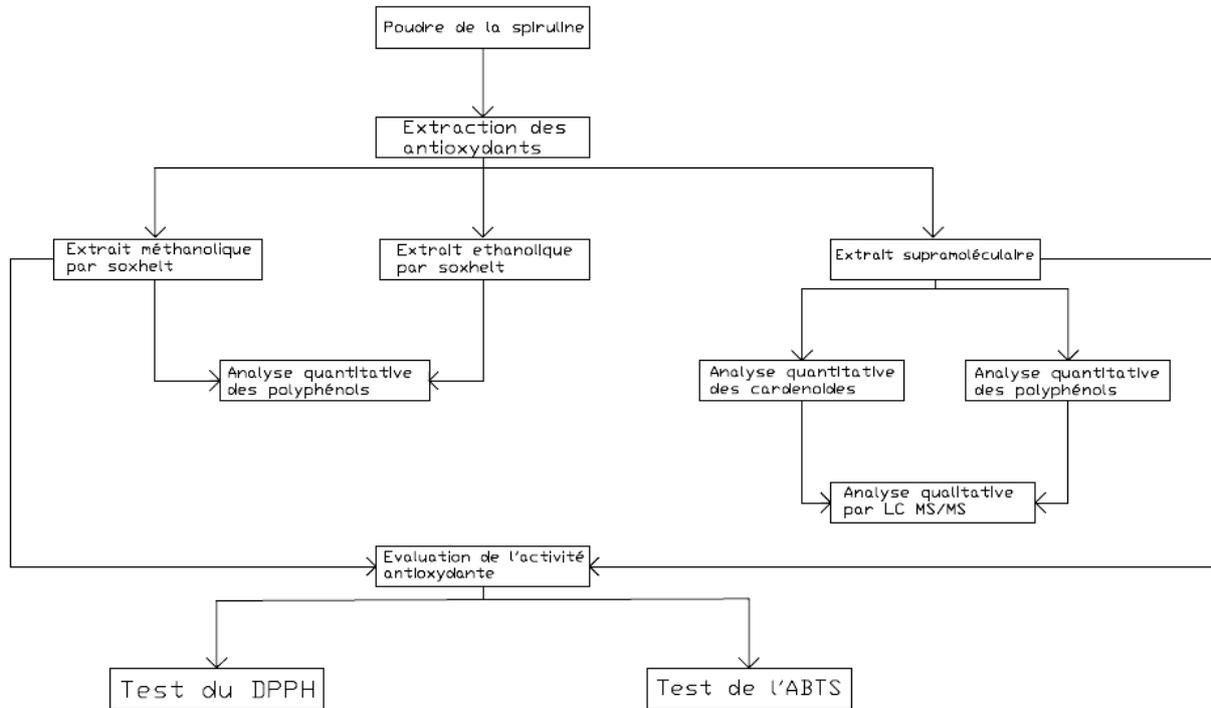


Figure IV. 1: Diagramme du protocole expérimental

IV.2.1 Synthèse du solvant supramoléculaire à base d'acide octanoïque (SUPRAS)

Le solvant SUPRAS a été synthétisé (tubes à centrifugation de 45 mL) par dissolution de 2,5 mL d'acide octanoïque (5% v/v) dans 16,2 mL d'éthanol (36% v/v), en y ajoutant 26,5 mL d'une solution d'HCl 10 mM (Eau acide, pH = 3) pour induire la coacervation (Fig. IV.2). Ce mélange a été choisi suite aux travaux réalisés par Keddar et al. (2020) où il a été noté, après optimisation des mélanges, que ce dernier donnait les meilleurs résultats d'extraction. Le mélange ainsi obtenu a été agité par le vortex (Vortexer, Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA) à 2300 tr /30 secondes, puis centrifuger à 3500 tr / min pendant 5 min à 25°C (Mixtasel BLT, Selecta, Cham, Switzerland) pour favoriser la séparation des phases.

Deux phases ont été obtenues : le solvant supramoléculaire (en haut) et la solution d'équilibre (en bas). Les deux phases ont été séparées en recueillant la phase supérieure avec une micropipette et conservées à 4°C dans des tubes hermétiquement fermés jusqu'à leur utilisation.

Le volume du SUPRAS obtenu peut être ajusté à volonté en augmentant la quantité d'acide octanoïque utilisée pour la synthèse tout en gardant un rapport eau / EtOH constant. Ce SUPRAS a ensuite été utilisé pour l'extraction supramoléculaire des caroténoïdes et des polyphénols à partir de la poudre de spiruline.

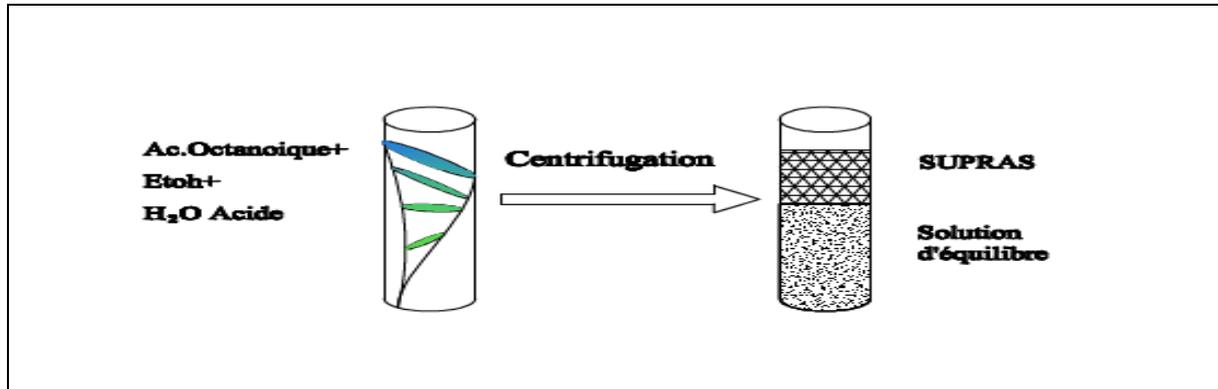


Figure IV. 2: Elaboration du solvant supramoléculaire

IV.2.2 Extraction par solvant SUPRAS des antioxydants

Un mélange contenant 50 mg de la poudre de spiruline et 1 mL du solvant SUPRAS a été préparé dans des tubes Eppendorf de 2 mL. Le mélange a été agité vigoureusement au vortex pendant 5 min, puis centrifugé à 10.000 tr/ min pendant 15 min pour obtenir deux phases différentes : le résidu de biomasse en bas et le SUPRAS en haut. La phase SUPRAS est une oléorésine contenant les caroténoïdes et la fraction polyphénolique. Toute la procédure s'est déroulée à l'abri de la lumière.

IV.2.2.1 Détermination de la teneur en caroténoïdes totales et chlorophylles dans l'extrait supramoléculaire

Pour le contenu total en caroténoïdes, l'extrait supramoléculaire a été dilué dix fois avec du méthanol et centrifugé à 10.000 tr/min pour éliminer les résidus solides et obtenir un extrait clair. Les chlorophylles *a* et *b*, pigments photosynthétiques verts essentiels pour la photosynthèse chez les cyanobactéries en tant que donneurs d'électrons primaires, ont également été déterminés dans les mêmes conditions analytiques utilisées pour l'analyse des caroténoïdes avec des longueurs d'onde différentes.

Les absorbances des solutions diluées de l'extrait ont été mesurées à 470, 652.4, et 665.2 nm (Spectrophotomètre Lambda 25UV / VIS, Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, USA), qui sont les pics d'absorbance des caroténoïdes, et de la chlorophylle *b* et *a* respectivement.

Les concentrations (1), (2), (3) (Lichtenthaler, 1987), et le rendement en caroténoïdes (4) ont été calculés selon les équations suivantes :

$$\text{Chl } a \text{ (mg/ L)} = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad (1)$$

$$\text{Chl } b \text{ (mg/ L)} = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad (2)$$

$$\text{Car (mg/ L)} = (1000 A_{470} - 1.63 \text{ Chl } a - 104.9 \text{ Chl } b) / 22 \quad (3)$$

$$\text{Car (mg/g)} = (\text{Car en mg/ L} * \text{volume du SUPRAS (L)} * \text{Fd}) / \text{prise d'essai} \quad (4)$$

IV.2.3 Extraction éthanolique et méthanolique des antioxydants

L'extraction des antioxydants par le SUPRAS a été comparée à l'extraction conventionnelle par Soxhlet en utilisant l'éthanol et le méthanol comme solvants.

Les extraits éthanolique (EE) et méthanolique (EM) ont été obtenus en se référant à la méthode de Soxhlet qui permet d'effectuer une extraction solide-liquide. L'extraction par l'appareil Soxhlet est une méthode simple et convenable nous permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première. Cette méthode d'extraction est couramment utilisée dans l'extraction des molécules bioactives.

Une prise d'essai de 20 g de la poudre de spiruline a été placée dans une cartouche et mise dans le dispositif pour l'extraire avec 200 mL de solvant, sous réfrigérant à reflux pendant 6 heures, pour la récupération des extraits éthanolique et méthanolique de la spiruline. Le cycle d'extraction est répété jusqu'à épuisement des substances à extraire.

IV.2.4 Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT)

Les teneurs en CPT dans les extraits éthanolique (EE), méthanolique (EM) et supramoléculaire (SUPRAS) ont été déterminés par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Tanna et *al.*, 2018).

Tout d'abord, une aliquote (100 µL) des différentes concentrations d'extraits a été oxydée avec 250 µL du réactif Folin-Ciocalteu (0,1 N). Le mélange est neutralisé avec 0,5 mL de solution de carbonate de sodium à 20 % (p / v) puis incubé pendant 90 min à l'abri de la lumière à température ambiante.

L'absorbance de la couleur bleue résultante a été mesurée à 725 nm en utilisant le spectrophotomètre susmentionné. L'acide gallique a été utilisé comme standard avec des concentrations distinctes allant de 0,008 à 1 mg / mL. La courbe d'étalonnage ($Abs_{725} = 30,97 \text{ CPT} - 0,055$) a servi à quantifier les CPT. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de poids sec (mg eq.AG/g d'extrait).

IV.2.5 Activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante des trois extraits de la poudre de la spiruline a été évaluée *in vitro* par deux méthodes de référence : Le pouvoir de piégeage des radicaux DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) et ABTS (2.2- Azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid)).

IV.2.5.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•

Le test de piégeage du radical DPPH par les 03 extraits de la spiruline a été réalisé selon le Protocole décrit par Brand-Williams et al. (1995), avec des modifications mineures. 100 μ L des différents extraits (concentrations testées : 10, 20, 30, 40, et 50 mg/ mL) ont été mélangés avec 1,9 mL de la solution de DPPH (0,004 % dans du méthanol).

Les extraits sont incubés pendant une nuit à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance a été enregistrée à 517 nm contre un blanc. Des solutions fraîches de BHT ont été préparées et analysées dans les mêmes conditions que les échantillons.

Selon Sharififar et al. (2007), le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = ((A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}) * 100$$

A_{blanc} : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'extrait.

La cinétique des réactions des extraits avec le DPPH est inscrite à chaque concentration examinée. Un graphique des concentrations, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, est tracé à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index CI_{50} .

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50 % (Sharififar et al., 2007).

IV.2.5.2 Mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS ou 2,2-Azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller et Rice-Evans (1993). La méthode de l'ABTS est basée sur l'évaluation du degré de la réduction du radical cation ABTS obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium pendant 16 h à 4° C et à l'abri de la lumière, L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange qui est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm.

Des aliquotes de 100 µL des différentes concentrations des extraits EE, EM, et SUPRAS (10, 20, 30, 40, et 50 mg/ mL) ont été ajoutées à 1,9 mL de la solution d'ABTS ayant une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm. Les mélanges sont alors incubés à l'abri de la lumière pendant 10 min. l'expérience est répétée en *triplicata* et l'absorbance des différentes concentrations est effectuée à 734 nm contre un blanc (Re et al., 1999). Le pourcentage d'inhibition est tracé en fonction des concentrations des extraits.

L'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique (TROLOX) (Sigma-Aldrich) a été utilisé comme étalon. Les résultats quantitatifs de la teneur en antioxydants des trois extraits ont été exprimés en milligrammes d'équivalent TROLOX (TEAC) par gramme de biomasse sèche, et obtenu à partir de la courbe d'étalonnage où l'axe X représente la concentration et l'axe Y représente le pourcentage d'inhibition (%).

Une solution méthanolique du TROLOX avec des concentrations variant de 1 mg /mL à 10 mg/ mL a été préparée. Le PI a été calculé selon Guedes et al. (2013) de la manière suivante :

$$I (\%) = ((A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}) * 100$$

Où $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de la solution d'ABTS + l'extrait et A_{blanc} est l'absorbance de la solution d'ABTS diluée.

IV.2.6 L'analyse chromatographique de l'extrait SUPRAS

Dans l'analyse chromatographique, les échantillons de l'extrait supramoléculaire sont séparés et concentrés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse, puis introduits dans le spectromètre de masse et ionisés par pression atmosphérique. Des ions précurseurs d'intérêt spécifiques sont séparés des divers ions ionisés en fonction du rapport masse / charge dans le filtre de masse quadripolaire du premier étage. Ensuite, les ions

isolés sont fragmentés par collisions avec des molécules de gaz neutres dans la cellule de collision. Enfin, les ions, dans des plages spécifiques de rapport masse / charge, sont séparés et détectés des ions fragmentés dans un filtre de masse quadripolaire (Fig IV.3).

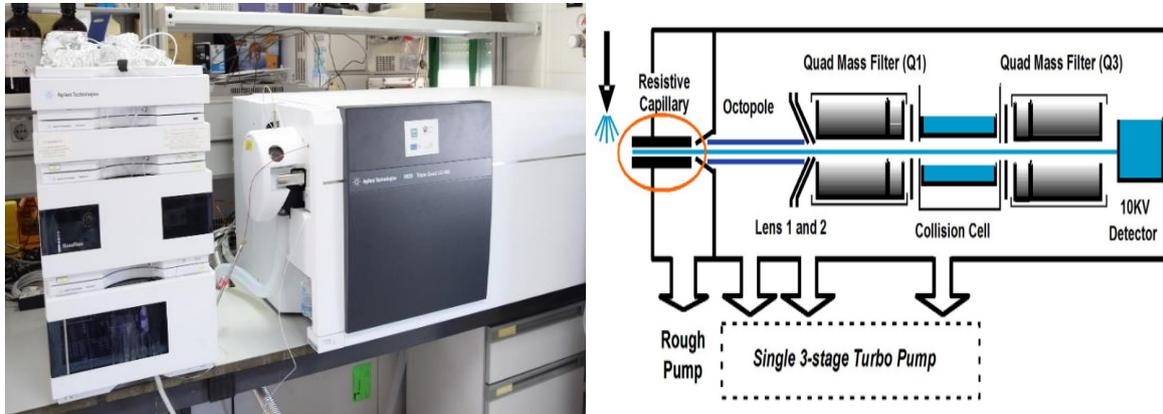


Figure IV. 3: Instrument LC-MS pour l'identification des antioxydants (à gauche) et la conception du spectromètre de masse triple quadripôle 6420 (à droite) (Keddar et *al.*, 2020)

L'analyse LC-MS/MS offre un haut degré de sensibilité et de spécificité ; elle est utile pour affiner davantage la séparation et améliorer la résolution des ions séparés par des instruments quadripolaires simples (Franke et *al.*, 2019).

IV.2.6.1 Le système LC MS / MS pour l'identification des caroténoïdes

Afin d'étudier les performances MS / MS avec la source d'ionisation chimique par pression atmosphérique (APCI) pour la détection et la quantification des caroténoïdes, des études préliminaires ont été réalisées à l'aide de la méthode directe en injectant chaque solution standard dans une acquisition à balayage complet, en modes positif et négatif.

Les données ont montré que la sortie du signal dans les analyses en mode positif était meilleure qu'en mode négatif. En outre, une faible fragmentation dans la source a été observée en mode négatif, par rapport à leurs spectres correspondants en mode positif. Ainsi, l'expérience MS / MS ultérieure et les paramètres du composé ont été optimisés en mode positif.

L'identification des caroténoïdes a été réalisée avec un appareil de la série Agilent 1200 HPLC en phase inverse (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) équipé d'un dégazeur en ligne, d'une pompe binaire, d'un passeur d'échantillons et d'une colonne ACE 3 C18-PFP (3 mm × 150 mm, 3 m), connecté à un spectromètre de masse type Agilent Technologies 6420 Triple Quadripôle fonctionnant en mode APCI (+).

Les réglages suivants ont été utilisés : température de séchage du gaz : 350 °C, débit du gaz de séchage : 4 L/ min, température du vaporisateur : 400 °C, tension capillaire 4000 V, courant électrique 4 A, pression du gaz du nébuliseur 30 psi. Une liste des standards des caroténoïdes des microalgues avec des transitions MS / MS signalées (Soares et *al.*, 2019) a été enregistrée pour permettre leur identification.

La phase mobile binaire pour la séparation des caroténoïdes est constituée du solvant A (eau : méthanol 1 : 4 v/v) et du solvant B (acétone : méthanol 1 : 1 v/v). La méthode de gradient a été utilisée pour séparer les pigments comme suit : 25 % B 0 – 8 min, 75 % B 8–18 min, 90 % B 18–23 min, 100 % B 25–27 min, 25 % B 27–32 min, comme recommandé par Cerón-García et al. (2018).

IV.2.6.2 Saponification des caroténoïdes du solvant supramoléculaire

Afin de simplifier la procédure d'identification, les caroténoïdes estérifiés ont été transformés en caroténoïdes libres par saponification. Les extraits supramoléculaires ont été dilués cinq fois avec du méthanol, puis 1 mL d'aliquote a été mélangé avec 300 µL de solution méthanolique de KOH 50 mM fraîchement préparée. Le mélange est ensuite laissé 3 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, pour une hydrolyse complète des liaisons esters.

IV.2.6.3 Préparation des courbes d'étalonnage des caroténoïdes

Les courbes d'étalonnage ont été préparées sur la base de la méthode d'étalonnage interne en utilisant des étalons dilués dans de l'acetonitrile. Elles ont été préparées pour le dosage de : la lutéine, l'astaxanthine, la canthaxantine et le β - carotène aux concentrations de 0,1 , 0,2 , 0,5, 0,7 , 1,5 et 2 mg / L. Chaque solution standard a été injectée en *triplicata* en utilisant le programme LC / MS cité précédemment, et la surface moyenne des pics pour chaque concentration a été utilisée. Les courbes étalons ont été préparées en traçant le rapport de concentration (étalon par rapport à l'étalon interne) en fonction de son rapport d'aire (Annexe 07).

Les caroténoïdes ont été identifiés en fonction de leur ordre d'élution et de leur spectre de masse correspondant aux normes disponibles, et du spectre de masse par rapport aux données disponibles dans la littérature (Soares et *al.*, 2019).

IV.2.6.4 Le système LC MS/ MS pour l'identification des polyphénols

La caractérisation des composés phénoliques a été réalisée par ionisation par électrospray en utilisant l'analyse LC MS/MS (ESI-) en utilisant le chromatographe et la colonne susmentionnée. Le spectromètre de masse triple quadripôle a été réglé comme suit : source d'ionisation électrospray (ESI) fonctionnant en mode négatif, nébuliseur 30 psi ; gaz sec 12 L / min ; température 350 °C ; et tension capillaire 4000 V.

La séparation a été réalisée par un mélange de deux solvants : eau / acide acétique (99 / 1, v/v) (A) et acétonitrile / méthanol (50/50, v/v) (B). Le débit de la phase mobile était de 1,0 mL / min. Une liste des standards des polyphénols avec des transitions MS/MS signalées a été établie à des fins d'identification.

IV.2.6.5 Collecte des données et interprétation des résultats

Les données ont été enregistrées et traitées à l'aide du logiciel Agilent MassHunter® (version B.07.00). Les solutions standards d'astaxanthine, de lutéine, de canthaxantine et du β -carotène ont été préparées dans l'acétonitrile et injectées pour confirmation et quantification (temps de rétention et correspondance des spectres MS / MS).

Au départ, une base de données a été créée à partir des ions parents et fragments des caroténoïdes et polyphénols communs trouvés dans les microalgues et rapportés dans la littérature. Cela a donc été utilisé plus tard comme référentiel pour l'identification des antioxydants dans les extraits supramoléculaires. En effet, chaque pic a été attribué en comparant ses transitions caractéristiques (ion précurseur \rightarrow ion produit) avec celles du composé déjà répertorié dans la base de données.

IV.2.7 Analyses statistiques

Les mesures d'absorbance ont été réalisées en $n \geq 3$, et les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (SD). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATIGRAPHICS 19 en utilisant la procédure d'analyse de la variance à un facteur avec la comparaison des moyennes selon le test de LSD de Fischer. Une étude de corrélation (Coefficient de Pearson) entre les différentes activités biologiques et les teneurs en CPT et caroténoïdes a été réalisée afin de déterminer quelles sont les variables associées.

IV.3 Résultats et Discussion

IV.3.1 Propriétés analytiques et chimiques du SUPRAS synthétisé

Les solvants supramoléculaires ont été synthétisés à partir d'acide octanoïque, d'éthanol et d'eau. Il a déjà été rapporté que les acides alkylcarboxyliques servaient dans la production du solvant SUPRAS dans divers milieux hydro-organiques, notamment l'éthanol, l'acétone, le méthanol, l'acétonitrile, le tétrahydrofurane, etc. en tant que solvants organiques miscibles à l'eau. En outre, les amphiphiles à chaînes courtes produisent généralement des SUPRAS dans une gamme de conditions plus large que les acides ayant des chaînes hydrocarbonées longues ou courtes, et par conséquent, fournissent des liaisons hydrogène plus fortes pour une meilleure extraction des composés polaires et modérément polaires (Ballesteros-Gómez et al., 2019).

La formation du solvant SUPRAS est simple et se déroule en trois étapes (Fig. IV.4) :

Étape 01 : L'acide octanoïque forme une suspension colloïdale de micelles inversées au-dessus de la concentration critique d'agrégation dans l'éthanol ;

Étape 02 : L'addition de l'eau, qui agit comme agent inducteur de coacervation, fait grossir les agrégats supramoléculaires formant ainsi des gouttelettes huileuses, qui s'associent en amas de gouttelettes individuelles ;

Étape 03 : Les congglomérats de faible densité se transforment en crème et se séparent en une nouvelle phase liquide appelée SUPRAS.

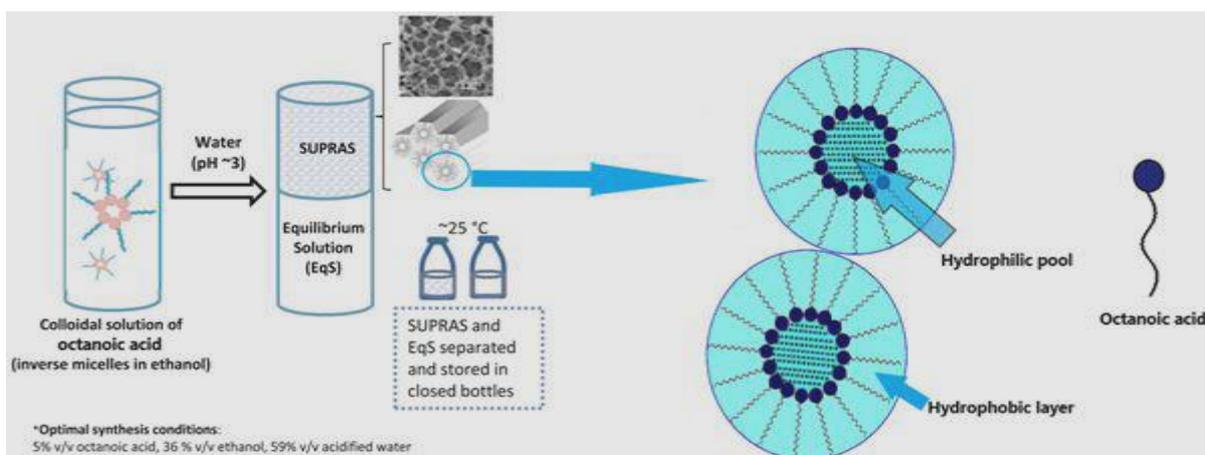


Figure IV. 4: Description générale de la synthèse du solvant supramoléculaire (Ballesteros-Gómez et al., 2019).

Du fait que seule la forme protonée de l'acide octanoïque est impliquée dans la coacervation ($pK_a = 4,75$), la formation du SUPRAS doit être réalisée en milieu acidifié ($pH < 3$). La solution d'équilibre (EqS) résultante lors de la synthèse du solvant SUPRAS est souvent utilisée pour l'extraction en combinaison avec la phase SUPRAS dans le but d'humidifier l'échantillon.

Les composants du solvant SUPRAS ont été sélectionnés sur la base de leur aptitude à être appliquées en industries (ingrédients alimentaires autorisés) et de leur potentiel à maximiser simultanément trois forces de liaison principales censées conduire l'extraction des caroténoïdes et des polyphénols.

Par conséquent, les groupes fonctionnels de l'acide octanoïque (à savoir -OH et -COOH) donnent des liaisons hydrogène et des interactions polaires, tandis que les chaînes alkyles établissent des interactions de dispersion, de sorte que les caroténoïdes et les polyphénols peuvent être solubilisés dans les nanostructures hexagonales du SUPRAS par des mécanismes en mode mixte, ce qui devrait améliorer l'efficacité de l'extraction. De plus, il a été prouvé que l'acide octanoïque, avec une chaîne hydrocarbonée saturée, protège les caroténoïdes contre la peroxydation lipidique (Salatti-Dorado et *al.*, 2019).

D'autre part, l'éthanol a été sélectionné pour produire la suspension colloïdale de l'amphiphile, en raison de sa grande polarité associée à son groupe hydroxyle (OH), qui devrait permettre la formation de liaisons hydrogène et ainsi attirer les groupes polaires. De plus, le groupe éthyle (C_2H_5) de l'éthanol est non polaire et peut se lier à des composés non polaires. Par conséquent, l'éthanol peut dissoudre les molécules polaires et non polaires. Il est à noter que l'éthanol est le deuxième solvant le plus utilisé après l'eau dans les produits industriels et de consommation grâce à sa faible toxicité comparativement aux autres alcools, ce qui fait de lui un solvant adapté pour une utilisation alimentaire.

La composition et la taille des cavités aqueuses d'agrégats hexagonaux inversés du solvant SUPRAS, préparé à base de l'acide octanoïque, peuvent être adaptées pour leur formation en fonction de l'environnement (c'est-à-dire la proportion d'éthanol dans la solution). Le volume du SUPRAS formé est lié linéairement à la quantité d'acide octanoïque et exponentiellement au pourcentage d'éthanol dans le mélange ternaire. Ainsi, un volume accru de SUPRAS a été obtenu en augmentant les rapports volumiques solvant organique/eau dans la synthèse à concentration amphiphile constante (Keddar et *al.*, 2020)

IV.3.2 Détermination de la teneur en caroténoïdes totaux et chlorophylles dans l'extrait supramoléculaire

L'extraction supramoléculaire des caroténoïdes et des chlorophylles *a* et *b* a donné les résultats représentés dans le tableau VI.1.

Tableau IV. 1: Teneur en caroténoïdes et chlorophylles de l'extrait SUPRAS

Pigments	Teneurs
Chl <i>a</i> (mg/ L)	10,57 ± 2,64
Chl <i>b</i> (mg/ L)	1,28 ± 0,32
Car (mg/ L)	1,40 ± 0,60
Car (mg/g)	0,69 ± 0,08

D'après le tableau, il en ressort que la chlorophylle *a* représente la fraction la plus importante des pigments caroténoïdes de la spiruline avec un pourcentage de 79,77% de la fraction totale extraite, suivit par celle des caroténoïdes (10,56%) et de la chlorophylle *b* (9,66%) respectivement. La teneur en caroténoïdes de la spiruline varierait de 0,1 à 0,4 mg / g (Kumar et *al.*, 2013), rappelons que dans cette étude une teneur de 0,69 ± 0,08 (mg/ g) a été enregistrée.

La présence des chlorophylles dans l'extrait supramoléculaire de la spiruline était significative, soit 10 fois plus par rapport à la fraction des caroténoïdes. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la biosynthèse des chlorophylles implique la synthèse de deux fractions : la première est un cycle chlore, qui est synthétisé par une branche spécifique de la biosynthèse des tétrapyrroles, et la deuxième est une chaîne phytol produite par la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (terpénoïdes) (Solymosi et Mysliwa-Kurdziel. 2017). En ce sens, le fait que la composition en chlorophylle soit plus élevée dans l'extrait supramoléculaire de la spiruline peut être associé à un profil quantitatif plus faible des caroténoïdes présents dans cette souche, puisque les composés précurseurs des caroténoïdes peuvent être ciblés sur la voie de la biosynthèse des chlorophylles. En plus de sa fonction principale dans la photosynthèse, les chlorophylles sont recherchées en raison de leurs propriétés bioactives.

Plusieurs chercheurs ont évalué les propriétés biologiques des molécules de chlorophylle et ont démontré que la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* exerçaient une activité

antimutagène, chimio préventive et anti-inflammatoire ainsi qu'une action anti-inflammatoire *in vitro* (Szczygiel et al., 2008 ; Subramoniam et al., 2012).

Certains auteurs considèrent que la teneur totale en chlorophylles dans les microalgues est de l'ordre de 0,5 à 1,5 % du poids sec (Becker. 2004). De plus, selon une observation de Basu et al. (2013), la teneur en chlorophylle *a* et *b* de différentes souches de microalgues (*Scenedesmus obliquus* et *Chlorella* sp.) varie entre 1 et 6 % de la biomasse sèche. À cet égard, des facteurs tels que le mode de culture et le choix d'espèces spécifiques sont des déterminants de l'accumulation de chlorophylle dans la biomasse de microalgues, étant généralement supposé que des intensités lumineuses sous-saturantes induisent une synthèse plus élevée de ces composés (da Silva Ferreira et Sant'Anna. 2017).

Selon Ali et al. (2014), les microalgues vertes ont une teneur en caroténoïdes plus élevée que celle des espèces cyanobactériennes, où des teneurs en caroténoïdes de 3,73 mg / L, 1,97 mg / L et 0,79 mg / L ont été enregistrées chez les microalgues vertes *S. obliquus*, *Chlorella* sp, et *D. splendide* respectivement. La teneur la plus élevée de 0,67 mg / L a été notée chez la cyanobactérie *Oscillatoria* sp. Cependant, dans la présente étude, une teneur en caroténoïdes extraite par solvant supramoléculaire de $1,40 \pm 0,6$ mg / L a été obtenue, ce qui est largement supérieure à celle de la microalgue verte *D. splendide*.

Généralement, les cellules de microalgues contiennent des caroténoïdes primaires en tant que composants structurels des photosystèmes, et des caroténoïdes secondaires qui s'accumulent dans des conditions de stress (Goiris et al., 2014).

Le profil quantitatif des caroténoïdes varie selon les espèces. Ces différences pourraient être attribuées à des facteurs tels que le type de culture, la source de nutriments, la diversité phylogénétique, les caractéristiques morphologiques et cytologiques, ainsi que la composition des gènes et des enzymes spécifiques à chaque espèce de microalgues (Begum et al., 2016).

Les teneurs enregistrées dans l'extrait SUPRAS sont inférieures à celles rapportées par Zhou et al. (2022), avec des teneurs en chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et en caroténoïdes dans les extraits de spiruline de 0,4 mg / g, 0,4 mg / g et 0,2 mg / g respectivement, en utilisant le CEP comme technique de rupture cellulaire et le DMSO comme solvant d'extraction. Cette différence pourrait être attribuée à l'utilisation du CEP comme technique de rupture cellulaire qui aide à la perméabilisation de la membrane, permettant ainsi une meilleure pénétration du

solvant et un meilleur rendement d'extraction, nous encourageant à jumeler l'extraction par solvant SUPRAS avec le prétraitement des cellules par CEP. D'un autre côté, le DMSO est reconnu avec l'acétone comme étant les meilleurs solvants d'extraction des chlorophylles (Tavanandi et Raghavarao. 2019). En effet, dans leur étude, Tavanandi et Raghavarao (2019) ont utilisé l'éthanol et l'acétone comme solvant d'extraction des chlorophylles et ont obtenu des rendements supérieurs à ceux enregistrés dans la présente étude (5,75 mg / g et 5,85 mg /g en utilisant l'éthanol et l'acétone respectivement). Les auteurs ont remarqué que le rendement en chlorophylles augmente avec l'élévation de la concentration en éthanol jusqu'à à atteindre 100%, ceci pourrait expliquer la différence dans les résultats obtenus. En effet, dans la présente étude la concentration de l'éthanol dans l'extrait supramoléculaire est de 36%. Cependant, il faut savoir que les auteurs ont enregistré ces rendements en regroupant les extraits de 10 cycles d'extraction, alors que les teneurs enregistrées dans cette étude ont été obtenues après un seul cycle d'extraction. Il convient de souligner ainsi que la teneur totale en caroténoïdes des extraits SUPRAS pourrait être améliorée en augmentant la quantité d'échantillon et en répétant le processus d'extraction plusieurs fois.

IV.3.3 Détermination de la teneur des composés phénoliques totaux (CPT)

La méthode de Folin - Ciocalteu a été utilisée pour le dosage des composés phénoliques totaux. L'ensemble de ces composés est oxydé par le réactif de Folin Ciocalteu.

La teneur en CPT des EE, EM et SUPRAS a été déterminée par extrapolation à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats sont représentés dans le tableau VI.2. L'étude de l'analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA 1) entre les teneurs en CPT dans les 03 extraits a été réalisée par le test statistique LSD de Fisher (Annexe 08).

Tableau IV. 2: Teneur en composés phénoliques totaux des extraits de spiruline

Les extraits *	Concentration en CPT (mg eq.AG/g d'extrait)
EE	0,330 ± 0,001 ^A
EM	0,310 ± 0,001 ^A
SUPRAS	0,250 ± 0,030 ^A

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher. Les étoiles représentent la signification selon le test ANOVA (* Significatif ; ** Hautement significatif ; *** Très hautement significatif).

D'après le tableau ci-dessus, il apparaît que la teneur en polyphénols est plus importante dans les EE et EM que dans l'extrait SUPRAS, ceci pourrait être dû au fait que les polyphénols sont des substances hydrosolubles et que le solvant SUPRAS a plus tendance à extraire les composés liposolubles.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Ahmed et al. (2014) qui a enregistré des teneurs variables en CPT dans différentes espèces de microalgues : 0,068 mg eq AG/ g de MS pour l'extraction par hexane de *D. tertiolecta*, 0,32 mg eq AG /g de MS pour l'extraction par hexane de *D. salina* et 1,54 mg eq AG /g de MS pour l'extraction à l'éthyle acétate pour la même espèce. L'extraction aqueuse des CPT sur *I. galbana* et *P. lutheri* a donné des teneurs de 0,235 mg eq AG /g de MS et 0,225 mg eq AG /g de MS respectivement.

La quantité des composés phénoliques des extraits des microalgues dépend essentiellement : de l'espèce et de l'origine de la microalgue, des conditions de culture, de la méthode d'extraction utilisée ainsi que la nature du solvant utilisé.

Comme il est bien connu, la température et la concentration du solvant sont les principaux facteurs clés influençant l'efficacité de l'extraction, en raison de leur impact sur l'équilibre (solubilité), le taux de transfert de masse (diffusion coefficient), et la stabilité des composés bioactifs (Spigno et al., 2007). En effet, en comparant nos résultats avec la littérature, il apparaît clairement que l'espèce étudiée et le solvant d'extraction jouent un rôle déterminant dans la teneur en CPT.

Récemment, une étude a été menée sur des polyphénols extraits de deux espèces différentes de microalgues : *Nannochloropsis* sp. et *Spirulina* sp. (Scaglioni et al., 2019). Ces extraits ont été utilisés pour étudier les propriétés antifongiques et anti-mycotoxinogènes des mycotoxines trichothécènes issues de cultures *in vitro* de *Fusarium graminearum*. Cette étude a révélé qu'après 168 h de culture, 40 µg/mL d'extraits phénoliques de *Nannochloropsis* sp., ont complètement inhibé le nivalénol et le déoxynivalénol et considérablement entravé la production d'acétylates de 98 %. Les extraits phénoliques de *Spirulina* sp., ont totalement inhibé le nivalénol et diminué significativement la production de déoxynivalénol de 62 % et réduit la teneur en acétylates de 78 %.

IV.3.4 Evaluation de l'activité antioxydante

Les dosages colorimétriques de l'ABTS et du DPPH sont les plus utilisés dans la mesure de l'activité antioxydante car ils sont simples à réaliser et ne nécessitent pas d'équipement spécial autre qu'un spectrophotomètre. Ces deux tests sont souhaitables, surtout

lorsque la nature des composés présents dans l'extrait est inconnue, et il y a un intérêt à déterminer la capacité antioxydante de l'ensemble de l'extrait. De plus, la méthode ABTS est largement utilisé et sert à évaluer à la fois les antioxydants solubles dans l'eau et dans les lipides (Floeg el et *al.*, 2011). En revanche, certaines méthodes ne conviennent pas à des fins de dépistage. Par exemple, le test ORAC ne mesure pas l'activité de la fraction lipidique de l'extrait (Pinchuk et *al.*, 2012).

IV.3.4.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante des EE, EM et SUPRAS de la spiruline vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires Majhenic et *al.*, (2007). Le tableau IV.3 illustre la capacité antioxydante (% d'inhibition) des trois extraits étudiés contre le radical DPPH.

Tableau IV. 3: Pourcentage d'inhibition (%) du radical DPPH

Concentrations (mg/ mL)	10	20	30	40	50
ET***	5,37 ± 0,84 ^H	7,60 ± 1,37 ^H	21,48 ± 4,40 ^{GH}	25,3 ± 0,64 ^F	28,44 ± 0,92^E
EM***	7,03 ± 0,36 ^H	12,48 ± 0,53 ^G	14,18 ± 1,22 ^G	27,05 ± 0,60 ^D	29,42 ± 0,87^D
SUPRAS***	48,56 ± 0,0 ^F	50,67 ± 0,57 ^C	52,60 ± 2,65 ^C	64,03±1,92 ^B	76,70±1,07^A

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher. Les étoiles représentent la signification selon le test ANOVA (* Significatif ; ** Hautement significatif; *** Très hautement significatif).

D'après ces résultats, il en ressort que l'extraits supramoléculaire possède les pourcentages d'inhibition les plus importants pour toutes les concentrations testées comparativement aux EE et EM.

Le pourcentage d'effet de piégeage des extraits de spiruline était maximal à la concentration de 50 mg / mL avec une activité de piégeage de 76,70 ± 1,07 % pour l'extrait SUPRAS. Une activité de piégeage minimale de 5,37 ± 0,84 % a été notée à la concentration minimale testée de 10 mg/ mL pour l'EE.

La valeur CI₅₀ de 17,78 ± 0,28 mg/ mL a été obtenue pour l'extrait SUPRAS, à partir de la régression linéaire des données du test DPPH ((I (%) = 0,638 X - 1,541 ; R= 0,93), tandis que celle de l'antioxydant de référence le BHT est de 0,024 mg/ mL. Il est à noter que la valeur CI₅₀ fait référence à la plus petite concentration d'antioxydants nécessaire pour 50% de

réactivité. L'efficacité des propriétés antioxydantes est inversement corrélée avec la valeur CI_{50} . Une valeur CI_{50} inférieure indique une activité plus élevée.

Pour les extraits EE et EM, les valeurs de la CI_{50} n'ont pas pu être déterminées, suggérant ainsi que les CI_{50} de ces deux extraits se trouvent à des concentrations supérieures à 50 mg/ mL, confirmant ainsi que l'extrait SUPRAS possède la meilleure activité antioxydante.

Aehle et al. (2004) ont rapporté que des extraits méthanoliques de la spiruline contenant du phénol pouvaient non seulement améliorer la durée de réfrigération, mais aussi agir comme antioxydant dans les systèmes biologiques ; les auteurs ont également conclu que le phénol contenu dans l'extrait méthanolique de la spiruline lyophilisée pourraient réduire significativement la quantité de brunissement induite par la peroxydase du gaïacol et que la quantité des composés phénoliques produite par la spiruline était liée à la capacité antioxydante de l'extrait.

A partir de ces études, Borowitzka et al. (2009) ont noté que les composés phénoliques ont une capacité antioxydante et interagissent avec les radicaux libres; ils peuvent inhiber la peroxydation lipidique, *in vitro*, grâce à leur capacité à séquestrer les radicaux libres et à agir comme chélateurs de métaux.

Hajimahmoodi et al. (2010), ont utilisé deux tests antioxydants (DPPH- radical scavenger et le test du potentiel réducteur de fer : FRAP) qui ont démontré l'existence d'une relation significative entre les activités antioxydantes et le contenu phénolique. Cependant, aucune de ces études n'a tenu compte de la contribution des caroténoïdes à l'activité antioxydante totale. La contribution des polyphénols est due à leur capacité à donner l'hydrogène de l'hydroxyle des groupes polyphénols et leur capacité à donner des électrons pour arrêter la formation de radicaux libres causée par le stress oxydatif, les polyphénols agissent comme de puissants antioxydants.

Deng et Chow (2010) ont analysé l'activité antioxydante des caroténoïdes, des composés phénoliques et des tocophérols extraits de la spiruline et ont conclu que les composés phénoliques responsables des actions antioxydantes des extraits de spiruline étaient des acides organiques (caféine, chlorogénique, salicylique, synaptique et trans-cinnamique) qui agissent à la fois individuellement et en synergie.

Kanta Sahu et al. (2013), ont observé une corrélation significative entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante, suggérant que la capacité de piégeage des radicaux de chaque extrait pourrait être attribuée à sa forte concentration en groupements hydroxyles phénoliques. Des études ont montré que les polyphénols sont des antioxydants très efficaces et possèdent des propriétés redox, telles que l'absorption et la neutralisation des radicaux libres, l'extinction de l'oxygène singulet et triplet et la décomposition du proxygène.

IV.3.4.2 Mesure du pouvoir de piégeage du radical ABTS ou 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

La capacité de piégeage du radical ABTS des EE, EM et SUPRAS est exprimée en pourcentage d'inhibition (%) dans le tableau IV.4.

Tableau IV. 4: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS

Concentrations (mg/ mL)	10	20	30	40	50
ET***	17,61 ± 2,03 ^H	38,84 ± 3,51 ^F	40,23 ± 0,30 ^D	45,58 ± 2,00 ^C	53,13 ± 1,05
EM***	14,94 ± 0,00 ^H	25,80 ± 0,57 ^G	38,88 ± 0,56 ^E	47,67 ± 0,78 ^D	85,9 ± 0,00
SUPRAS***	39,3 ± 0,00 ^D	45,55 ± 2,03 ^{BC}	55,60 ± 2,03 ^B	59,95 ± 1,20 ^A	66,11 ± 2,99

Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher. Les étoiles représentent la signification selon le test ANOVA (* Significatif ; ** Hautement significatif ; *** Très hautement significatif).

Selon les résultats obtenus ; les 03 extraits testés de la spiruline possèdent la capacité de piéger l'ABTS à divers degrés.

En utilisant la méthode de piégeage du radical ABTS, les résultats obtenus ont révélé que l'activité antioxydante est parallèle et dépendante de la concentration des extraits.

Le pourcentage d'effet de piégeage des extraits de spiruline était maximal à la concentration de 50 mg / mL avec une activité de piégeage maximale de 85,9 % pour l'EM. Une activité de piégeage minimale de 14,94 % a été notée à la concentration la plus faible testée de 10 mg/ mL pour l'EM.

Le calcul de la concentration inhibitrice des 50% des radicaux a mis en premier lieu le TROLOX avec une valeur de 2,06 mg/mL, suivit par les extraits SUPRAS, l'EM et l'EE avec des valeurs de 25,16 mg/mL, 34,51 mg/mL et 44,09 mg/mL respectivement. Ces valeurs classent ainsi l'extrait SUPRAS comme meilleur antioxydant entre les 03 extraits.

Une classe importante et bien connue d'antioxydants des microalgues sont les caroténoïdes. Cette classe joue un rôle important dans l'extinction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées lors de la photosynthèse, en particulier l'oxygène singulet.

Nombreuses études ont démontré que les caroténoïdes contribuent de manière significative à la capacité antioxydante totale des microalgues (Takaichi, 2011). D'autres travaux ont porté sur un ensemble plus étendu de microalgues et ont étudié la relation entre l'activité antioxydante et le contenu phénolique des extraits.

Li et al. (2007) n'a utilisé qu'un test unique (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) pour évaluer l'activité antioxydante et n'a trouvé aucune relation entre le contenu phénolique et la capacité antioxydante. Plusieurs études ont comparé l'activité antioxydante et le contenu phénolique dans les extraits fractionnés de la biomasse de quelques espèces de microalgues. Trois études ont montré que les fractions riches en composés phénoliques avaient également une capacité antioxydante élevée (Jaime et al., 2005 ; Geetha et al., 2010 ; Custódio et al., 2012), tandis que l'étude de Goh et al. (2010) a trouvé le contraire. Le fait que la présence des substances phénoliques dans la biomasse des microalgues augmente par leur exposition à la lumière UV suggère qu'ils jouent effectivement un rôle dans l'action antioxydante en réponse à ce type de stress. De ce fait, il n'y a pas consensus sur l'importance des constituants phénoliques sur la capacité antioxydante des microalgues.

A notre connaissance, il n'y a pas eu de rapport précédent sur la production d'extraits supramoléculaires riches en phénols de la spiruline à haute activité antioxydante; par conséquent, les résultats de cette étude pourraient être considérés comme une base de départ utile pour les progrès futurs dans ce domaine. Les extraits supramoléculaires pourraient être utilisés comme source potentielle d'antioxydants naturels et une alternative sûre aux composés synthétiques.

En analysant les différentes conclusions des études en ce qui concerne la substance responsable des activités antioxydantes dans les microalgues. Nous avons réalisé une étude statistique de corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et en CPT enregistrées dans cette étude afin d'identifier la substance responsable de ces activités chez les microalgues.

IV.3.5 Résultats statistiques

L'étude de la corrélation (Coefficient de Pearson) entre les différentes activités biologiques et les teneurs en CPT et caroténoïdes a été réalisée afin de déterminer quelles sont les variables associées (Annexe 11).

IV.3.5.1 Corrélation entre les teneurs en CPT et l'activité biologique DPPH

L'examen des coefficients de corrélations entre les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH et les polyphénols, indique des corrélations significatives positives entre les polyphénols des extraits EE, EM et SUPRAS avec les activités antioxydantes du DPPH ($r = 1$; $P < 0.01$). Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation entre la teneur en CPT et l'activité antioxydante du DPPH.

IV.3.5.2 Corrélation entre les teneurs en CPT et l'activité biologique ABTS

Les CPT extraites par le solvant supramoléculaire sont fortement corrélés à l'activité antioxydante du radical ABTS de l'extrait SUPRAS avec des corrélations respectives de ($r = 1$; $P < 0.01$). Les CPT extraites par l'EE et EM sont fortement corrélés à l'activité antioxydante ABTS de des extraits éthanolique et méthanoliques respectivement. Ces données indiquent qu'il existe une relation entre la teneur en CPT et l'activité antioxydante de l'ABTS.

IV.3.5.3 Corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et l'activité antioxydante DPPH

Lorsqu'on examine la matrice de corrélation, les teneurs en caroténoïdes sont corrélées négativement avec les pourcentages d'inhibition du DPPH de l'extrait SUPRAS mais aussi avec le DPPH de l'EM ($r = 0.98$; $P < 0.01$) et le DPPH de l'EE. Ces résultats pourraient indiquer que l'activité antioxydante du DPPH n'est pas liée à la présence des caroténoïdes, ou bien que les teneurs enregistrées ne soient pas suffisantes pour exercer un effet sur cette activité.

IV.3.5.4 Corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et l'activité antioxydante ABTS

Les caroténoïdes sont fortement corrélés à l'activité antioxydante ABTS dans l'extrait SUPRAS avec des corrélations respectives de ($r = 1$; $P < 0.01$). Ils sont également corrélés avec certaines concentrations de l'EM et de l'EE.

IV.3.6 Identification des principaux caroténoïdes

La séparation chromatographique par LC-MS/MS a démontré que la technique peut être utilisée pour identifier et quantifier les caroténoïdes, en raison d'une excellente réponse

pour chaque composant, avec des pics chromatographiques bien séparés, ce qui indique une forte sélectivité des caroténoïdes (Fig. IV.5). De plus, les conditions chromatographiques assurent une bonne spécificité, car chaque identification de pigment n'est pas affectée par la présence des autres composés, car une petite quantité des composés *cis* peut être détectée de manière fiable.

L'identification des extraits supramoléculaires analysés par LC-MS/ APCI a été réalisée sur la base de la comparaison des temps de rétention et des spectres avec les normes de référence. En outre, une liste de caroténoïdes communs dans les microalgues avec leurs transitions caractéristiques LC-MS/MS a été établie et épinglée à la bibliothèque d'instruments dans le but de faciliter la détection et la procédure d'identification (Annexe 12).

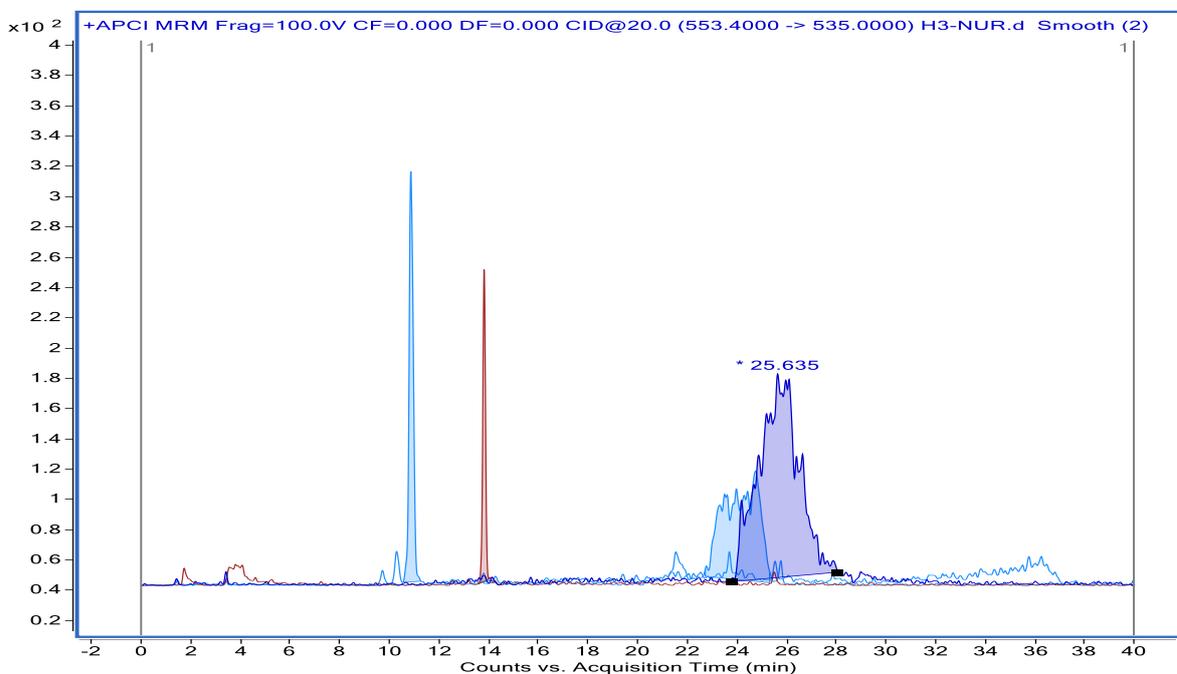


Figure IV. 5: Chromatogramme des caroténoïdes par analyse LC- APCI- MS/MS

L'analyse du chromatogramme des caroténoïdes a permis l'identification des composés suivants représentés dans le tableau IV.5, selon l'ordre d'apparition et les temps de rétention.

Tableau IV. 5: Identification des caroténoïdes analysés par LC- APCI MS/MS dans l'extrait supramoléculaire de la spiruline.

Composé	TR (min)	Transition	Fragment de confirmation	Surface de rétention
β- carotène	10,9	537 - 95	137-177	2499,2
Echinenone	13,8	551 - 203	N.D*	1071
Zéaxanthine	24,4	569,4 - 551	N.D*	5346
B- cryptoxanthine	26,1	553 - 535	135	17155,4

*: Non déterminé

Les composés ont été identifiés sur la base des caractéristiques des transitions MS (transition : ion parent - ion fille), les standards n'étaient pas disponibles pour les correspondre aux temps de rétention. Les caroténoïdes identifiés dans les extraits supramoléculaires n'ont pas pu être quantifiés car nous ne disposons pas des standards des caroténoïdes identifiés pour pouvoir établir la courbe d'étalonnage.

D'après les surfaces de rétention des différentes fractions, il apparaît que la fraction la plus significative des caroténoïdes retrouvés dans l'extrait supramoléculaire est la β - cryptoxanthine, suivit par la zéaxanthine, le β - carotène et l'echinenone respectivement.

IV.3.7 Identification des composés phénoliques majeurs

Afin de confirmer les résultats du dosage colorimétrique, les polyphénols de l'extrait supramoléculaire ont été analysés par LC-ESI-MS/MS en mode d'ionisation négative. Cependant, seule une analyse qualitative a été envisagée en raison du manque de standards des composés phénoliques, ce qui a affecté leur détermination avec précision (Fig.IV.6).

L'analyse du chromatogramme des polyphénols a permis l'identification de la présence de l'acide parahydroxybenzoïque et l'apparition d'un pic relatif l'acide gallique (ayant le même temps de rétention).

L'acide *parahydroxybenzoïque* ou acide 4-hydroxybenzoïque est un dérivé phénolique de l'acide benzoïque. Comme son nom l'indique, il s'agit de l'isomère *para* de l'acide hydroxybenzoïque dont un autre isomère célèbre est l'acide *orthohydroxybenzoïque*, plus connu sous le nom d'acide salicylique.

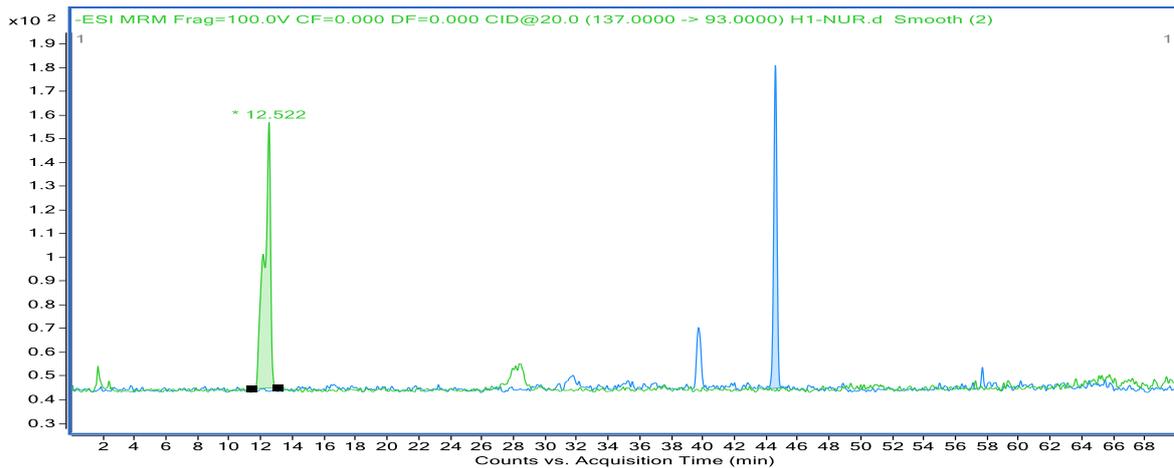


Figure IV. 6: Chromatogramme des polyphénols par analyse LC-ESI-MS/MS

Les résultats sont représentés dans le tableau IV.6, selon l'ordre d'apparition et les temps de rétention.

Tableau IV. 6: Identification des composés phénoliques analysés par LC- MS/MS dans l'extrait supramoléculaire de la spiruline

Composé	TR (min)	Transition	Fragment de confirmation	Surface de rétention
Acide 4-hydroxybenzoïque	12,5	137- 93	ND*	2801,16
Pic relatif à l'acide gallique	44,6	169-125	N.D*	1781

*: Non déterminé

Il n'y a que peu d'études publiées concernant l'identification et la quantification de la composition phénolique des espèces de microalgues (Herrero et *al.*, 2006 ; Klejdus et *al.*, 2009). Abd El-Baky et *al.* (2009), ont trouvé des composés phénoliques tels que : gallate, chlorogénate, cinnamate, pinostroboate et p-OH-benzoates dans *Spirulina* sp. Une étude récente réalisée par da Silva et *al.* (2017) sur *Arthrospira platensis*, a permis l'identification de la catéchine, des acides vanillique, gallique et syringique comme les principaux composés phénoliques. Des études antérieures ont suggéré que les profils phénoliques des microalgues dépendent fortement des espèces de microalgues, des conditions de culture et du solvant utilisé pour l'extraction (Rico et *al.*, 2017).

IV.4 Conclusion

Les résultats enregistrés dans ce chapitre indiquent que la spiruline pourrait être une source précieuse de caroténoïdes et de polyphénols. Ces deux fractions ont été extraites à l'aide de l'éthanol, de méthanol et du solvant supramoléculaire. L'extraction par solvant supramoléculaire était adoptée pour répondre à une perspective économique de chimie analytique verte pour extraire des composés antioxydants intéressants pour une éventuelle utilisation en tant qu'additifs alimentaires sans aucun danger.

La technologie SUPRAS est très prometteuse pour la mise à l'échelle en raison de sa simplicité, de l'absence d'énergies auxiliaires, de températures élevées ou d'étapes d'extraction et d'évaporation chronophages. Les données sur l'activité antioxydante indiquent que les extraits supramoléculaires étaient capables de piéger l'ABTS et le DPPH d'une manière dépendante de la concentration. Cet effet était en accord avec la composition riche en antioxydants des extraits supramoléculaires, puisque des quantités notables de caroténoïdes et de polyphénols ont été détectées. Le potentiel antioxydant élevé présenté par les extraits du solvant supramoléculaire les rend intéressants sur le plan nutritionnel. De plus, leur utilisation comme antioxydant naturel dans l'industrie alimentaire peut constituer une bonne solution pour améliorer la stabilité des aliments contre les dommages oxydatifs.

La méthode LC-MS appliquée a permis un criblage efficace des antioxydants dans les extraits supramoléculaires, un trait qui indique une forte sélectivité des solvants supramoléculaires pour récupérer les deux antioxydants. Les principaux caroténoïdes identifiés dans les extraits supramoléculaires étaient l'echinenone, la cryptoxanthine, la zéaxanthine et un pic relatif au β - carotène (même transition). Par ailleurs, le profil des composés phénoliques a révélé la présence de l'acide p- hydroxybenzoïque et un pic relatif à l'acide gallique.

*Conclusion générale
et perspectives*

L'objectif primordial de cette étude consistait en l'extraction des composés bioactifs de la spiruline en sélectionnant la méthode de prétraitement et le solvant d'extraction donnant les meilleurs résultats en économisant le temps et l'énergie. Pour atteindre cet objectif, plusieurs études expérimentales ont été réalisées, donnant les conclusions et les contributions aux connaissances suivantes :

Dans la première partie, il a été démontré que le choix de la méthode du prétraitement a considérablement amélioré l'efficacité d'extraction de la C-PC. Cette étude est la première à avoir comparé les résultats de l'extraction par 04 différentes techniques de prétraitement réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, afin de déterminer qu'elle est la méthode la plus efficace pour l'extraction de la C-PC à partir de la biomasse de la spiruline.

Les techniques de prétraitement de la biomasse de la spiruline par congélation/ décongélation, par les enzymes, par les ultrasons et par le champ électrique pulsé peuvent être appliquées avant l'extraction de la C-PC à partir des microalgues. Le prétraitement US s'est avéré être la méthode la plus appropriée pour l'extraction de la C-PC, par rapport aux autres méthodes, étant donné qu'il a enregistré le meilleur rendement en C-PC, ainsi que la pureté la plus élevée. Le prétraitement par le champ électrique pulsé s'est révélé comme une technique prometteuse et ce en raison de ses multiples avantages : rapidité, non thermique, reproductible et moins énergivores.

Dans la seconde partie, l'extraction des caroténoïdes et des composés phénoliques totaux a démontré le potentiel de la spiruline comme matière première pour la production des pigments et des antioxydants. Le criblage du profil d'extraits d'algues a montré la présence d'une variété de molécules antioxydantes allant des polaires ou modérément polaires comme les phénols à des composés fortement lipophiles comme les caroténoïdes. L'utilisation à grande échelle de ces bioactifs naturels pour l'industrie nutraceutique ou alimentaire est principalement associée à la disponibilité d'une source renouvelable avec un processus de production durable.

Le solvant supramoléculaire ; un solvant facile à préparer, vert et rentable permettant une récupération élevée des antioxydants de la biomasse microalgale a été élaboré. Le processus a conduit à des rendements d'extraction d'antioxydants atteignant 0,69 mg/g pour les caroténoïdes totaux et 0,25 mg/g pour les composés phénoliques totaux. Ces résultats permettent de l'avancer dans la récupération des antioxydants à partir des microalgues par rapport aux solvants conventionnels.

Un temps d'extraction plus court et une efficacité d'extraction sont les principales réalisations de cette étude grâce à l'utilisation du solvant supramoléculaire comparativement aux solvants traditionnels. Le procédé d'extraction en utilisant le solvant supramoléculaire offre également la possibilité d'être facilement évolutif et mis en œuvre dans l'industrie alimentaire, puisque la séparation des composés cibles était accessible de manière simple et respectueuse de l'environnement, ce qui peut compenser le coût de la production d'antioxydants algaux, rendant cette source plus viable commercialement.

Les résultats de cette étude ont démontré un potentiel antioxydant *in vitro* des 03 extraits de la spiruline, encourageant ainsi la poursuite des recherches sur la composition phytochimique des extraits pour reconnaître le ou les composants responsable(s) de toutes ces activités pharmacologiques et pour évaluer leurs effets sur des modèles *in vivo* afin d'améliorer la fonction antioxydante de l'organisme contre les différentes maladies induites par le stress oxydatif. En effet, l'activité antioxydante des 03 extraits de la spiruline a été estimée par les méthodes de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, montrant une forte activité antioxydante de l'extrait supramoléculaire contre les radicaux DPPH et ABTS, avec les valeurs CI_{50} les plus importantes, démontrant ainsi, d'un côté ; que la spiruline est une source abondante d'antioxydants et d'un autre l'efficacité de l'extraction par le solvant supramoléculaire.

Les caroténoïdes et les polyphénols présents dans les extraits de la spiruline sont connus pour posséder une capacité prononcée de piégeage des radicaux libres en raison de leur polarité et du nombre de doubles liaisons conjuguées, et peuvent ainsi exercer des effets bénéfiques sur le stress oxydatif.

Le mélange d'antioxydants dans l'extrait supramoléculaire a été identifié par spectrométrie de masse LC-Triple Quadripôle, qui a révélé la cryptoxanthine comme principal caroténoïde et l'acide p- hydroxybenzoïque comme principal composé phénolique.

Cependant, il y a plusieurs défis à relever :

- La C-PC est une molécule thermosensible et photosensible ce qui fait d'elle une molécule facilement dégradable, de ce fait, il serait judicieux d'entreprendre des études en vue d'augmenter la stabilité de l'extrait de la C-phycocyanine par l'ajout d'agent conservateur autorisé par la réglementation Algérienne en vigueur.

- La C-PC extraite dans cette étude est de grade alimentaire, permettant ainsi son utilisation dans la formulation alimentaire. De ce fait, des essais d'incorporation de ce pigment dans certains aliments va apporter une diversification aux produits alimentaires présents sur le marché.
- Bien que les méthodes d'extraction explorées dans cette étude aient été optimisées et réalisées à l'aide de biomasse sèche, il est nécessaire d'explorer l'extraction sur la biomasse humide, car le séchage de la biomasse est un processus coûteux. Il convient alors de mentionner que compte tenu de la forte teneur en eau dans le mélange SUPRAS (jusqu'à 53% v/v), ces solvants ont un grand potentiel pour l'extraction directe d'échantillons humides sans compromettre les rendements d'extraction, qui pourraient être avantageux afin de simplifier la procédure
- Etudier la possibilité de valoriser la biomasse rejetée lors de l'extraction de la C-phycocyanine en l'utilisant pour la récupération des polyphénols et des caroténoïdes, afin de minimiser les pertes économiques, énergétiques, et une surconsommation des ressources naturelles.
- Valoriser la solution d'équilibre du solvant supramoléculaire, en réalisant des extractions d'autres molécules de la spiruline avec cette solution.

Les résultats des extractions des composés bioactifs de la spiruline représentent une bonne nouvelle tant pour la communauté scientifique que pour les industriels. Par conséquent, les industries alimentaires devraient intensifier la plupart de ces méthodes innovantes d'extraction, augmentant ainsi la possibilité de production industrielle et la pertinence économique de ces molécules bioactives. C'est l'une des nombreuses façons pour commencer à réduire certaines des menaces posées à la durabilité de notre planète, en appliquant des techniques appropriées pour obtenir des composés bioactifs sains à partir des richesses de la nature.

*Références
bibliographiques*

-A-

Abd El-Baky, H. H. (2009). Enhancing antioxidant availability in grains of wheat plants grown under seawater-stress in response to microalgae extracts treatments. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(4), 077-083.

Abdel-Moneim, A. M. E., El-Saadony, M. T., Shehata, A. M., Saad, A. M., Aldhumri, S. A., Ouda, S. M., & Mesalam, N. M. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extracts and biogenic selenium nanoparticles against selected pathogenic bacteria and fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(2), 1197-1209.

Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., Iluz, D. (2021). Unconventional high-value products from microalgae: a review. *Bioresour. Technol.* 124895

Aceró, N., Gradillas, A., Beltrán, M., García, A., & Mingarro, D. M. (2019). Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Food chemistry*, 279, 260-271.

Adadi, P., Barakova, N. V., Muravyov, K. Y., & Krivoschapkina, E. F. (2019). Designing selenium functional foods and beverages: A review. *Food research international*, 120, 708-725.

Aehle E., Raynaud-Le Grandic S., Ralainirina R., Baltora-Rosset S., Mesnard F., Prouillet C. (2004). Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure, *Food Chem* 86, (4) 579–585

Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food chemistry*, 165, 300-306.

Akaberi, S., Krust, D., Müller, G., Frey, W., Gusbeth, C. (2020). Impact of incubation conditions on protein and C-Phycocyanin recovery from *Arthrospira platensis* post-pulsed electric field treatment. *Bioresource technology*, 306, 123099.

Ali, H. E. A., Shanab, S. M. M., Shalaby, E. A. A., Eldmerdash, U., & Abdullah, M. A. (2014). Screening of microalgae for antioxidant activities, carotenoids and phenolic contents. In *Applied mechanics and materials* (Vol. 625, pp. 156-159). Trans Tech Publications Ltd.

Ali, J., Tuzen, M., & Kazi, T. G. (2017). Evaluation of mercury in environmental samples by a supramolecular solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction method before analysis by a cold vapor generation technique. *Journal of AOAC International*, 100(3), 782-788.

ALothman, Z. A., Yilmaz, E., Habila, M., Ghfar, A. A., Alhenaki, B., Soylak, M., ... & Hadj, B. (2019). Supramolecular solvent microextraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combination for the preconcentration and determination of malathion in environmental samples. *Desalin Water Treat*, *144*, 166-171.

Amiali, M., & Ngadi, M. O. (2012). Microbial decontamination of food by pulsed electric fields (PEFs). In *Microbial decontamination in the food industry* (pp. 407-449). Woodhead Publishing.

Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., & Madhunapantula, S. V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition journal*, *15*(1), 1-16.

Anastas, P. T. (1999). *Crit. Rev. Anal. Chem.*

Aouir, A., Amiali, M., Kirilova-Gachovska, T., Benchabane, A., & Bitam, A. (2015, May). The effect of pulsed electric field (PEF) and ultrasound (US) technologies on the extraction of phycopilioproteins from *Arthrospira platensis*. In *2015 IEEE Canada International Humanitarian Technology Conference (IHTC2015)* (pp. 1-4). IEEE.

Asavasanti, S., Ristenpart, W., Stroeve, P., & Barrett, D. M. (2011). Permeabilization of plant tissues by monopolar pulsed electric fields: effect of frequency. *Journal of Food Science*, *76*(1), E98-E111.

-B-

Bachchhav, M. B., Kulkarni, M. V., & Ingale, A. G. (2020). Process-intensified extraction of phycocyanin followed by β -carotene from *Spirulina platensis* using ultrasound-assisted extraction. *Separation Science and Technology*, *55*(5), 932-944.

Bae, M., Kim, M.B., Park, Y.K., Lee, J.Y. (2020). Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* *1865* (11), 158618

Ballesteros-Gómez, A., Lunar, L., Sicilia, M. D., & Rubio, S. (2019). Hyphenating supramolecular solvents and liquid chromatography: tips for efficient extraction and reliable determination of organics. *Chromatographia*, *82*(1), 111-124.

Ballesteros-Gómez, A., & Rubio, S. (2012). Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants. *Analytical chemistry*, *84*(1), 342-349.

- Ballesteros-Gómez, A., Sicilia, M. D., & Rubio, S. (2010). Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. *Analytica Chimica Acta*, 677(2), 108-130.
- Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, 43, 101320.
- Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. (2020). Development of cold plasma pretreatment for improving phenolics extractability from tomato pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65, 102445.
- Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. (2020). Enhancement of phenolic compounds extraction from grape pomace by high voltage atmospheric cold plasma. *LWT*, 133, 109970.
- Barba, F. J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015). New approaches for the use of non conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews*, 7(1), 45-62.
- Barbosa-Canovas, G. V., and D. R. Sepulveda. 2005. Novel food processing technologies New York, Marcel Dekker.
- Basu, S., Roy, A. S., Mohanty, K., & Ghoshal, A. K. (2013). Enhanced CO₂ sequestration by a novel microalga: *Scenedesmus obliquus* SA1 isolated from bio-diversity hotspot region of Assam, India. *Bioresource Technology*, 143, 369-377.
- Becker, W. (2004). 18 microalgae in human and animal nutrition. In *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Vol. 312). Hoboken, NJ, USA: Wiley Online Library.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and molecular plant pathology*, 57(3), 101-110.
- Begum, H., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(13), 2209-2222.
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of applied phycology*, 25(3), 743-756.
- Borowitzka, M. A. (2009). ME Gershwin, A. Belay (eds). Spirulina in human nutrition and health. *Journal of Applied Phycology*, 21(6), 747-748.

Bot, F., Verkerk, R., Mastwijk, H., Anese, M., Fogliano, V., & Capuano, E. (2018). The effect of pulsed electric fields on carotenoids bioaccessibility: The role of tomato matrix. *Food Chemistry*, 240, 415-421.

Boussiba, S., & Richmond, A. E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120(2), 155-159.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (1995) Carotenoids. In: Spectroscopy, vol 1B. Birkhauser Verlag, Boston, p 360.

Burdick, E. M. (1956). Extraction and utilization of carotenes and xanthophylls. *Economic Botany*, 10(3), 267-279.

-C-

Caballo, C., Sicilia, M. D., & Rubio, S. (2017). Supramolecular solvents for green chemistry. In *The application of green solvents in separation processes* (pp. 111-137). Elsevier.

Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927-934

Carloni, P., Tiano, L., Padella, L., Bacchetti, T., Customu, C., Kay, A., & Damiani, E. (2013). Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food research international*, 53(2), 900-908.

Carullo, D., Abera, B. D., Casazza, A. A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G., Pataro, G. (2018). Effect of pulsed electric fields and high-pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal research*, 31, 60-69

Carullo, D., Donsì, F., Ferrari, G., & Pataro, G. (2021). Extraction improvement of water-soluble compounds from *Arthrospira platensis* through the combination of high-shear homogenization and pulsed electric fields. *Algal Research*, 57, 102341.

Cataldo V, Arenas N, López J, Camilo C, Agosin E (2018) Sustainable production of β -Xanthophylls in *Saccharomyces cerevisiae*. In Mic Eng. USA.

Cerón-García, M. C., González-López, C. V., Camacho-Rodríguez, J., López-Rosales, L., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. (2018). Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). *Food chemistry*, 257, 316-324.

- Chacón-Lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(6), 655-675.
- Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 157-168.
- Chemat F., Rombaut N., Sicaire A. G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A. S., Abert-Vian M., (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review, *Ultrason. Sonochem.* 34, p-p 540–560
- Chemat, F., Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Jambrak, A. R., Munekata, P. E., & Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22(8), 2325-2353.
- Chittapun, S., Jonjaroen, V., Khumrangsee, K., & Charoenrat, T. (2020). C-phycoerythrin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research*, 46, 101789.
- Chu, W. L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *JeJSME*, 6(1), S24-S37.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial biotechnology*, 8(2), 190-209.
- Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., Del Campo, R. & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 557-563.
- Custódio, L., Justo, T., Silvestre, L., Barradas, A., Duarte, C. V., Pereira, H., Varela, J. (2012). Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 131(1), 134-140.

-D-

D'hondt, E., Martin-Juarez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 133-154). Woodhead Publishing.

da Costa Ores, J., de Amarante, M. C. A., & Kalil, S. J. (2016). Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. *Bioresource technology*, 219, 219-227.

Dacosta Y. (2003). Les phytonutriments bioactis. Paris,317p.

da Silva Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 1-8.

da Silva Ferreira, V., ConzFerreira, M. E., Lima, L. M. T., Frases, S., de Souza, W., & Sant'Anna, C. (2017). Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 114-121.

Deng R., Chow T.J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of microalgae spirulina, *Cardiovasc Ther* 28 (4) 33–45.

Davalli, P., Rizzi, F., Caporali, A., Pellacani, D., Davoli, S., Bettuzzi, S., ... & D'Arca, D. (2012). Anticancer activity of green tea polyphenols in prostate gland. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.

de Jong, H. G., & Kruyt, H. R. (1930). Koazervation. *Kolloid-Zeitschrift*, 50 (1), 39-48.

Delgado PR, Gallardo-Guerrero L, Hornero-Méndez D (2016) Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutusunedo* L.) fruits. *Food Chem* 199:165–175.

Devi, A. C., Tavanandi, H. A., Govindaraju, K., & Raghavarao, K. S. M. S. (2020). An effective method for extraction of high purity phycocyanins (C-PC and A-PC) from dry biomass of *Arthrospira maxima*. *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 1141-1151.

Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) larvicides. *Parasitology research*, 113(2), 565-592.

Ding, Y. H., Floren, M., & Tan, W. (2016). Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurface and biotribology*, 2(4), 121-136.

Duarte, K., Justino, C. I. L., Gomes, A. M., Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2014). Green analytical methodologies for preparation of extracts and analysis of bioactive compounds. In *Comprehensive analytical chemistry* (Vol. 65, pp. 59-78). Elsevier.

Dufosse, L., P. Galaup, A. Yaron, S. M. Arad, P. Blanc, K. N. Chidambaram Murthy, and G. A. Ravishankar. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science and Technology* 16:389–406

Dykes, L., & Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal foods world*, 52(3), 105-111.

- *E* -

El-Baky, A., Hanaa, H., El Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2009). Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. *Acta physiologiae plantarum*, 31(3), 623-631

Ejima, H., Richardson, J. J., & Caruso, F. (2014). Phenolic film engineering for template-mediated microcapsule preparation. *Polymer journal*, 46 (8), 452-459.

Erel-Unal, I., & Sukhishvili, S. A. (2008). Hydrogen-bonded hybrid multilayers: film architecture controls release of macromolecules. *Macromolecules*, 41(22), 8737-8744.

Erel-Unal, I., & Sukhishvili, S. A. (2008). Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol. *Macromolecules*, 41(11), 3962-3970.

Eriksen N.T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1–14.

Esteban R, Moran JF, Becerril JM, García-Plazaola JI (2015) Versatility of carotenoids:an integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environ Exp Bot* 119:63–75.

Everett, D. H. (1972). Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, appendix II: Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 31(4), 577-638.

-F-

FAO (2021). Food and Agriculture Organization. Enabling Sustainable Food Systems. Retrieved from <https://www.rederural.gov.pt/centro-de-recursos/send/4-cca/1867-enabling-sustainable-food-systems-innovators-handbook>. Accessed Mayo 09, 2021

Feizi, N., Yamini, Y., Moradi, M., Karimi, M., Salamat, Q., & Amanzadeh, H. (2017). A new generation of nano-structured supramolecular solvents based on propanol/gemini surfactant for liquid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 953, 1-9.

Fernandez-Sevilla, J. M., F. G. Acien-Fernandez, and E. Molina-Grima. 2010. Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:27–40.

Ferreira-Santos, P., Zanuso, E., Genisheva, Z., Rocha, C. M., & Teixeira, J. A. (2020). Green and sustainable valorization of bioactive phenolic compounds from pinus by-products. *Molecules*, 25(12), 2931.

Floegel A, Kim D, Chung S, Koo S, Chun OK. (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal* 24:1043–1048

Franke, A. A., Li, X., Menden, A., Lee, M. R., Lai, J. F. (2019). Oxytocin analysis from human serum, urine, and saliva by orbitrap liquid chromatography–mass spectrometry. *Drug testing and analysis*, 11(1), 119-128.

Fratelli, C., Burck, M., Amarante, M. C. A., & Braga, A. R. C. (2021). Antioxidant potential of nature's "something blue": Something new in the marriage of biological activity and extraction methods applied to C-phycoyanin. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 309-323.

Frey, W., Gusbeth, C., & Schwartz, T. (2013). Inactivation of *Pseudomonas putida* by pulsed electric field treatment: a study on the correlation of treatment parameters and inactivation efficiency in the short-pulse range. *The Journal of membrane biology*, 246(10), 769-781.

-G-

Gachovska, T. K., Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., & Williams, F. (2008). Ultraviolet and pulsed electric field treatments have additive effect on inactivation of *E. coli* in apple juice. *Journal of Food Science*, 73(9), M412-M417.

- Galasso, C., Gentile, A., Orefice, I., Ianora, A., Bruno, A., Noonan, D.M., Sansone, C., Albini, A., Brunet, C., (2019). *Nutrients* 11
- Gander, B.; Blanco-Prieto, M. J.; Thomasin, C.; Wandrey, Ch.; Hunkeler, D.(2002). Coacervation/Phase Separation. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*; Swarbrick, J., Boylan, J. C., Eds.; Marcel Dekker: New York.
- Ganzer, M., & Sturm, S. (2018). Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 211-233.
- Garcia, E. S., Lo, C., Eppink, M. H., Wijffels, R. H., & van den Berg, C. (2019). Understanding mild cell disintegration of microalgae in bead mills for the release of biomolecules. *Chemical Engineering Science*, 203, 380-390.
- Ge, X., Yamamoto, S., Tsutsumi, S., Midorikawa, Y., Ihara, S., Wang, S. M., & Aburatani, H. (2005). Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics*, 86(2), 127-141.
- Geetha, B. V., Navasakthi, R., & Padmini, E. (2010). Investigation of antioxidant capacity and phytochemical composition of Sun Chlorella-an in vitro study. *Aquaculture Research & Development*, 1, 104.
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., & Mousavi, S. M. (2013). Microbial canthaxanthin: perspectives on biochemistry and biotechnological production. *Engineering in Life Sciences*, 13(4), 408-417
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp 275.
- Gissawong, N., Boonchiangma, S., Mukdasai, S., & Srijaranai, S. (2019). Vesicular supramolecular solvent-based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines. *Talanta*, 200, 203-211.
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401-408.
- Goh, S. H., Yusoff, F. M., Loh, S. P. (2010). A comparison of the antioxidant properties and total phenolic content in a diatom, Chaetoceros sp. and a green microalga, Nannochloropsis sp. *Journal of Agricultural Science*, 2(3), 123.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology*, 24(6), 1477-1486.

- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G. J., & De Cooman, L. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of phycology*, 50 (3), 483-492.
- Gómez-Loredo, A., González-Valdez, J., & Rito-Palomares, M. (2015). Insights on the downstream purification of fucoxanthin, a microalgal carotenoid, from an aqueous two-phase system stream exploiting ultrafiltration. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1517-1523.
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 34(8), 1396-1412.
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2012). Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology*, 110, 610-616
- Gorgich, M., Passos, M. L., Mata, T. M., Martins, A. A., Saraiva, M. L. M., & Caetano, N. S. (2020). Enhancing extraction and purification of phycocyanin from *Arthrospira* sp. with lower energy consumption. *Energy Reports*, 6, 312-318.
- Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., & Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 821-830.
- 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*, 153, 254-259.
- Guderjan M., 2005. Impact of PEF treatment on the recovery and purity of cell size and tissue electric conductivity. *Journal of food engineering* 67(3), 281-287.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology advances*, 33(2), 243-260.
- Guo, J., Ping, Y., Ejima, H., Alt, K., Meissner, M., Richardson, J. J & Caruso, F. (2014). Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal–phenolic networks. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(22), 5546-5551.
- Guo, J., Sun, H., Alt, K., Tardy, B. L., Richardson, J. J., Suma, T. & Caruso, F. (2015). Boronate–Phenolic Network Capsules with Dual Response to Acidic pH and Cis-Diols. *Advanced healthcare materials*, 4(12), 1796-1801.

- \mathcal{H} -

- Hadiyanto, H., & Suttrisnorhadi, S. (2016). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 227-234.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R., & Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 43-50.
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied energy*, 91(1), 116-121.
- Hamilton, W. A., & Sale, A. J. H. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 148(3), 789-800.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). The phytochemical richness of the Iridaceae and its systematic significance. *Annali di botanica*, 58.
- Haslam E.T. (1998). Bitterness and astringency. In: Practical polyphenolics (from structure to molecular recognition and physiological action) Cambridge University Press, pp. 178-225.
- Hemlata, G. P., & Fareha, B. (2011). Studies on *Anabaena* sp. nccu-9 with special reference to phycocyanin. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(1), 30-51
- Henríquez V, Escobar C, Galarza J, Gimpel J (2016) Carotenoids in microalgae. In: Stange C. (eds) Carotenoids in nature. Subcell biochem.
- Heo, S. J., W. J. Yoon, K. N. Kim, G. N. Ahn, S. M. Kang, D. H. Kang, C. Oh, W. K. Jung, and Y. J. Jeon. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* 48:2045–2051
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food chemistry*, 98(1), 136-148.
- Ho, D. P., Ngo, H. H., & Guo, W. (2014). A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource technology*, 169, 742-749.

Hong, D. D., Hien, H. M., & Anh, H. T. L. (2011). Studies on the analgesic and anti-inflammatory activities of *Sargassum swartzii* (Turner) C. Agardh (Phaeophyta) and *Ulva reticulata* Forsskal (Chlorophyta) in experiment animal models. *African Journal of Biotechnology*, 10(12), 2308-2313.

Hu, C. W., Chuang, L. T., Yu, P. C., & Chen, C. N. N. (2013). Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrella* sp. F50. *Food chemistry*, 138(4), 2071-2078.

Hu, S., Fan, X., Qi, P., & Zhang, X. (2019). Identification of anti-diabetes peptides from *Spirulina platensis*. *Journal of functional foods*, 56, 333-341.

Huang, S. Y., & Zou, X. (2007). Ensemble docking of multiple protein structures: considering protein structural variations in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 66(2), 399-421.

Humbert, J. F., Bérard, A., & Leboulanger, C. (2001). Impact écologique des cyanobactéries des eaux douces et saumâtres.

- I -

Ibáñez, C., Valdés, A., García-Cañas, V., Simó, C., Celebier, M., Rocamora-Reverte, L. & Cifuentes, A. (2012). Global Foodomics strategy to investigate the health benefits of dietary constituents. *Journal of chromatography A*, 1248, 139-153.

Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 703-709.

İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88.

- J -

Jaeschke, D. P., Mercali, G. D., Marczak, L. D. F., Müller, G., Frey, W., & Gusbeth, C. (2019). Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment. *Bioresource technology*, 283, 207-212.

Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F. J., Ibáñez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *Journal of separation science*, 28(16), 2111-2119.

Jerley, A. A., & Prabu, D. M. (2015). Purification, characterization and antioxidant properties of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *SIRJ-APBBP*, 2(1), 7-15.

Jiang H. L., Yang J. L., Shi Y. P., 2017. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blue berry using response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.* 34, p-p 325-331

Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.

José Pinela, M.A. Prieto, Eliana Pereira, Inès Jabeur, Maria Filomena Barreiro, Lillian Barros, Isabel C.F.R. Ferreira (2019). Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food chemistry*, 275, 309-321.

Joshi, R. P., Q. Hu, K. H. Schoenbach, and H. P. Hjalmarson. 2002. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses. *Physical Review E* 65:041920.

Joshi-Deo, J., Schmidt, M., Gruber, A., Weisheit, W., Mittag, M., Kroth, P. G., & Büchel, C. (2010). Characterization of a trimeric light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* built of FcpA and FcpE proteins. *Journal of experimental botany*, 61(11), 3079-3087.

- K -

Käferböck, A., Smetana, S., de Vos, R., Schwarz, C., Toepfl, S., & Parniakov, O. (2020). Sustainable extraction of valuable components from *Spirulina* assisted by pulsed electric fields technology. *Algal Research*, 48, 101914.

Kanta Sahu R., Kar M., Routray R. (2013). DPPH Free Radical Scavenging Activity of Some Leafy Vegetables used by Tribals of Odisha, India, *J Med Plants Stud Year 1* (1).

Kasote, D. M. (2013). Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *International Food Research Journal*, 20(1), 27.

Katiyar, R., & Arora, A. (2020). Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Research*, 46.

Kebede, E., & Ahlgren, G. (1996). Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*)(Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. *Hydrobiologia*, 332(2), 99-109.

- Keddar, M. N., Ballesteros-Gómez, A., Amiali, M., Siles, J. A., Zerrouki, D., Martín, M. A., & Rubio, S. (2020). Efficient extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from microalgae with supramolecular solvents. *Separation and Purification Technology*, 251, 117327.
- Kerton, F. M., & Marriott, R. (2013). *Alternative solvents for green chemistry* (No. 20). Royal Society of chemistry.
- Kim, K. H., Moon, E., Choi, S. U., Kim, S. Y., & Lee, K. R. (2013). Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*, 92, 113-121.
- Kissoudi, M., Sarakatsianos, I., & Samanidou, V. (2017). P47: Extraction, Purification And Evaluation Of Food-Grade Phycocyanin From *Spirulina Platensis*.
- Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L., & Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*, 1216(5), 763-771.
- Kleinegris, D. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A., & Wijffels, R. H. (2011). Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 253-259
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., & Bačkor, M. (2010). Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Plant Science*, 178(3), 307-311.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. *BioMed research international*, 2013
- 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.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
- Kyriakopoulou, K., Papadaki, S., & Krokida, M. (2015). Life cycle analysis of β -carotene extraction techniques. *Journal of Food Engineering*, 167, 51-58

- ℒ -

- Lakshmi, P., Maheswari, U., & Annamalai, A. (2008). Sequence and structure comparison studies of phycocyanin in *Spirulina Platensis* Journal of Computer Science & Systems Biology. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 1, 63–72.
- Lebovka, N., Vorobiev, E., & Chemat, F. (Eds.). (2012). *Enhancing extraction processes in the food industry*. Boca Raton: Crc Press.
- Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461770.
- Leite, A. C., Ferreira, A. M., Morais, E. S., Khan, I., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. (2018). Cloud point extraction of chlorophylls from spinach leaves using aqueous solutions of nonionic surfactants. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 6(1), 590-599.
- Li, L., Lu, S., Cosman, K. M., Earle, E. D., Garvin, D. F., & O'Neill, J. (2006). β -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry*, 67(12), 1177-1184.
- Li, W., Su, H. N., Pu, Y., Chen, J., Liu, L. N., Liu, Q., et Qin, S. (2019). Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. *Biotechnology advances*, 37(2), 340-353.
- Li, Y., Lee, J. S. (2019). Staring at protein-surfactant interactions: Fundamental approaches and comparative evaluation of their combinations-A review. *Analytica chimica acta*, 1063, 18-39.
- Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P., & Ruan, R. R. (2011). Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource technology*, 102(23), 10861-10867.
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.

Lin, W. R., Tan, S. I., Hsiang, C. C., Sung, P. K., & Ng, I. S. (2019). Challenges and opportunity of recent genome editing and multi-omics in cyanobacteria and microalgae for biorefinery. *Bioresource technology*, 291, 121932.

Liu L.-N., Chen X.-L., Zhang Y.-Z., Zhou B.-C. 2005 , Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Bioenergetics* , 1708,133-142.

Liu, R., Zhu, J., Luo, J., & Liu, X. (2014). Synthesis and application of novel UV-curable hyperbranched methacrylates from renewable natural tannic acid. *Progress in Organic Coatings*, 77(1), 30-37.

López, A., Rico, M., Santana-Casiano, J. M., González, A. G., & González-Dávila, M. (2015). Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14820–14828

Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Pereira, A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M., Simal-Gandara, J. (2021). Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. *Trends Food Sci. Technol.* 0914–2244.

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*, 247(12), 1269-1277.

Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724-732.

- *M* -

M´eresse, S., Fodil, M., Fleury, F., Ch´enais, B.(2020). Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: a promising bioactive compound for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (23), 9273.

Magrone, T., & Jirillo, E. (2012). Influence of polyphenols on allergic immune reactions: mechanisms of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), 316-321.

- Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food chemistry*, *104*(3), 1258-1268.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727-747.
- Manayi, A., Vazirian, M., & Saeidnia, S. (2015). Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacognosy reviews*, *9*(17), 63.
- Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K., 2016. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent, *Biochemical Engineering Journal*, *43p*.
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, *76*, 28-37.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, *49*(1), 154-159.
- Martin-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R. (2011). Pulsed electric fields processing basics. *Nonthermal processing technologies for food*, 155-175.
- Martínez, J. M., Gojkovic, Z., Ferro, L., Maza, M., Álvarez, I., Raso, J., & Funk, C. (2019). Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource technology*, *289*, 121694.
- Martínez J. M., E. Luengo, G. Saldaña, I. Álvarez, J. C. Raso, (2017). phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Res. Int.* *99*, 1042-1047
- Martínez, J. M., Luengo, E., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2016). C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Research International*, *99*, 1042–1047.
- Memije-Lazaro, I. N., Blas-Valdivia, V., Franco-Colín, M., & Cano-Europa, E. (2018). *Arthrospira maxima* (Spirulina) and C-phycocyanin prevent the progression of chronic kidney disease and its cardiovascular complications. *Journal of Functional Foods*, *43*, 37-43
- Menghwar, P., Yilmaz, E., & Soylak, M. (2018). Development of an ultrasonic-assisted restricted access supramolecular solvent-based liquid phase microextraction (UA-RAS-LPME) method for separation-preconcentration and UV-VIS spectrophotometric detection of curcumin. *Separation Science and Technology*, *53*(16), 2612-2621.

Mercer P., Armenta R.E, 2011. Developments in oil extraction from microalgae, *European Journal of lipid science and Technology* 113(5), 539-547.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4), 407-412.

Mills, G. A. (2003). *Chromatogr. Sep. Technol.* 26, 18.

Mintel (2021). The world's leading market intelligence agency. Global Food and Drink Trends 2021. Retrieved from <https://www.mintel.com/global-food-and-drink-trends>. Accessed January 11, 2021.

Mohanty, B., & Bohidar, H. B. (2003). Systematic of alcohol-induced simple coacervation in aqueous gelatin solutions. *Biomacromolecules*, 4(4), 1080-1086.

Monego, D. L., da Rosa, M. B., & do Nascimento, P. C. (2017). Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: A review. *Food chemistry*, 217, 37-44.

Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Marchal, L. (2015). Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource technology*, 196, 339-346.

Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S. J. (2011). C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 45-49.

Müller L, Fröhlich K, Böhm V. (2011) Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging. *Food Chem* 129:139–148

- *N* -

Nakagawa, K., Ritcharoen, W., Sri-Uam, P., Pavasant, P., & Adachi, S. (2016). Antioxidant properties of convective-air-dried *Spirulina maxima*: Evaluation of phycoyanin retention by a simple mathematical model of air-drying. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 292-302.

Natalello, A., Priolo, A., Valenti, B., Codini, M., Mattioli, S., Pauselli, M., Luciano, G. (2020). Dietary pomegranate by-product improves oxidative stability of lamb meat. *Meat Science*, 162, 108037

Neumann, E., & Rosenheck, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of membrane biology*, 10(1), 279-290.

Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*, 302(2), 71-83.

Nishanth, R. P., Ramakrishna, B. S., Jyotsna, R. G., Roy, K. R., Reddy, G. V., Reddy, P. K., & Reddanna, P. (2010). C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *European journal of pharmacology*, 649(1-3), 74-83

Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Gouveia, L., Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research and Technology*, 223(6), 787-790.

Nooshkam, M., Varidi, M., & Verma, D. K. (2020). Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. *Food research international*, 131, 109003.

Nowak, E., Livney, Y. D., Niu, Z., & Singh, H. (2019). Delivery of bioactives in food for optimal efficacy: What inspirations and insights can be gained from pharmaceuticals? *Trends in Food Science & Technology*, 91, 557-573.

- P -

Pakhomov, A. G., Miklavcic, D., & Markov, M. S. (2010). *Advanced electroporation techniques in biology and medicine*. CRC Press.

Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S., & Raghavarao, K. S. M. S. (2006). Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of chromatography A*, 1127(1-2), 76-81.

Phang, S. M., & Chu, W. L. (1999). University of Malaya Algae Culture Collection. *Catalogue of Strains. Institute of Postgraduate Studies and Research, University of Malaya*. 77pp. ISBN, 983-9578.

Phong, W. N., Show, P. L., Teh, W. H., Teh, T. X., Lim, H. M. Y., binti Nazri, N. S., ... & Ling, T. C. (2017). Proteins recovery from wet microalgae using liquid biphasic flotation (LBF). *Bioresource technology*, 244, 1329-1336.

- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Pan-utai, W., & Iamtham, S. (2019). Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. *Process Biochemistry*, 82, 189-198.
- Parniakov, O., Bals, O., Mykhailyk, V., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). Unfreezable water in apple treated by pulsed electric fields: impact of osmotic impregnation in glycerol solutions. *Food and bioprocess technology*, 9(2), 243-251.
- Patil G., Chethana S., Sridevi A.S., Raghavarao K.S. 2006, Method to obtain C-phycoyanin of high purity, *Journal of Chromatography A*, 1127, 76-81.
- Pavlin, M., & Miklavčič, D. (2008). Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation—relation between short-lived and long-lived pores. *Bioelectrochemistry*, 74(1), 38-46.
- Peña, E. H., Medina, A. R., Callejón, M. J. J., Sánchez, M. D. M., Cerdán, L. E., Moreno, P. A. G., & Grima, E. M. (2015). Extraction of free fatty acids from wet *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel production. *Renewable Energy*, 75, 366-373.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 41:274–285
- Peshkovsky, A. S., Peshkovsky, S. L., & Bystryak, S. (2013). Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 69, 77-82.
- Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques—A comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144-156.
- Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. (2012) Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids* 165:638–647
- Plotka-Wasyłka, J., Rutkowska, M., Owczarek, K., Tobiszewski, M., & Namieśnik, J. (2017). Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 12-25
- Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavisri, M., & Moovendhan, M. (2020). Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer,

antidiabetic and anti-inflammatory effect. *International journal of biological macromolecules*, 153, 256-263.

Psillakis, E., & Kalogerakis, N. (2002). Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(1), 54-64.

Psillakis, E., & Kalogerakis, N. (2003). Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(9), 565-574.

Pyne, S. K., Bhattacharjee, P., & Srivastav, P. P. (2017). Microalgae (*Spirulina platensis*) and its bioactive molecules: Review. *Indian Journal of Nutrition*, 4(2), 1-6.

- Q -

Qin, H., Qiu, X., Zhao, J., Liu, M., & Yang, Y. (2013). Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: determination of glucocorticoids in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1311, 11-20.

- R -

Ranga Rao, A., S. M. Phang, R. Sarada, and G. A. Ravishankar. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review. *Marine Drugs* 12:128–152.

Rashid, F., Bao, Y., Ahmed, Z., & Huang, J. Y. (2020). Effect of high voltage atmospheric cold plasma on extraction of fenugreek galactomannan and its physicochemical properties. *Food Research International*, 138, 109776.

Rasmussen, K. E., & Pedersen-Bjergaard, S. (2004). Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(1), 1-10.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237

Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.

Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, A. M., Carvalho, F., & Fernandes, E. (2018). Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 681-699.

- Rico, M., González, A. G., Santana-Casiano, M., González-Dávila, M., Pérez-Almeida, N., & Tangil, M. S. D. (2017). Production of primary and secondary metabolites using algae. In *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology* (pp. 311-326). Springer, Singapore.
- Rito-Palomares, M., Nunez, L., & Amador, D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76(12), 1273-1280.
- Rizzo, R. F., Santos, B. D. N. C. D., Castro, G. F. P. D. S. D., Passos, T. S., Nascimento, M. D. A., Guerra, H. D., ... & Lima-Araújo, K. G. D. (2015). Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different light conditions for application in food products. *Food Science and Technology*, 35, 247-252.
- Rodrigues, R. D. P., de Castro, F. C., de Santiago-Aguiar, R. S., & Rocha, M. V. P. (2018). Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent. *Algal research*, 31, 454-462.
- Rodriguez-Concepcion M, Avalos J, Bonet ML, Boronat A, GomezGomez L, Hornero-Mendez D, Limon MC, Meléndez-Martínez A, Olmedilla-AlonsoB, PalouA ,Ribot J,Rodrigo MJ, Zacarias L, Zhu C (2018) A global perspective on carotenoids:metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog Lipid Res* 70:62– 93.
- Romay, C. H., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., & Garcia, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflammation research*, 47(1), 36-41.
- Rubio, S. (2020). Twenty years of supramolecular solvents in sample preparation for chromatography: achievements and challenges ahead. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(24), 6037-6058.
- Ruiz, F. J., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2007). Water-induced coacervation of alkyl carboxylic acid reverse micelles: phenomenon description and potential for the extraction of organic compounds. *Analytical chemistry*, 79(19), 7473-7484.
- Ruobing, Z. H. A. N. G., Wei, L. U. O., & CHENG, L. (2007). Effects of pulsed electric field (PEF) on activity and conformation changes of lipoxygenase (LOX). *High Voltage Engineering*, 33(2), 94196.
- S -
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61-65.

- Salatti-Dorado, J. A., García-Gómez, D., Rodríguez-Ruiz, V., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G., & Rubio, S. (2019). Multifunctional green supramolecular solvents for cost-effective production of highly stable astaxanthin-rich formulations from *Haematococcus pluvialis*. *Food chemistry*, 279, 294-302.
- Sánchez-Muros, M. J., Renteria, P., Vizcaino, A., & Barroso, F. G. (2020). Innovative protein sources in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 186-203
- Sankari, M., Rao, P. R., Hemachandran, H., Pullela, P. K., Tayubi, I. A., Subramanian, B., Ramamoorthy, S. (2018). Prospects and progress in the production of valuable carotenoids: Insights from metabolic engineering, synthetic biology, and computational approaches. *Journal of Biotechnology*, 266, 89-101
- Sansone, C., Brunet, C. (2019). Antioxidants 8.
- Santiago-Santos, M. C., Ponce-Noyola, T., Olvera-Ramírez, R., Ortega-López, J., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2004). Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. *Process Biochemistry*, 39(12), 2047-2052.
- Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G., & Ravishankar, G. A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process biochemistry*, 34(8), 795-801.
- Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Ed Tec & Doc lavoisier, 398p.
- Saulis, G. 2010. Electroporation of cell membranes: the fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Engineering Reviews* 2:52–73.
- Scaglioni, P.T., de Oliveira Garcia, S., Badiale-Furlong, E. (2019). Inhibition of in vitro trichothecenes production by microalgae phenolic extracts. *Food Res. Int.* 124, 175–180
- Scheer, H., Zhao, K. H. (2008). Billiprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular microbiology*, 68(2), 263-276.
- Segat, A., Misra, N. N., Cullen, P. J., & Innocente, N. (2016). Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 181-188.

- Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113-136.
- Sereshti, H., Khorram, P., & Nouri, N. (2019). Recent trends in replacement of disperser solvent in dispersive liquid-liquid microextraction methods. *Separation & Purification Reviews*, 48(2), 159-178.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. (2006). Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67: 2058–2070.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., & Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*, 18(7), 800-805.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Shen, G., Schluchter, W. M., & Bryant, D. A. (2008). Biogenesis of phycobiliproteins: I. cpcS-I and cpcU mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for betaphycocyanin and allophycocyanin subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 7503–7512.
- Shen, Q., & Quek, S. Y. (2014). Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 123, 165-171.
- Sicaire, A. G., Vian, M. A., Filly, A., Li, Y., Bily, A., & Chemat, F. (2014). 2-Methyltetrahydrofuran: Main properties, production processes, and application in extraction of natural products. In *Alternative solvents for natural products extraction* (pp. 253-268). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Silva, A., Silva, S. A., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Gullón, P., ... & Prieto, M. A. (2020). Antibacterial use of macroalgae compounds against foodborne pathogens. *Antibiotics*, 9(10), 712.
- Silveira, S. T., Burkert, J. D. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V., & Kalil, S. J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource technology*, 98 (8), 1629-1634.

- Sivathanu, B., Palaniswamy, S. (2012). Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2(4), 276-282.
- Smerilli, A., Balzano, S., Maselli, M., Blasio, M., Orefice, I., Galasso, C., ... & Brunet, C. (2019). Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom *Skeletonema marinoi*. *Antioxidants*, 8(6), 154.
- Soares, A. T., da Costa, D. C., Vieira, A. A. H., Antoniosi Filho, N. R. (2019). Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae. *Heliyon*, 5(4), e01529.
- Soh, L., & Zimmerman, J. (2011). Biodiesel production: the potential of algal lipids extracted with supercritical carbon dioxide. *Green Chemistry*, 13(6), 1422-1429.
- Solymsi, K., & Mysliwa-Kurziel, B. (2017). Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(13), 1194-1222.
- Souza, C. R., Bezerra, W. P., & Souto, J. T. (2020). Marine alkaloids with anti-inflammatory activity: Current knowledge and future perspectives. *Marine Drugs*, 18(3), 147.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Su, C. H., Liu, C. S., Yang, P. C., Syu, K. S., & Chiu, C. C. (2014). Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology*, 123, 64-68.
- Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P. K., Rajendran, K. N., ... & Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- α gene by the same. *Inflammation*, 35(3), 959-966.
- Sudhakar, M. P., Kumar, B. R., Mathimani, T., & Arunkumar, K. (2019). A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. *Journal of Cleaner Production*, 228, 1320-1333.
- Sy, C., Dangles, O., Borel, P., & Caris-Veyrat, C. (2015). Interactions between carotenoids from marine bacteria and other micronutrients: impact on stability and antioxidant activity. *Marine drugs*, 13(11), 7020-7039.

Szczygieł, M., Urbanska, K., Jurecka, P., Stawoska, I., Stochel, G., & Fiedor, L. (2008). Central metal determines pharmacokinetics of chlorophyll-derived xenobiotics. *Journal of medicinal chemistry*, 51(15), 4412-4418.

- T -

Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine drugs*, 9(6), 1101-1118.

Tang, K., Zeng, X.-L., Yang, Y., Wang, Z.-B., Wu, X.-J., Zhou, M., Noy, D., Scheer, H., & Zhao, K.-H. (2012). A minimal phycobilisome: Fusion and chromophorylation of the truncated core-membrane linker and phycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, 1030-1036.

Tanna, B., Choudhary, B., & Mishra, A. (2018). Metabolite profiling, antioxidant, scavenging and anti-proliferative activities of selected tropical green seaweeds reveal the nutraceutical potential of *Caulerpa* spp. *Algal research*, 36, 96-105.

Tavanandi, H. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2019). Recovery of chlorophylls from spent biomass of *Arthrospira platensis* obtained after extraction of phycobiliproteins. *Bioresource technology*, 271, 391-401.

Tavanandi, H. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2020). Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Lwt*, 118, 108802.

Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal research*, 31, 239-251.

Tavanandi, H. A., Vanjari, P., & Raghavarao, K. S. M. S. (2019). Synergistic method for extraction of high purity Allophycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis* and utilization of spent biomass for recovery of carotenoids. *Separation and Purification Technology*, 225, 97-111

Teissié, J., Prats, M., Soucaille, P., & Tocanne, J. F. (1985). Evidence for conduction of protons along the interface between water and a polar lipid monolayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), 3217-3221.

Thangam, R., Suresh, V., Princy, W. A., Rajkumar, M., Senthilkumar, N., Gunasekaran, P., ... & Kannan, S. (2013). C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food chemistry*, 140(1-2), 262-272.

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.

Toepfl, S., V. Heinz, and D. Knorr. 2005. Overview of pulsed electric field processing for food. In *Emerging technologies for food processing*, ed. D. W., Sun, 69–97. London: Elsevier Academic Press.

Toepfl, S., C. Siemer, G. Saldan~a-Navarro, and V. Heinz. 2014. Overview of pulsed electric fields processing for food. In *Emerging technologies for food processing*, 93 –114.

Torres-Valenzuela, L. S., Ballesteros-Gomez, A., Sanin, A., & Rubio, S. (2019). Valorization of spent coffee grounds by supramolecular solvent extraction. *Separation and Purification Technology*, 228, 115759.

Toti, E., Chen, C. Y. O., Palmery, M., Villaño Valencia, D., & Peluso, I. (2018). Non-provitamin A and provitamin A carotenoids as immunomodulators: recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

- V -

van Breemen, R. B., Dong, L., & Pajkovic, N. D. (2012). Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *International journal of mass spectrometry*, 312, 163-172.

Vali Aftari, R., Rezaei, K., Mortazavi, A., & Bandani, A. R. (2015). The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 3080-3091.

Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis research*, 125(3), 423-436.

Verma, D. K., & Thakur, M. (Eds.). (2021). *Phytochemicals in food and health: Perspectives for research and technological development*. CRC Press.

Vernes, L., Abert-Vian, M., El Maâtaoui, M., Tao, Y., Bornard, I., & Chemat, F. (2019). Application of ultrasound for green extraction of proteins from *spirulina*. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. *Ultrasonics sonochemistry*, 54, 48-60.

Vernès, L., Granvillain, P., Chemat, F., & Vian, M. (2015). Phycocyanin from *Arthrospira platensis*. Production, extraction and analysis. *Current Biotechnology*, 4(4), 481-491.

Vorobiev, E., & Lebovka, N. I. (Eds.). (2008). *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*. New York: Springer.

Vieira, F. A., Guilherme, R. J., Neves, M. C., Abreu, H., Rodrigues, E. R., Maraschin, M., ... & Ventura, S. P. (2017). Single-step extraction of carotenoids from brown macroalgae using non-ionic surfactants. *Separation and Purification Technology*, 172, 268-276.

Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., & Withers, S. G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 412(6849), 835-838

- W -

Wang, S. K., Li, Y., White, W. L., & Lu, J. (2014). Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* containing fucoxanthin as potential functional biomaterials against cancer in vitro. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 29-42.

Wang, S., Wu, S., Yang, G., Pan, K., Wang, L., & Hu, Z. (2021). A review on the progress, challenges and prospects in commercializing microalgal fucoxanthin. *Biotechnology advances*, 53, 107865.

Wang F., Y. Guo X., Zhang D. N., Wu Y., Wu T., Chen Z. G., 2015. Ultrasound-assisted extraction and purification of Taurine from the red algae *Porphyra yezoensis*, *Ultrason. Sonochem.* 24, p-p 36–42.

Wang, X. Q., Li, L. N., Chang, W. R., Zhang, J. P., Gui, L. L., Guo, B. J., & Liang, D. C. (2001). Structure of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: A novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 57, 784–792.

Wang, Y.; Kimura, K.; Huang, Q.; Dubin, P. L.; Jaeger, W. *Macromolecules*. 1999, 32, 7128.

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

Weaver, J. C. 2000. Electroporation of cells and tissues. *IEEE transactions on plasma science* 28 (1): February 2000, 24–33, Downloaded from: http://epore.mit.edu/papers/2000_2.pdf.

Weaver, J. C., and Y. A. Chizmadzhev. 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41:135–160.

Wurtzel, E. T. (2019). Changing form and function through carotenoids and synthetic biology. *Plant physiology*, 179(3), 830-843.

- X -

Xiao, H., Zhao, J., Fang, C., Cao, Q., Xing, M., Li, X., Hou, J., Ji, A., Song, S. (2020). Advances in studies on the pharmacological activities of fucoxanthin. *Mar. Drugs* 18 (12), 634.

Xu, L. Q., Pranantyo, D., Neoh, K. G., Kang, E. T., & Fu, G. D. (2016). Thiol reactive maleimido-containing tannic acid for the bioinspired surface anchoring and post-functionalization of antifouling coatings. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(8), 4264-4272.

- Y -

Yabuzaki J. 2017, Carotenoids database: structures, chemical finger prints and distribution among organisms.

Yang, J., Saggiomo, V., Velders, A. H., Cohen Stuart, M. A., & Kamperman, M. (2016). Reaction pathways in catechol/primary amine mixtures: A window on crosslinking chemistry. *PloS one*, 11(12), e0166490.

Yang, J., Stuart, M. A. C., & Kamperman, M. (2014). Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. *Chemical Society Reviews*, 43(24), 8271-8298.

Yang, Z. F., Bai, L. P., Huang, W. B., Li, X. Z., Zhao, S. S., Zhong, N. S., & Jiang, Z. H. (2014). Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis. *Fitoterapia*, 93, 47-53.

Ye, Z. W., Jiang, J. G., & Wu, G. H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnology advances*, 26(4), 352-360.

Yi, S., Wang, W., Bai, F., Zhu, J., Li, J., Li, X., ... & He, Y. (2014). Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of tea polyphenols against *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 451-460.

Yilmaz, E., & Soylak, M. (2014). Supramolecular solvent microextraction of gold prior to its determination by microsample injection system coupled with flame atomic absorption spectrometry. *RSC Advances*, 4(88), 47396-47401.

Yu, D. J., Hwang, J. Y., Chung, S. W., Oh, H. D., Yun, S. K., & Lee, H. J. (2017). Changes in cold hardiness and carbohydrate content in peach (*Prunus persica*) trunk bark and wood tissues during cold acclimation and deacclimation. *Scientia Horticulturae*, 219, 45-52.

Yuan, J. P., & Chen, F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 68(4), 443-448.

-Z-

Zaghoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., ... & Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food chemistry*, 184, 131-139.

Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M., Harun, M. R., Omar, R., & Siajam, S. I. (2017). Subcritical water technology for extraction of phenolic compounds from *Chlorella* sp. microalgae and assessment on its antioxidant activity. *Molecules*, 22(7).

Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., & Chen, F. (2014). Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food & function*, 5(3), 413-425.

Zhang, R., Parniakov, O., Grimi, N., Lebovka, N., Marchal, L., & Vorobiev, E. (2019). Emerging techniques for cell disruption and extraction of valuable bio-molecules of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42(2), 173-186.

Zhang, Y., Kong, X., Wang, Z., Sun, Y., Zhu, S., Li, L., & Lv, P. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. *Renewable Energy*, 125, 1049-1057.

Zhao, W., Zhao, J., Zhao, H., Cao, Y., & Liu, W. (2018). Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: Determination of chiral triazole fungicide in beer samples. *Chirality*, 30(3), 302-309.

Zhou, H., Sun, X., Zhang, L., Zhang, P., Li, J., & Liu, Y. N. (2012). Fabrication of biopolymeric complex coacervation core micelles for efficient tea polyphenol delivery via a green process. *Langmuir*, 28(41), 14553-14561.

Zhou, J., Wang, M., Berrada, H., Zhu, Z., Grimi, N., & Barba, F. J. (2022). Pulsed electric fields (PEF), pressurized liquid extraction (PLE) and combined PEF+ PLE process evaluation: Effects on *Spirulina* microstructure, biomolecules recovery and Triple TOF-LC-MS-MS polyphenol composition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102989.

Zimmermann, G. A., Neil, 1–106. Boca Raton: CRC Press. Zimmermann, U., G. Pilwat, F. Beckers, and F. Riemann. 1976. Effects of external electrical fields on cell membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 3:58–83.

Zhang, J., Z. Sun, P. Sun, T. Chen, and F. Chen. 2014. Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food and Function* 5:413–425.

Annexes

Annexe 01

A- Tableau de l'ANOVA pour le rendement en C-PC (mg/g) après prétraitement par congélation/ décongélation

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	2805,84	1	2805,84	27,64	0,0063
Intra-groupes	406,125	4	101,531		
Total (Corr.)	3211,97	5			

B- Tableau des tests des étendues multiples pour le rendement en C-PC (mg/g) après prétraitement par congélation/ décongélation (Méthode : LSD de Fisher)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	26,75	B
C/D	3	62,5	A

C-Tableau de l'ANOVA pour la pureté après prétraitement par congélation/ décongélation

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	0,0805042	1	0,0805042	0,52	0,5
Intra-groupes	0,617117	4	0,154279		
Total (Corr.)	0,697621	5			

D-Tableau des tests des étendues multiples pour la pureté après prétraitement par congélation/ décongélation

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	2,235	B
C/D	3	2,46667	A

Annexe 02

A- Tableau de l'ANOVA pour le rendement en C-PC (mg/g) après un prétraitement enzymatique

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	2003,85	1	2003,85	219,81	0,0001
Intra-groupes	36,465	4	9,11625		
Total (Corr.)	2040,32	5			

B- Tableau des tests des étendues multiples pour le rendement en C-PC (mg/g) après un prétraitement enzymatique (Méthode : LSD de Fisher)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	26,75	B
EE	3	63,3	A

C- Tableau de l'ANOVA la pureté après un prétraitement enzymatique

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	0,501704	1	0,501704	3,64	0,1291
Intra-groupes	0,551317	4	0,137829		
Total (Corr.)	1,05302	5			

D- Tableau des tests des étendues multiples pour la pureté après un prétraitement enzymatique

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
EE	3	1,65667	A
Contrôle	3	2,235	A

Annexe 03

A- Tableau de l'ANOVA pour le rendement en C-PC (mg/g) après le prétraitement US 40kHz

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	20536,1	6	3422,68	34,65	0,0000
Intra-groupes	1382,89	14	98,7775		
Total (Corr.)	21918,9	20			

B- Tableau des tests des étendues multiples pour le rendement en C-PC (mg/g) après le prétraitement US 40kHz (Méthode : LSD de Fisher)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	26,75	D
40KHz/60mn	3	41,0	D
40KHz/20mn	3	73.75	BC
40KHz/40mn	3	93.25	B
40KHz/30mn	3	129.5	A
40KHz/50mn	3	27,6667	D

C- Tableau de l'ANOVA pour la pureté après le prétraitement US 40kHz

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	3,53301	6	0,588835	6,26	0,0023
Intra-groupes	1,3179	14	0,0941357		
Total (Corr.)	4,85091	20			

D- Tableau des tests des étendues multiples pour la pureté après le prétraitement US 40kHz
(Méthode : LSD de Fisher)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
40KHz/60mn	3	1,125	C
40KHz/20mn	3	1,25	B
40KHz/40mn	3	1,35667	B
40KHz/50mn	3	1,44	B
40KHz/30mn	3	2,15667	A
Contrôle	3	2,235	A

Annexe 04

A- Tableau de l'ANOVA pour le rendement en C-PC (mg/g) après le prétraitement US 30 kHz

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	16337,9	6	2722,98	6,22	0,0024
Intra-groupes	6132,65	14	438,047		
Total (Corr.)	22470,5	20			

B- Tableau des tests des étendues multiples pour le rendement en C-PC (mg/g) après le prétraitement US 30 kHz (Méthode : LSD de Fisher)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	26,75	C
30KHz/20mn	3	42,5	B
30KHz/40mn	3	93,25	B
30KHz/50mn	3	27,67	AB
30KHz/30mn	3	95,3333	AB
30KHz/60mn	3	41	A

C- Tableau de l'ANOVA pour la pureté après le prétraitement US 30 kHz

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	2,32342	6	0,387237	1,56	0,2317
Intra-groupes	3,48455	14	0,248896		
Total (Corr.)	5,80797	20			

D- Tableau des tests des étendues multiples pour la pureté après le prétraitement US 30 kHz
(Méthode : LSD de Fisher)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
30KHz/20mn	3	1,20433	B
30KHz/40mn	3	1,50333	AB
30KHz/60mn	3	1,63	AB
30KHz/50mn	3	1,80667	AB
30KHz/30mn	3	1,83667	AB
Contrôle	3	2,235	A

Annexe 05

A-Tableau de l'ANOVA pour le rendement en C-PC (mg/g) après un prétraitement US 20kHz

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	7306,51	6	1217,75	9,63	0,0003
Intra-groupes	1770,79	14	126,485		
Total (Corr.)	9077,29	20			

B- Tableau des tests des étendues multiples pour le rendement en C-PC (mg/g) après un prétraitement US 20kHz

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	26,75	C
20KHz/20mn	3	64.5	B
20KHz/30mn	3	67,3333	AB
20KHz/50mn	3	71	AB
20KHz/60mn	3	68.25	A
20KHz/40mn	3	84,0	A

C- Tableau de l'ANOVA pour la pureté après prétraitement US de 20kHz

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	1,90413	6	0,317355	1,12	0,3977
Intra-groupes	3,95285	14	0,282346		
Total (Corr.)	5,85698	20			

D- Tableau des tests des étendues multiples pour la pureté après un prétraitement US 20kHz

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
20KHz/60mn	3	1,28	B
20KHz/50mn	3	1,5	AB
20KHz/20mn	3	1,50333	AB
20KHz/30mn	3	1,79667	AB
20KHz/40mn	3	1,99	AB
Contrôle	3	2,235	A

Annexe 06**A-**Tableau de l'ANOVA pour le rendement en C-PC (mg/g) après prétraitement par CEP

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	8126,41	5	1625,28	154,21	0,0000
Intra-groupes	126,476	12	10,5397		
Total (Corr.)	8252,89	17			

B-Tableau des tests des étendues multiples pour le rendement en C-PC (mg/g) après prétraitement par CEP (Méthode: 95,0 % LSD)

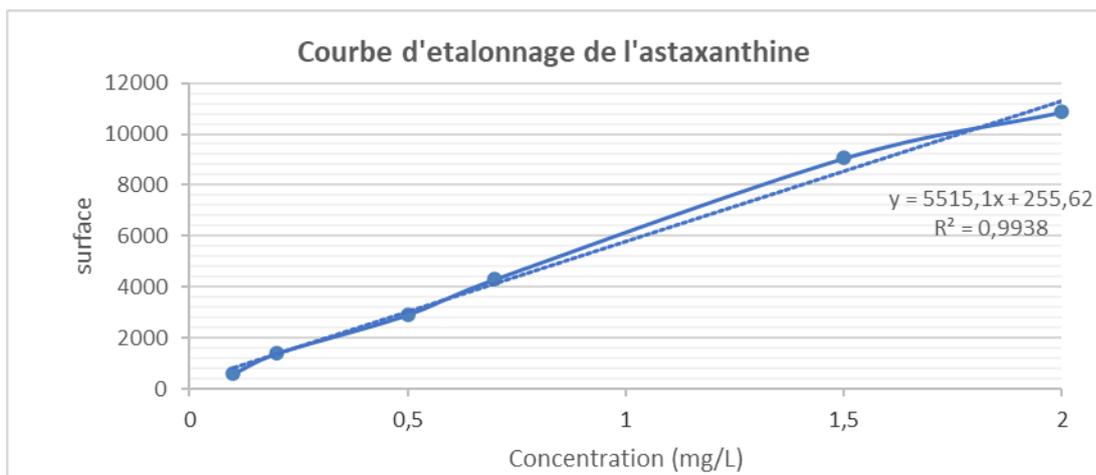
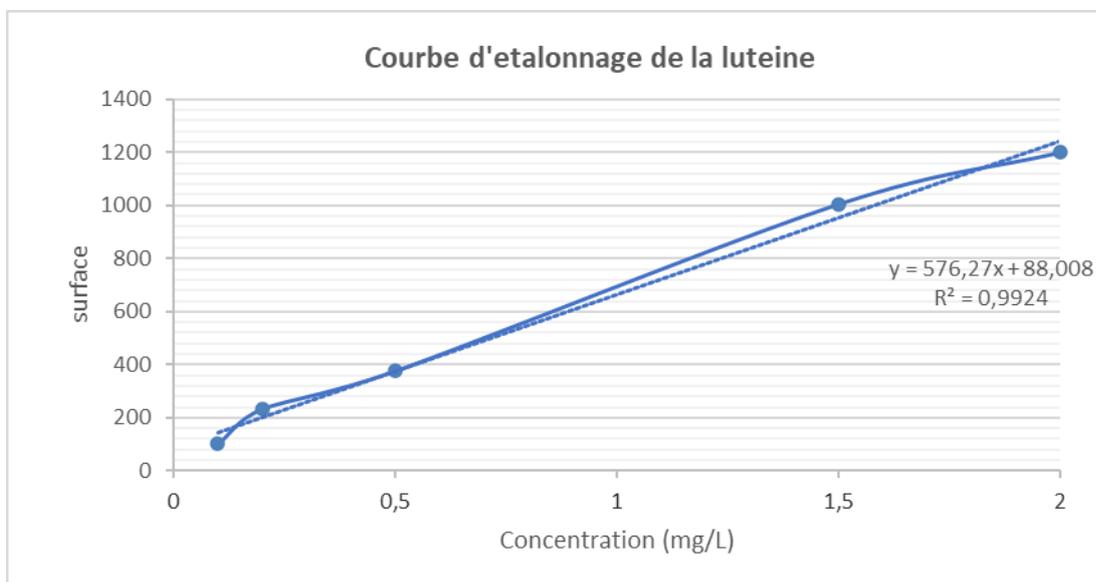
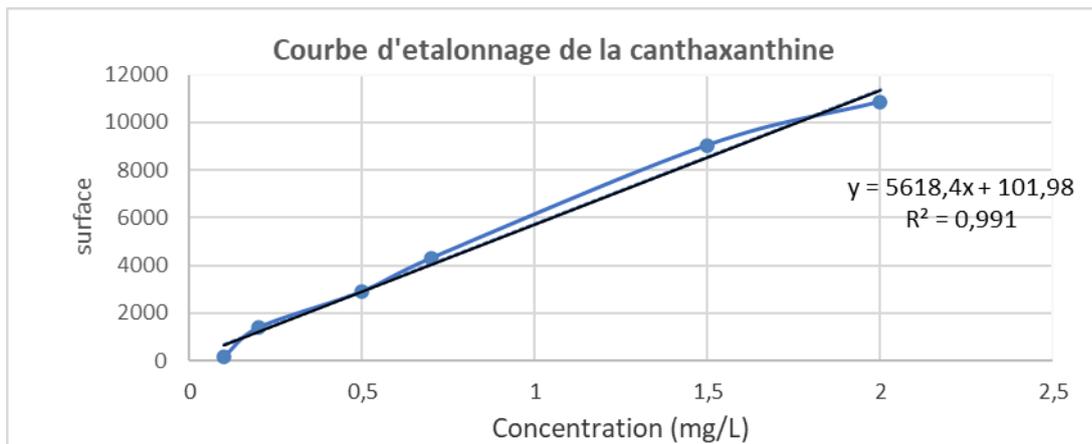
<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
Contrôle	3	26,75	C
CEP04	3	37,0	C
CEP05	3	31,0	C
CEP01	3	57,0	B
CEP02	3	61,5	B
CEP03	3	84	A

C- Tableau de l'ANOVA pour la pureté après prétraitement par CEP

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	1,52425	5	0,30485	5,21	0,0090
Intra-groupes	0,7026	12	0,05855		
Total (Corr.)	2,22685	17			

D-Tableau des tests des étendues multiples pour la pureté après prétraitement par CEP
(Méthode: 95,0 % LSD)

<i>Traitements</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
CEP05	3	1,51	B
CEP04	3	2,00	B
CEP01	3	1,99	A
CEP02	3	2,045	A
CEP03	3	2,13	A
Contrôle	3	2,235	A

Annexe 07

Annexe 08**A. Tableau de l'ANOVA pour Polyphénols par Extrait**

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Ddl</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Inter-groupes	0,00633715	2	0,00316858	1,29	0,3431
Intra-groupes	0,0147906	6	0,0024651		
Total (Corr.)	0,0211278	8			

B. Tests des étendues multiples pour Polyphénols par Extrait (Méthode: 95,0 % LSD). Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher.

<i>Extrait</i>	<i>Effectif</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Groupe homogène</i>
SUPRAS	3	0,271667	A
EM	3	0,31769	A
EE	3	0,334427	A

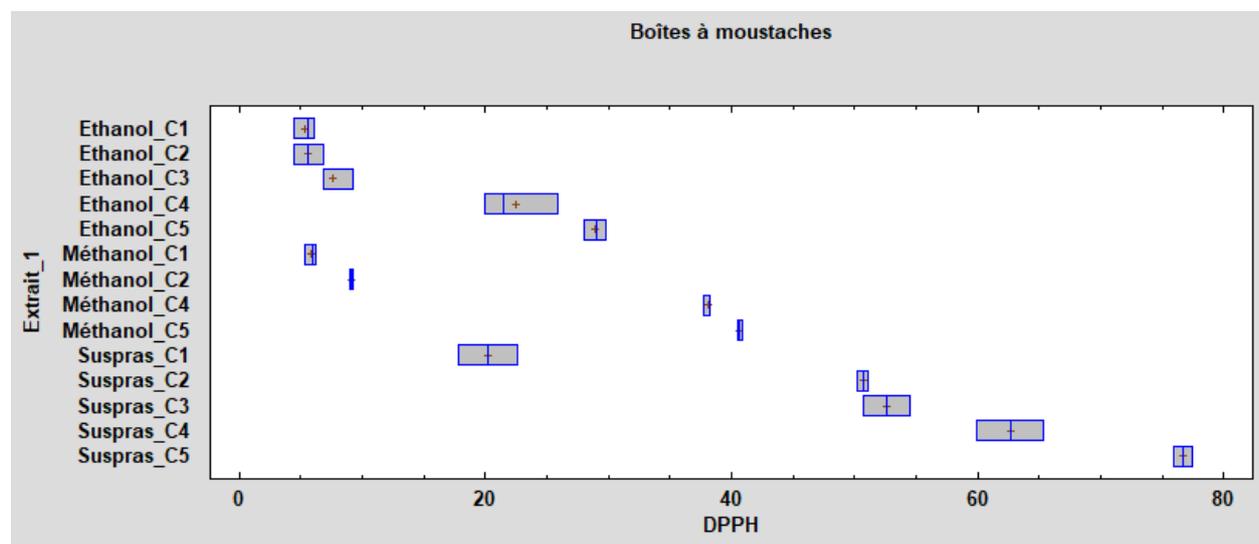
Annexe 09

A. Tableau ANOVA à un facteur du DPPH par Extraits

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	19172,0	13	1474,77	529,83	0,0000
Intra-groupes	64,0203	23	2,78349		
Total (Corr.)	19236,0	36			

B. Tableau des tests des étendues multiples du DPPH par Extraits (Méthode: 95,0 % LSD).
Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher.

Extrait_1	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
EE_C1	3	5,37775	H
EE_C2	3	5,62466	H
EM_C1	3	5,82665	H
EE_C3	3	7,6089	GH
EM_C2	2	9,10443	G
SUPRAS_C1	2	20,1813	F
EE_C4	3	22,4691	F
EE_C5	3	28,9447	E
EM_C4	3	38,0741	D
EM_C5	3	40,6289	D
SUPRAS_C2	2	50,6793	C
SUPRAS_C3	2	52,609	C
SUPRAS_C4	2	62,6703	B
SUPRAS_C5	3	76,7089	A



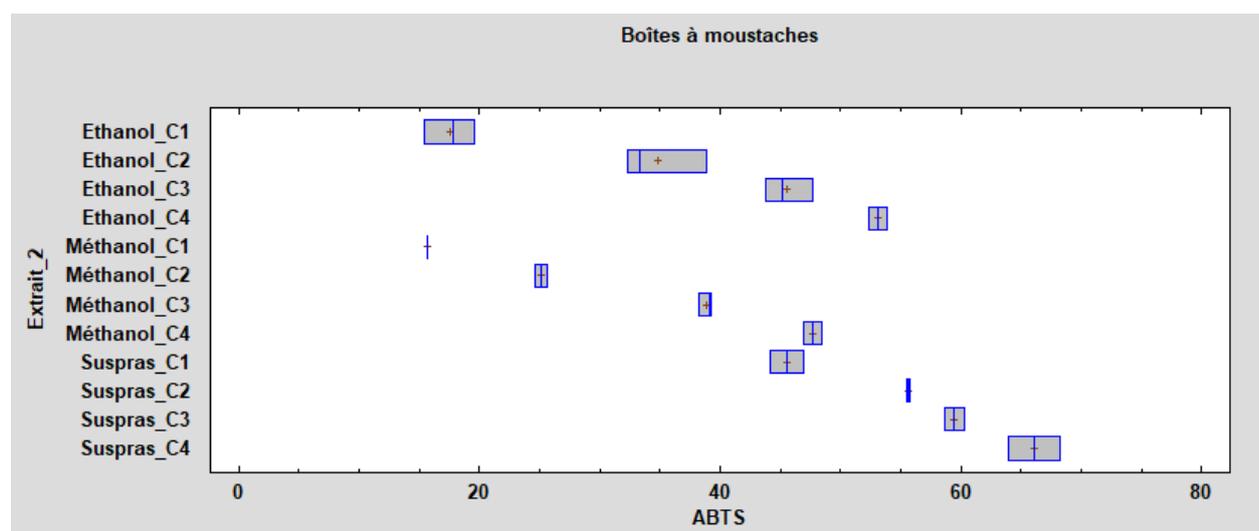
Annexe 10

A. Tableau de l'ANOVA pour ABTS par Extraits

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Inter-groupes	6405,38	11	582,307	157,66	0,0000
Intra-groupes	59,096	16	3,6935		
Total (Corr.)	6464,47	27			

B. Tests des étendues multiples pour ABTS par Extraits (Méthode: 95,0 % LSD). Les lettres en majuscule indiquent les groupes homogènes obtenus par la méthode LSD de Fisher.

Extrait_2	Effectif	Moyenne	Groupe homogène
EM_C1	2	15,6959	H
EE_C1	3	17,6176	H
EM_C2	2	25,1783	G
EE_C2	3	34,8442	F
EM_C3	3	38,8836	E
SUPRAS_C1	2	45,546	D
EE_C3	3	45,5869	D
EM_C4	2	47,7305	D
EE_C4	2	53,1343	C
SUPRAS_C2	2	55,6	BC
SUPRAS_C3	2	59,445	B
SUPRAS_C4	2	66,105	A



Annexe 11

Tableau 01: Corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et l'activité biologique ABTS

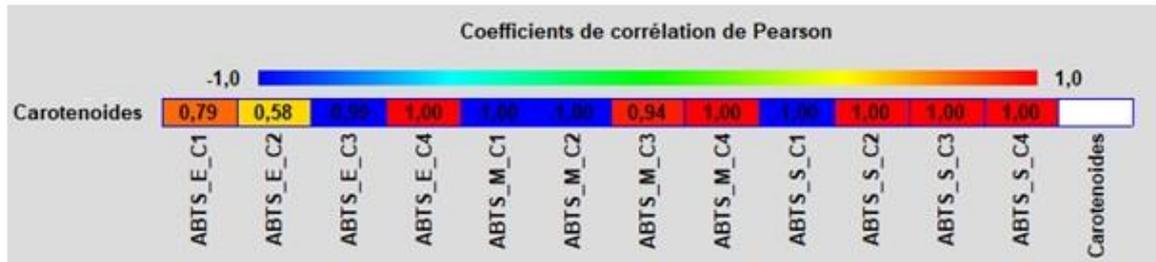


Tableau 02: Corrélation entre les teneurs CPT et l'activité biologique ABTS

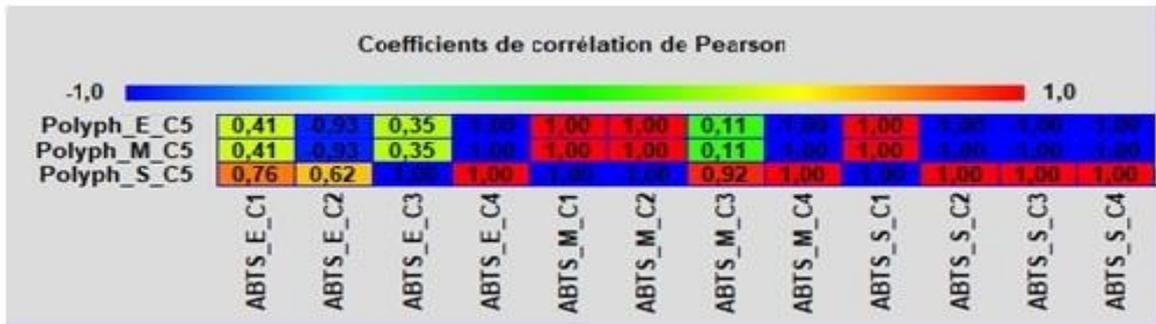


Tableau 03: Corrélation entre les teneurs en caroténoïdes et l'activité biologique DPPH

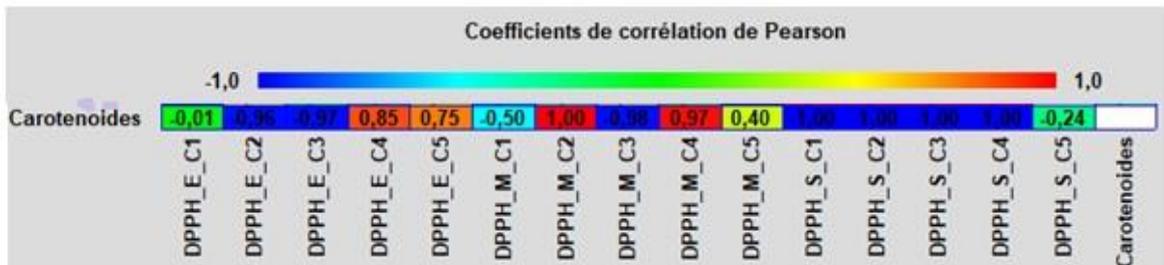
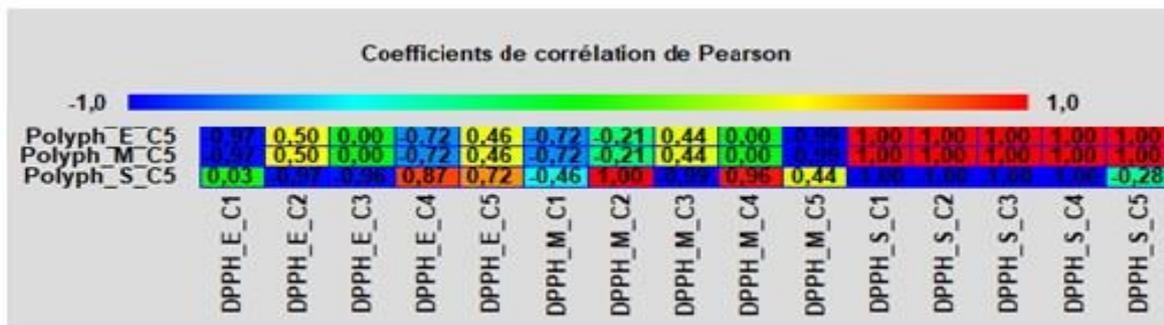


Tableau 04: Corrélation entre les teneurs en CPT et l'activité biologique DPPH



Annexe 12**Tableau:** Transitions caractéristiques LC-MS/MS pour l'identification des caroténoïdes

Composé	Ion- parent	Fragments les plus abondants	Sous classe et formule	References
Neoxanthine	601.8 ([M+H] ⁺)	583.5 ; 565.5 ; 491.4	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	(Gilbert-López et al., 2017)
Violaxanthine	601.5 ([M+H] ⁺)	583.5 ; 565.6 ; 491.5	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	
Astaxanthine	597.4 ([M+H] ⁺)	147.1 ; 173.1 ; 201.1 ; 285.2 ; 379.3 ; 579.4	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	(Van Breemen et al., 2012)
Luteine	551.4 ([M+H-H ₂ O] ⁺)	477.4 ; 119.1 ; 135.1 ; 175.2 ; 416.3 ; 430.3 ; 459.4 ; 495.4	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	
Zeaxanthine	569.4 ([M+H] ⁺)	551.4 ; 477.4 ; 489.4 ; 119.1 ; 135.1 ; 175.2 ; 416.3 ; 459.4	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	
Cryptoxanthine	553.4 ([M+H] ⁺)	535.4 ; 473.4 ; 461.4 ; 119.1 ; 135.1 ; 177.2 ; 400.3	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	
Echinenone	551.4 ([M+H] ⁺)	471.4 ; 459.4 ; 133.1 ; 203.1 ; 255.2 ; 495.4 ; 536.4	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	
β-Apo-8' carotenal	417.3 ([M+H] ⁺)	399.3 ; 325.3 ; 95.1 ; 119.1 ; 157.1 ; 293.2 ; 338.3 ; 361.3 ; 389.3	Oxocarotenoid C ₃₀ H ₄₀ O	
α-Carotene	537.4 ([M+H] ⁺)	457.4 ; 123.1 ; 137.1 ; 177.2 ; 413.3	Carotene C ₄₀ H ₅₆	
β-Carotene	537.4 ([M+H] ⁺)	445.4 ; 457.4 ; 137.1 ; 177.2 ; 269.2 ; 400.3	Carotene C ₄₀ H ₅₆	
Canthaxanthine^a	565.4 ([M+H] ⁺)	427.4 ; 413.0 ; 363.4 ; 361.1 ; 459.2 ; 109.1	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	(Soares et al., 2019)
Fucoxanthin	659.5 ([M+H] ⁺)	567.2 ; 581.6 ; 641.6	Xanthophyll C ₄₀ H ₅₆ O ₄	

^a Composé inconnu montrant la transition de la canthaxanthine en gras ; le temps de rétention et les fragments les plus abondants ne correspondaient pas à ceux de la canthaxanthine.

Publication