

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

Etude de l'activité biologique des extraits de différents solvants d'algue d'eau douce

Présenté par : Melle AIOUANA Aya FZ
Melle BELHOUCHE Rania
Melle OUERNIKI Khadidja

Devant le jury :

Présidente :	Mme. NEBEG Halima	MAA
Rapporteur :	M. SIFI Ibrahim	MCA
Examinatrice :	Mme KRAZA Lamia	MAA

Soutenu publiquement le : Septembre 2020

Remerciements

- ❖ Nous remercions Allah le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience pour l'accomplissement de ce travail.
- ❖ Nous remercions tout d'abord Monsieur SIFI Ibrahim, pour son encadrement, son suivi, sa patience, sa disponibilité et ses conseils.
- ❖ Nous remercions toute la famille de département de Biologie à l'université de Amar Telidji – Laghouat, particulièrement les enseignants de département, pour leur soutien, leur aide, et leur encouragement.
- ❖ Nous remercions le professeur Gouzi Hicham pour son aide.
- ❖ Nous tenons également à remercier profondément les membres de jury à accepter d'évaluer notre travail.
- ❖ Un GRAND MERCI à tous, ceux qui nous ont aidé de près ou de loin

Dédicace

Je dédie ce travail à ma famille.

*À ma mère, ma Sœur Khadîdja, et mes frères Mohamed et
Mahmoud.*

À mes belles-sœurs Amina, et Amina

À ma deuxième mère Aicha

À mes amies.

À tous les gens qui m'ont aidé à achever mon chemin.

Belhouchat Rania

Dédicace

À mon père, mon ange gardien, qui sans lui je ne puisse ni vivre ni arriver à ce que je suis.

À ma mère, la lumière de ma vie, J'espère qu'un jour mon bon Dieu me donne l'occasion de les honorer et rendre ce qu'ils méritent.

À Mes Sœurs Amal et son marie Friha Ritadj Manal et Maroua qui était toujours là pour m'écouter, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute

À Mes frères, Salem Ammar Aymen Salah que Dieu les gardes et les protèges tous.

À mon 2eme père Taleb Souissi qui ma encouragé et conseillé, tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon respect Que Dieu le Tout Puissant te procure, santé et longue vie

À Mes amis proches amies Rania, Somaia, Hassina, Hamida, Aya ...

À tous ceux qui m'aiment et que J'aime.

À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à me remonter le moral et me soutenir dans les moments difficiles.

Quarniki Khadidja

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*A tous ceux grâce à qui je suis la femme que je suis A mes
chères Parents :*

*Sources de mes joies et secrets de ma force, vous m'avez
toujours soutenu, encouragé, supporté durant ces longues
années d'études.*

A mes frères Mohammed et Naim A ma sœur Hasna.

*A ma grand-mère la source de tendresse Hadja Saidat
Kaltoum Que dieu la protège pour nous.*

*A mes tentes adorés saidat el Batoul ,saidat Souad et
Saidat Dalila et Dr . Ait kaci, Saidat Dahbia , Pour son
aide et ses encouragements*

A ma chère amie Marfoua Kheira Djihad

A mes collègues Khadîdja et Rania

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime

Aiouana Aya

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة مقتطفات من سبيرولينا بلاتينسيس في تجربتنا: الجزء الأول يتكون من دراسة لتحليل خصائص السبيرولينا والجزء الثاني هو تحديد المركبات الفينولية مثل متعدد الفينول مع كاشف فولين سيوكالتو. يستخدم حمض الغاليك كمييار ويقارن هذه المحتويات بين ثلاث مستخلصات (إيثانول، أسيتون وكوروفورم) من متعدد الفينول الحالية على التوالي (451.31.446.93.184.62 ملجم EAG / جم بقايا جافة). يتكون عملنا أيضًا من دراسة القوة المضادة للأكسدة، حيث تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للجذور الحرة للمركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات المحضرة عن طريق قياس قدرتها على تنظيف الجذور الحرة حيث يتحول من اللون الأرجواني الداكن إلى اللون الأصفر. أظهر هذا الاختبار أن هذه المستخلصات الفينولية من سبيرولينا بلاتينسيس لها قوة مضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: مسحوق سبيرولينا، مركبات فينولية، كاشف فولين سيوكالتو، نشاط مضاد للأكسدة.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits de la *Spirulina Plantensis*. Dans notre expérimentation : la première partie consiste à l'analyse d'étude les propriétés de la spiruline. La deuxième partie est le dosage des composés phénoliques telles que les polyphénols totaux avec le réactif de *Folin-Ciocalteu* en utilisant l'acide gallique comme standard et en comparant ces teneurs entre ces trois extrait (éthanolique, acétonique et chloroformique.). Ces Derniers présentent des teneurs respectivement (451,31 - 446.93 - 184,62mg EAG/g résidus sec) de polyphénols totaux. Notre travail consiste aussi à l'étude du pouvoir antioxydant, L'activité anti-radicalaire des composés phénoliques contenus dans les extraits préparés a été évaluée par la mesure de leurs capacités de piéger le radical libre DPPH, sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction. Ce test a montré que ces extraits phénoliques présentent un pouvoir anti oxydant.

Mots clés : Poudre de la spiruline. Composés phénoliques, Réactif de *Folin-Ciocalteu*, Pouvoir antioxydant, L'activité anti-radicalaire.

Abstract

The objective of this study is to assess the antioxidant activity of extracts from the *Spirulina Plantensis*. In our experiment: the first part consists of analysis to study the properties of spirulina , The second part is the determination of phenolic compounds such as total polyphenols with the deFolin-Ciocalteu reagent using gallic acid as a standard and compare these levels between these three Extract (ethanolic, acetonic, chloroformic) these Latest present levels respectively (451,31.446,93.184,62mgEAG / g dry residue) of polyphenols totals.

Keywords : Spirulina powder, Phenolic compounds, Folin-Ciocalteu reagent

SOMMAIRE

Remerciements	2
Dédicace.....	3
ملخص.....	i
Résumé.....	i
Abstract	i
SOMMAIRE.....	ii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	v
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. Généralité sur la spiruline	2
1.1. Introduction	2
1.2. Taxonomie	3
1.3. Morphologie.....	4
1.4. Cycle biologique et habitat.....	5
1.5. Utilisation et les bienfaits de la spiruline	7
1.6. Composition biochimique de la spiruline.....	7
2. Stress oxydatif et activité antioxydante	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Type d'antioxydant.....	8
2.3. Propriétés antioxydantes de la spiruline.....	9

3. Travaux scientifiques sur la spiruline.....	10
3.1. Effet neuroprotecteur.....	10
3.2. Effet hépatoprotecteur	10
3.3. Effet néphroprotecteur.....	11
3.4. Effet cardioprotecteur	11
3.5. Études portant sur les mécanismes d'action.....	12
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL et MÉTHODES	13
1. Objectif	14
2. Matériel utilisé.....	14
2.1. Matériel et produits chimiques.....	14
2.2. Matériel végétal.....	15
3. Méthode d'extraction des composés phénolique.....	15
3.1. Préparation des extraits	15
3.2. Calcule de rendement d'extraction.....	17
4. Dosages des composés phénoliques	17
4.1. Dosage des polyphénols totaux	17
4.2. Dosage des flavonoïdes	18
5. Evaluation de l'activité antioxydante	18
5.1. Méthode de piégeage de radical libre DPPH•	19
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS et DISCUSSION	21
1. Résultats du rendement d'extraction	22
2. Résultat de dosage des phénols totaux.....	23
CONCLUSION	26
Références bibliographiques.....	27

LISTE DES ABREVIATIONS

ABS :	Absorbance
ABTS :	2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium
AG :	Acide gallique
ARN:	Acide RiboNucléique
Ca :	Calcium
CAT :	Catalase
DPPH :	2,2-diphényle-1- picrylhydrazyl
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
FDA:	Food and Drug Administration
Fe :	Fer
FRAP :	Ferric reducing antioxidant power
Glu :	Glucides
GPx :	Glutathion peroxydase
MeOH :	Méthanol
Mg :	Magnésium
Na₂CO₃ :	Carbonate de sodium
OMS :	Organisation Mondiale de la santé
ORAC :	Oxygen radical absorbance capacity
PH :	Potentiel d'hydrogène
ROS :	Reactive Oxygen Species
SOD :	Super Oxyde Dismutase
UNESCO:	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evaluation des micro- et des macroalgues sur la terre	2
Figure 2 : Spirulines observées au microscope	3
Figure 3 :Les différentes forme de la spiruline. A: forme spiralée , B: Forme ondulée, C: Forme droites (Charpy <i>et al.</i> , 2008)	4
Figure 4 :Cycle biologique de la Spiruline selon (Charpy <i>et al.</i> , 2008).....	5
Figure 5 :La teneur nutritive de la spiruline (matière sèche) (Clement, 1975; Fox, 1999)..	7
Figure 6 : Photo illustrant l'échantillon de la spiruline en poudre	15
Figure 7 : Protocole d'extraction des composés phénoliques	16
Figure 8 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004)	19
Figure 9 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique	23

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :Comparaison entre <i>Arthrospira plantensis</i> et <i>Arthrospira maxima</i>	3
Tableau 2 :La taxonomie de la spiruline (Boone & Castenholz, 2001)	4
Tableau 3 : Distribution géographique naturelle de <i>Spirulina platensis</i> (Sguera, 2008).....	6
Tableau 4 : Les appareils et produits chimiques utilisé	14
Tableau 5 : La masse et le rendement d'extraction de chaque extrait.....	22
Tableau 6 : Teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante.....	23

INTRODUCTION

L'environnement marin est un écosystème rendu unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Parmi ses organismes, les algues qui sont des plus anciennes formes de vie, apparue sur la terre il y a environ trois milliards et demi d'années (Cruchot, 2008).

Les algues regroupent un vaste ensemble des végétaux des formes et des tailles variables, incluant à la fois les macroalgues et les microalgues.

Les cyanobactéries (cyanobacteria), Également connues sous le nom d'algues bleues ou autrefois bleu-vert. Elles désignent l'unique groupe qui capable à réaliser une photosynthèse avec production d'oxygène (Morris *et al.*, 2001). Parmi elle existe le genre *spirulina Platensis* (ou *Arthrospira Platensis*) Plus connue sous le nom spiruline.

La spiruline consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique (Par les kanembous du Tchad) et d'Amérique (Par les Aztèques) (Vidalo, 2008). Elle est qualifiée par l'OMS de « meilleur aliment pour l'humanité du XXIème siècle », « d'aliment idéal et le plus complet de demain » par l'UNESCO, et pour la FDA « l'une des meilleures sources de protéines ».et par le ministère de la santé chinois de « complément alimentaire de premier ordre » (Manet, 2016).

En effet, elles ont des potentialités nutritionnelles très riches. Compte tenu de ses teneurs en protéines, lipides, glucides ainsi que des vitamines, des minéraux de la chlorophylle. Ces divergences sont liées à plusieurs facteurs : L'existence de différentes souches de spirulines, les conditions de culture, la période de récolte, l'origine géographique, le procédé de récolte, de séchage, de broyage, de conditionnement.

Grâce à son contenu remarquable, la Spiruline a fait l'objet de plusieurs d'études scientifiques du fait de sa possible utilisation comme source de produits à vertus thérapeutiques.

Aujourd'hui, la spiruline nous est proposée dans l'alimentation humaine comme complément alimentaire de haute qualité, comme aliment thérapeutique dans le traitement de certaines maladies, tels que les maladies cardiovasculaires, les cancers ou les infections virales,

Introduction

Le présent travail est organisé en deux volets :

La première partie concerne une synthèse bibliographique qui est répartie en deux chapitres : le premier chapitre dans lequel nous allons approfondir le contexte général de l'étude dans une brève généralité sur la spiruline et le second.

La deuxième partie est la partie expérimentale qui renferme les méthodes utilisées pour l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante via les algues bleu-vertes du genre *Arthrospira Platensis* ainsi que la présentation des résultats phytochimiques et leur discussion. Et en fin, une conclusion générale de l'ensemble des travaux réalisés.

CHAPITRE 1 :

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité sur la spiruline

1.1. Introduction

Les ancêtres consomment les algues depuis milliers d'années pour ses vertus nutritionnelles et pharmacologiques. Le terme « *algue* » désigne un vaste groupe d'organismes hétérogènes, elle sont capable de produit leur matière organique (énergie et sucre) par l'utilisation de soleil (photosynthèse) , certains sont aquatique et l'autre sont terrestre. Les algues vivent dans l'eau douce ou dans l'eau salée (Mouritsen, 2015).

Les algues ont des tailles variables, divisés en deux groupe (Hortense, 2011) :

Les macroalgues : peuvent être classées selon les critères basés sur leur composition pigmentaire permet de définir trois grand groupe (Person, 2010).

- ✓ Les algues brunes (Phéophycées)
- ✓ Les algues rouge (Rhodophycées)
- ✓ Les algues vertes (Chlorophycées)

Les microalgues : ces sont bien connues de tous, les microalgues ou algue bleue présentent une formidable diversité que ce soit par le nombre d'espèces ou pas leur forme et leur biologie.

La spiruline est une des premières formes de vie sur la planète terre. Anciennement appelé algue bleue ou bleu-vert, mais c'est plus précisément une cyanobactérie (Gelin, 2015). Elle est photoautotrophe et pouvant être bactérie de Gram négatif, du genre *Arthrospira*. (Charpy *et al.*, 2008).

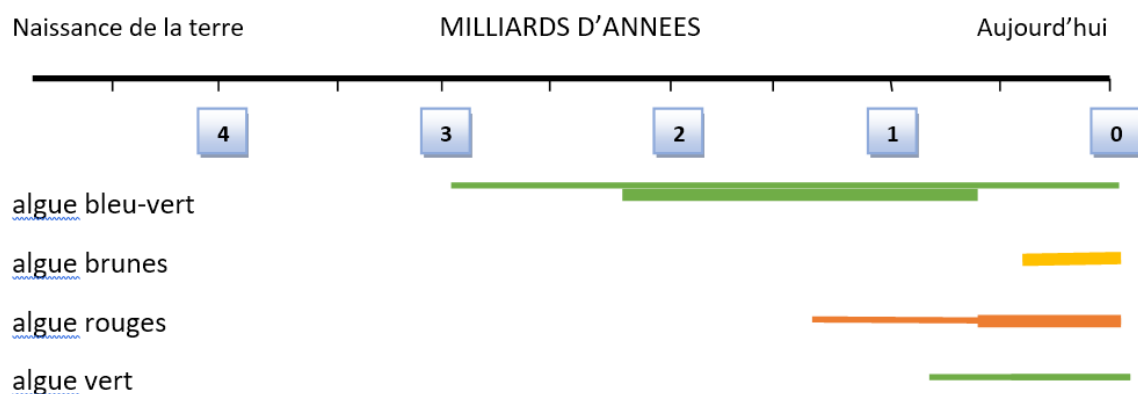


Figure 1 : Evaluation des micro- et des macroalgues sur la terre

De plus, elle riche en protéine, en lipides totaux, en glucides, en vitamines (liposolubles et hydrosolubles), en minéraux en oligoéléments, et en pigments (Barry *et al.*, 2014).

Ainsi que les sels minéraux, des acides gras essentielles de type oméga-3 ou oméga-6. Elle contient autant de potassium que de sodium (Mouritsen, 2015).



Figure 2 : Spirulines observées au microscope

1.2. Taxonomie

Sous le nom spiruline on désigne deux espèces de microalgues bleu-vert, *Arthrospira plantensis* et *Arthrospira maxima* ou « *Arthrospira geitler* » (Cruchot, 2008).

Tableau 1 : Comparaison entre *Arthrospira plantensis* et *Arthrospira maxima*





	<i>Arthrospira plantensis</i>	<i>Arthrospira maxima</i>
Origine	Des lacs du Tchad	Lac de texcoc au Mexique
Trichomes	Atteignant 350µm de long et entre 6 et 12,45 µm de diamètre	70 à 80 µm de long de 7 à 9µm de diamètre
Tours de spires	Diamètre de 20 µm à 50 µm de spire	3 à 8 tours et de 40 à 60µm de diamètre
	 	 

Tableau 2 :La taxonomie de la spiruline (Boone & Castenholz, 2001)

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

1.3. Morphologie

La cyanophycée, de longueur moyenne environ de 250µm, flottent librement sous de filaments multicellulaires de diamètre de 10 à 12 µm, non ramifié et enroulé en 6 ou 7 spires. (Cruchot, 2008). La spiruline constituée des cellules transparentes empilées bout à bout ormant ainsi un filament ou trichome. L'enroulement du trichome sur lui-même, et sa forme hélicoïdale qui donnant son appellation « Spiruline » (Mühling *et al.*, 2005).

La spiruline ne possède pas les cellules spécialisées permettant la fixation de l'azote de l'air (Cruchot, 2008).

La forme change en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu. Même que dans un même milieu on remarque des variétés des formes.

Cela signifie les trois formes présente dans la figure (figure 3) (Fox, 1999)

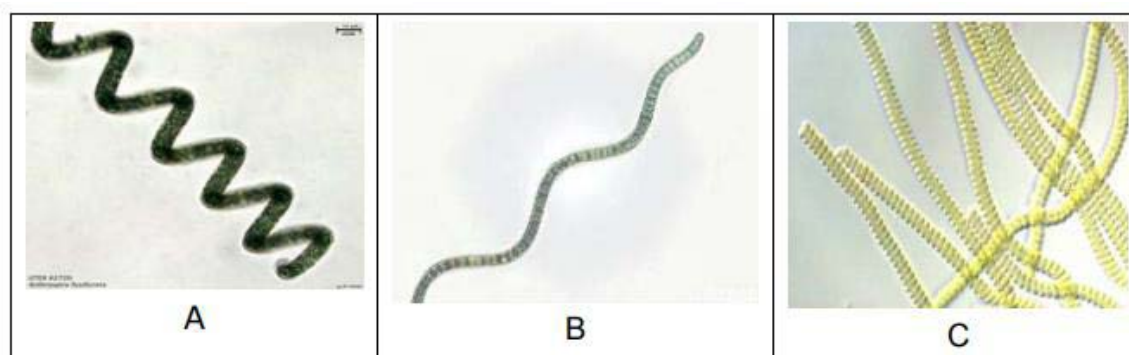


Figure 3 :Les différentes forme de la spiruline. A: forme spiralée , B: Forme ondulée, C: Forme droites (Charpy *et al.*, 2008)

1.4. Cycle biologique et habitat

La reproduction est végétative, c'est à dire asexuée qui suit le principe de la bipartition.

La multiplication de la spiruline est très rapide, de temps varient de quelque heures (7 heures) donc s'effectue par scission simple, et par segmentation des filaments en plusieurs étapes.

Une fois la maturité atteinte, les filaments de la spiruline forment des nécruries, des cellules ayant un aspect concave.

Il s'ensuit une fragmentation du trichome à partir des nécruries aboutissant à de nouveaux filaments constitués de 2 à 4 cellules appelées hormogonies.

Ces derniers croissent par division binaire et prennent la forme typique hélicoïdale, chacune des cellules donne deux cellules par scissiparité (Zarrouk,1966).

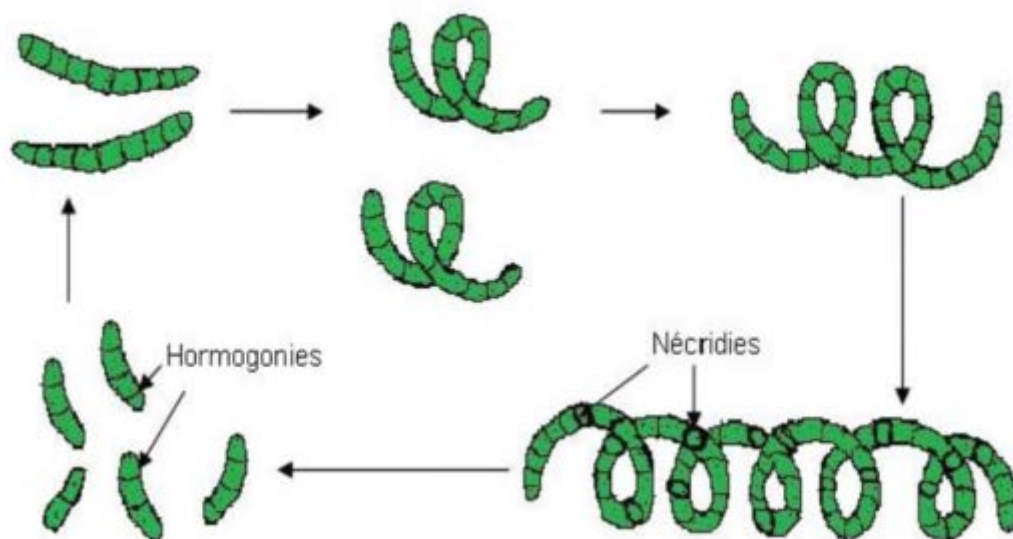


Figure 4 : Cycle biologique de la Spiruline selon (Charpy *et al.*, 2008)

Le développement de la spiruline est favorisé dans les eaux chaudes, alcalines et riche en nutriments, ainsi que dans les lacs salins. En plus de ces besoins ont à la lumière et l'aire de répartition (Boone & Castenholz, 2001).

La souche utiliser dans ce travail est une spirilune de l'espèce *Arthrospira plantensis*, originaire de Pérou est un pays de l'ouest de l'Amérique du sud , cultivé dans la ferme spirilune Algérienne Oran

Tableau 3 : Distribution géographique naturelle de *Spirulina platensis* (Sguera, 2008)

AFRIQUE	
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du kanem : lacs Latin, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, liwa, Iseïrom, Ounianga kebie
Soudan	Cratère de Djebel Marra
Djibouti	Lac Abber
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe
Congo	Mougounga
Kenya	Lacs Nakuru, Elmentieta, Cratère, Natron
Tanzanie	Lac Natron
Tunisie	Lac Tunis, chott el Jerid
Zambie	Lac Bangweoulou
Madagascar	Beaucoup de petits lacs près de Toliara
ASIE	
Inde	Lacs Lonar et Nagpur
Myanmar	Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank
Sri Lanka	Lac Beïra
Pakinstan	Mares près de lahore
Thaïlande	Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de Radburi, 80 km au S.O de Bangkok
Azerbaïdjan	<i>non précisé</i>
AMERIQUE DU SUD	
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas près de l'île d'Amantani Dans le lac Titicaca
Mexique	Lac Texcoco ; lac Cratère
Uruguay	Mantevideo
Equateur	Lac Quillitoa : cratère de 1km de diamètre
AMERIQUE DU NORD	
Californie	Oakland ; Del Mar Beach
Haiti	Lac Gonâve
République Dominicaine	Lac Enriquillo
EUROPE	
Hongrie	<i>non précise</i>
France	Camargue
AUTRES SITES POSSIBLE	
Partout où vivent le flamant nain, <i>Phoenicoenias minor</i> (Afrique et Asie) et le flamant de James, <i>Phoenicoparrus jamesi</i> (Amérique du sud)	
Ethiopie	Lac Abiata
Kenya	Lac Rodolphe ; lac Hannington
Tanzanie	Lac Manyara ; lac Rukua
Zambie	Lac Mweru
Botswana	Makgadigka Salt Pans
Namibie	Etosha Salt Pan
Afrique du Sud	Etat libre d'Orange, près de vaaldam
Bolivie	Lacs Colorado, Poopo, Chalvin, Salar de Uyuni
Chili	Aguas Calientes, Lagunas Brava, lac Vilama, salar De surire
Mauritanie	Côte sud
Inde	Rann of Kutch ; Gujarat
Madagascar	Côte Ouest

1.5. Utilisation et les bienfaits de la spiruline

Nombreuses études montrent que la spiruline possède des bienfaits exceptionnels par rapport au contenu nutritionnel la plus riche et le contenu thérapeutique pour l'homme. (Barry *et al.*, 2014) les bienfaits les plus intéressants comme suivants :

à l'usage humaine

La lutte contre la famine et la malnutrition (Simpore *et al.*, 2006; Teas *et al.*, 2004). La régulation de la prolifération et la différenciation de la moelle osseuse (Schwartz & Shklar, 1987). Effet immunomodulateur, anti-inflammatoire, anticancéreux, hépatoprotecteur (Mathew *et al.*, 1995). Anti-diabétique (Parikh *et al.*, 2001). Effet thérapeutique cardiovasculaires (Samuels *et al.*, 2002). Activité anti-inflammatoire sur les articulations (Remirez *et al.*, 2002b).

à l'usage animale

Favoriser la croissance et la fertilité (James *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Renforcer les défenses immunitaires (Watanuki *et al.*, 2006). Augmenter la pigmentation (Regunathan & Wesley, 2006).

1.6. Composition biochimique de la spiruline

La Spiruline utilisée en alimentation humaine grâce à de nombreux facteurs nutritifs les plus intéressantes présentes. La composition chimique des Spirulines est variable selon les conditions de culture (Clement, 1975).

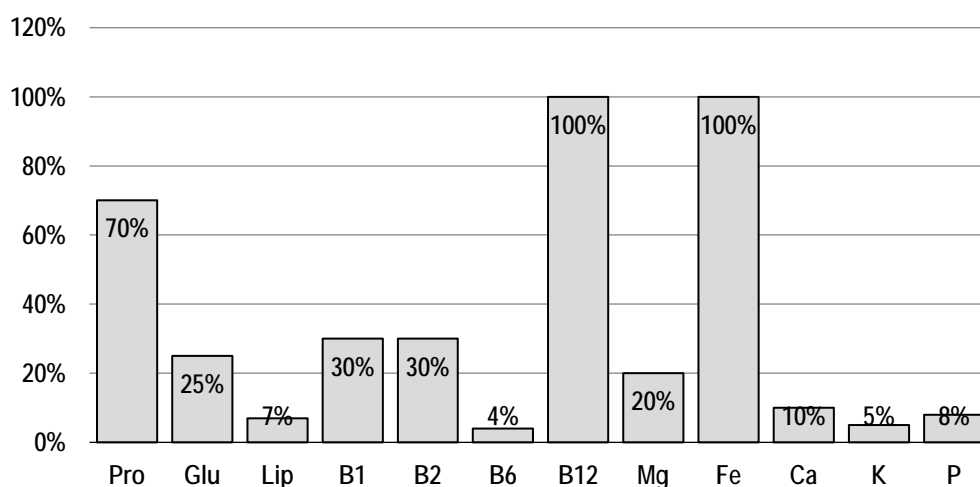


Figure 5 :La teneur nutritive de la spiruline (matière sèche) (Clement, 1975; Fox, 1999)

2. Stress oxydatif et activité antioxydante

Le stress oxydatif et l'immunité dysfonctionnelle causent de nombreuses maladies chez les humains, y compris l'athérosclérose, l'hypertrophie cardiaque, l'insuffisance cardiaque et l'hypertension (Wu *et al.*, 2016). Ainsi, les activités antioxydantes, immunomodulatrices et anti-inflammatoires de ces microalgues peuvent jouer un rôle important dans la santé humaine.

2.1. Définition

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation (Shimizu, 2004).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron unique sur leur couche périphérique. Ils sont produits de manière physiologique au cours du métabolisme de l'oxygène, mais en très faible quantité.

Au cours du stress oxydant, On observe une production importante de ces radicaux libres. L'électron libre de ces radicaux est porté par un atome d'oxygène, on les nomme les espèces réactives de l'oxygène (ROS ou ERO) ou espèces radicalaires dérivés de l'oxygène. Il en existe différents types (le radical super oxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, les radicaux peroxydes, les hydroperoxydes, ou encore les radicaux alkoxydes).

On peut donc définir le stress oxydatif intracellulaire comme un déséquilibre de la balance entre la production d'ERO et la capacité antioxydante de la cellule à empêcher les lésions oxydatives (Wu *et al.*, 2016).

2.2. Type d'antioxydant

Les systèmes moléculaires qui aident l'organisme à se protéger et à lutter contre le stress oxydant sont les antioxydants endogènes et exogènes. Ils agissent comme capteurs des radicaux libres.

En ce qui concerne **les antioxydants exogènes**, on retrouve :

- Des micronutriments : vitamines (A, C, E), zinc, sélénium.
- Des cofacteurs aux micronutriments : vitamines B2, B3 et B9.
- Des microconstituants oxydants comme les polyphénols.

En ce qui concerne **les antioxydants endogènes**, on retrouve :

- Le NO (Nitric Oxide) qui a un double statut d'antioxydant et d'oxydant suivant les pathologies et les processus physiologiques en cause.
- Les enzymes antioxydantes tel que le super oxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPx), la NADPH oxydase et la xanthine oxydase.
- Les systèmes antioxydants non enzymatiques telles que le glutathion, la bilirubine, les oestrogènes, l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque (Delattre *et al.*, 2005).

2.3. Propriétés antioxydantes de la spiruline

En ce qui concerne les propriétés antioxydantes de la spiruline nous retrouvons que la spiruline.

La 1^{er} études (Ahounou, 2018)

- Est une source extrêmement riche en antioxydants, caroténoïdes tels que le bêta-carotène (provitamine A) et en zéaxanthine.
- Une source avérée de nutriments compensant le manque d'antioxydants.
- Possède des propriétés antioxydantes et tonifiantes.

Quelques laboratoires associent l'activité antioxydante de la spiruline à sa riche composition en antioxydants à savoir : le β carotène et la zéaxanthine. Pour d'autres, cette propriété est principalement liée à la présence de phycocyanine.

La 2^{ème} étude (Goulamabasse, 2018)

- La spiruline active les enzymes antioxydantes cellulaires,
- Inhibe la peroxydation des lipides et les dommages à l'ADN,
- Piège les radicaux libres et augmente l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase.

Les essais cliniques montrent que la spiruline prévient les lésions musculaires squelettiques dans des conditions de stress oxydatif induit par l'exercice et peut stimuler la production d'anticorps et réguler à la hausse ou à la baisse l'expression des gènes codant les cytokines pour induire des réponses immunomodulatrices et anti-inflammatoires.

Le mécanisme moléculaire par lequel la spiruline induit ces activités n'est pas clair, mais la phycocyanine et le β -carotène sont des molécules importantes (Wu *et al.*, 2016).

3. Travaux scientifiques sur la spiruline

3.1. Effet neuroprotecteur

Une première étude de Bermejo-Bescós *et al.* (2008), révèle que phycocyanine exerce son effet antioxydant en maintenant les activités des antioxydants cellulaires endogènes que sont les enzymes. Elle agit sur la glutathion peroxydase totale, et augmente la réduction du glutathion contre le stress oxydant induit par le fer dans les cellules.

Une autre étude de Min *et al.* (2015), portant sur des modèles de tissus d'astrocytes a montré que la phycocyanine améliorait la survie et la capacité de prolifération de ces cellules. Pour ce faire, elle affaiblit la capacité d'oxydation et augmente la capacité de piégeage des radicaux libres provoquant l'apoptose des astrocytes. De plus, elles ne provoquent pas de dommages aux astrocytes ni aux neurones normaux.

D'autres chercheurs (Mitra *et al.*, 2015) ont comparé les effets protecteurs de phycocyanine et de la N-acétylcystéine (une molécule connue pour ces propriétés mucolytiques et étudiée pour ces propriétés neuroprotectrices) sur la neurotoxicité induite par le chlorure de tributylétain. Cette étude comparative montre que les deux molécules réduisent l'oxydation et l'inflammation, mais suivant des mécanismes différents. La N-acétylcystéine régule les enzymes liées à la voie d'oxydation, alors que C-phycocyanine régule les ROS.

Au vu de ces résultats, il a été conclu dans les travaux de publication Liu *et al.* (2016), que la phycocyanine est un agent neuroprotecteur potentiel qui peut être utilisé pour traiter les lésions neuronales induites par le stress oxydatif dans les pathologies neurodégénératives telles que l'AVC ischémique, la maladie d'Alzheimer, ou encore la maladie de Parkinson.

3.2. Effet hépatoprotecteur

Une étude de Ramirez *et al.* (2002a) a évalué les effets de la C-phycocyanine sur les fonctions cellulaires de Kupffer, des macrophages spécifiques au système hépatique. Elle montre que la C-phycocyanine peut réduire de manière significative la phagocytose de ces cellules hépatiques et ses effets délétères, contribuant ainsi à l'abolition de la réponse induite par le stress oxydatif.

3.3. Effet néphroprotecteur

Dans une première étude portant sur des cellules mésangiales rénales cultivées, la C-phycoyanine prévient l'apparition de la néphropathie diabétique en inhibant la production de superoxyde dépendant de NADPH (Zheng *et al.*, 2013).

L'étude de Farooq *et al.* (2014) a porté sur l'induction d'un stress oxydatif par l'acide oxalique sur des cellules rénales canines. La C-PC a permis la prévention des dommages cellulaires par la diminution des ROS et la peroxydation lipidique dans les cellules. Elle fournit une protection contre la perméabilité de la membrane mitochondriale et augmente la production d'ATP.

3.4. Effet cardioprotecteur

Le métabolisme des lipides, le stress oxydatif et les dommages mitochondriaux jouent un rôle important dans les maladies cardiovasculaires.

Une étude de Riss *et al.* (2007) portant sur des animaux souffrant d'athérosclérose a confirmé que C-PC améliore de manière optimale les dommages inflammatoires causés par le stress oxydatif en inhibant l'activité des radicaux libres et la formation de COX-2. Et elle augmente les niveaux d'enzymes antioxydantes dans le corps. De plus, elle régule le taux de lipides sanguins.

D'autre étude (Li *et al.*, 2013), a analysé les propriétés antioxydantes et la capacité de chélation du fer de la C-PC. Il a été observé une inhibition de la production de radical hydroxyle, peroxyde, et du processus de peroxydation lipidique. De plus, on observe une diminution du spectre d'émission des ions de fer qui constitue un indicateur de l'activité chélatrice des métaux.

À la suite des différentes études portant sur le potentiel antioxydant de la phycoyanine au niveau cérébral, hépatique, rénal, cardiaque et oculaire, il a été conclu par Liu et ses collaborateurs que les propriétés antioxydantes de *S. platensis* et plus particulièrement de la phycoyanine, provenaient à la fois du piégeage des radicaux et de la chélation des métaux. Les auteurs suggèrent l'utilisation de *S. platensis* comme complément alimentaire dans la prévention de certaines pathologies impliquant des radicaux libres (Liu *et al.*, 2016).

3.5. Études portant sur les mécanismes d'action

Il n'existe pas d'études spécifiques portant sur le mécanisme d'action de la spiruline dans le stress oxydant. Mais la composition de la spiruline a souvent été citée par les chercheurs pour expliquer cette propriété antioxydante.

- ✓ D'après Braakhuis & Hopkins (2015), la spiruline contient des tocophérols, du β -carotène, des polyphénols et des phycyanines, qui ont tous une activité antioxydante.
- ✓ Dans les travaux de publication de Martínez-Galero *et al.* (2016), il est précisé que c'est la synergie des différents composants antioxydants à savoir : le β -carotène, le tocophérol, les composés phénoliques et la teneur en phycocyanine qui est à l'origine de cette action anti oxydante.
- ✓ D'après les travaux de publication de Liu *et al.* (2016), la phycocyanine exerce un rôle antioxydant en :
 - Piégeant les radicaux libres.
 - Régulant les ROS.
 - Augmentant l'activité des antioxydants endogènes (CAT, GPx, ROS).
 - Chélatant les métaux.

CHAPITRE 2 :

MATÉRIEL et MÉTHODES

1. Objectif

Nous avons réalisé notre travail de fin d'étude au sein de le laboratoire de biochimie au département de Biologie à l'université Amar Téliidji – Laghouat.

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante de différents extraits de de la spiruline (*Arthrospira platensis*) par la méthode DPPH. Le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail sont décrits ci-dessous.

2. Matériel utilisé

2.1. Matériel et produits chimiques

Les appareils et les produits chimiques utilisés sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Les appareils et produits chimiques utilisé

Appareils et instruments	Caractéristiques/fabricant
Rota vapeur	<i>R220 BUCHI</i>
Spectrophotomètre UV/Visible	<i>SHIMADZU UV 1601</i>
Balance électronique de précision	<i>OHAUS 10-4g</i>
Agitateur magnétique plaque chauffante	<i>Stuart max 300°C</i>
Agitateur vortex	<i>Ficher Scientifique (40 Hertz)</i>
Micropipettes (variable)	<i>100 et 1000 µl</i>
Produits chimiques	Fabricant
Solvants organiques	
Ethanol	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Acétone	<i>Honeywell Fluka Germany</i>
Chloroforme	<i>Riedel-de-Haën Germany</i>
Composés pure	
Acide gallique monohydrate	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Quercétine	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Trolox	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Acide ascorbique (Vitamine C)	<i>Riedel-de-Haën Germany</i>
Réactifs	
DPPH	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>

2.2. Matériel végétal

La plante de la spiruline (*Arthrospira platensis*) a été récoltée et séchée l'année passée. Après séchage, la plante est broyée en poudre fine et conservée dans un sac en papier jusqu'à son utilisation.



Figure 6 : Photo illustrant l'échantillon de la spiruline en poudre

3. Méthode d'extraction des composés phénolique

3.1. Préparation des extraits

Nous avons utilisé une extraction de type solide-liquide (macération), qui consiste à dissoudre 1g du broyat végétal (la poudre de la spiruline) dans acétone, chloroforme, éthanol, chacun 16ml pendant 48 heures le mélange est agité plusieurs fois pendant la durée de l'extraction à température ambiante et à l'obscurité suivie par une filtration.

Les extraits obtenus évaporées à sec dans un rota-vapeur à 45°C. puis les résidus à sec à une quantité de 0.002g sont repris par le méthanol et conservés jusqu'au le déroulement de l'analyse (figure 7).

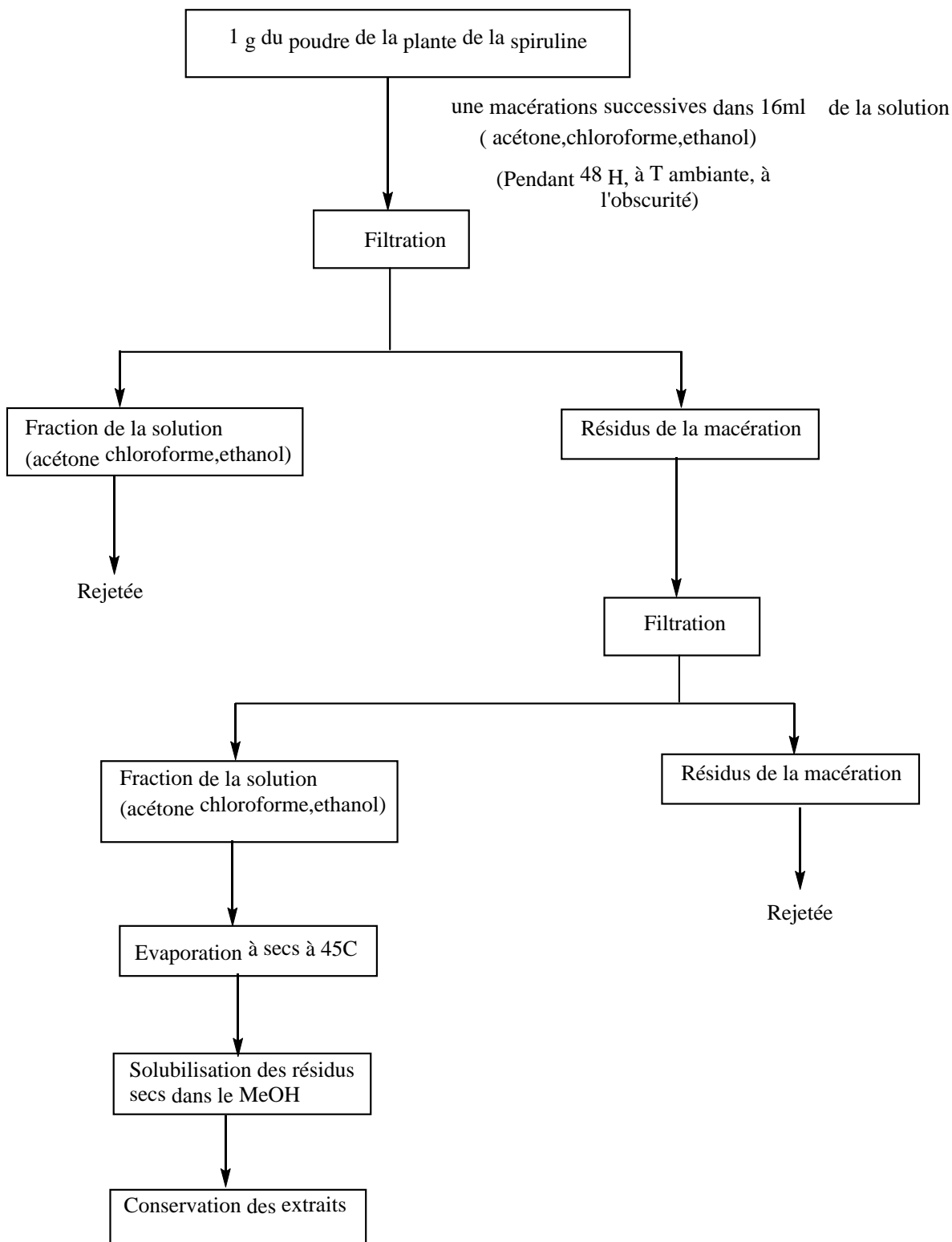


Figure 7 : Protocole d’extraction des composés phénoliques

3.2. Calcul de rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est déterminé selon Mahmoudi *et al.* (2013) à l'aide de l'équation suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse résidu sec (g)}}{\text{masse de la poudre végétale (g)}} \times 100$$

4. Dosages des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur les teneurs en phénol totaux, les flavonoïdes.

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Tout le contenu phénolique dans l'extrait brut a été déterminé par spectrophotomètre au biais de la méthode *Foline-Ciocalteu*, rapportée dans Slinkard & Singleton (1977), le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PM_{12}O_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène.

Mode opératoire

250 μ l de réactif de *Folin* (10 fois dilué) est ajouté à 50 μ l d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables.

Après 2 min, 1 ml d'une solution de carbonate de sodium 4% (m/v), sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec).

La courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de concentrations allant de 0,05 à 0,5 g/l (même Protocol des échantillons).

4.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode citée par Djeridane *et al.* (2006) en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements di-hydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (Mabry *et al.*, 1970), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

Mode opératoire

Un millilitre de chaque solution diluée dans le méthanol ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 1ml du trichlorure d'aluminium 2% (m/v), ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 430nm.

La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage. Une solution mère de concentration 0,1g/l préparée dans le MeOH a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentrations différentes variant entre 0,01g/l et 0,1g/l.

5. Evaluation de l'activité antioxydante

En raison des conditions que le monde a vues à la suite de l'évolution de l'épidémie Covid-19, qui a influencé négativement tous les domaines, comme c'est le cas sur le plan scientifique, qui a empêché la reprise de l'activité pédagogique, ce qui a rendu difficile la poursuite de la recherche appliquée en laboratoire, et c'est ce qui nous a incité à chercher des études antérieures menées sur le même plan ainsi que le même échantillon, afin d'atteindre des résultats fiables.

5.1. Méthode de piégeage de radical libre DPPH•

L'évaluation de l'activité antioxydante de composés phénoliques font généralement intervenir à la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un antioxydant. Parmi ces techniques d'analyse on a utilisé le test DPPH• (2,2 diphenyle-1-pikryl-hydrasyle), joue sur le transfert d'électron singulet pour différentes concentration de l'extrait et une comparaison avec des antioxydants de références (Trolox, BHA et Vitamine C).

Principe

La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH• en présence d'un donneur d'hydrogène H• (le cas d'un antioxydant). La solution de DPPH• montre une forte bande d'absorption à 515 ~ 517 nm, avec une couleur violet foncé et qui se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure 8).

La décoloration qui en résulte est stœchiométrique ; elle concerne le degré de réduction. Le DPPH• restant, mesuré après un certain temps, correspond inversement à l'activité de piégeage des radicaux libres par l'antioxydant (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004).

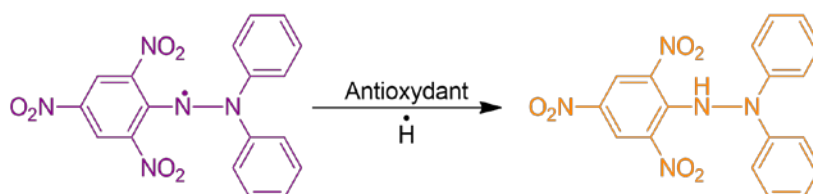


Figure 8 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004)

Mode opératoire

Un volume de 1 ml, de chaque solution fille (Extrait brut de chaque solvant), récemment préparée dans le MeOH, est ajouté à 1 ml de solution de DPPH• (100µM) fraîchement préparée. Après 30 min d'incubation, à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lu contre le blanc A₀ (1ml de la solution de DPPH et de 1ml de méthanol) à 517 nm par spectrophotomètre (UV/Vis).

Le pourcentage (%) d'inhibition des radicaux libres de DPPH^{*} a été calculé par la relation suivante :

$$I\% = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$$

A : Absorbance de la solution de DPPH^{*} en présence de l'échantillon

A₀ : Absorbance de la solution de DPPH^{*} en absence de l'échantillon

A partir de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons, les valeurs EC₅₀ ont été déterminées en (µg/ml), qui représentent les concentrations des échantillons à 50% de neutralisation des radicaux libres (DPPH^{*}).

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS et DISCUSSION

1. Résultats du rendement d'extraction

Le rendement de chaque extrait par rapport au poids sec de la plante et la masse sont représentés dans le tableau ci-dessous (tableau 5).

Tableau 5 : La masse et le rendement d'extraction de chaque extrait

Extrait	La masse de résidus sec (g)	Aspect et couleur de résidus sec	Le rendement (%)
Acétone	0.58	Résidus visqueux, vert olive	58%
Ethanol	0.66	Résidus visqueux, vert olive	66%
Chloroforme	0.53	Résidus visqueux, vert olive	53%

Nous constatons que l'extrait brut de l'éthanol enregistre un rendement très élevé de l'ordre 66% suivi par l'extrait acétone à raison de 58% puis que le chloroforme à un rendement de 53%. Cette différence pourrait être attribuée à l'effet de la nature du solvant, à la composition chimique des algues qui dépend de l'espèce et de son âge, aux facteurs environnements, à la localisation géographique des algues, et aux conditions saisonnières.

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques, Sur la base de propriétés chimiques ou physiques (Lafri, 2018).

Notamment les cas des polyphénols, qui consiste actuellement plusieurs intérêt grâce à leur activité biologique divers en particulier leur propriété antioxydant.

Le taux d'extraction dépend des différentes conditions tels que la méthode, la nature et la polarité du solvant, le PH, la température et de la taille des particules constituants la poudre de la plante.

Le solvant d'extraction a un effet important sur l'extraction des produits naturels.

Différents solvants sont capables de modifier le profil d'extraction des composés phénoliques et finalement leur propriétés antioxydants (Li *et al.*, 2007). Lorsque la polarité sur solvant change ; elle peu provoqué l'extraction d'impuretés et réduit les activités antioxydants (Guangrong *et al.*, 2008; Safari *et al.*, 2015; Salamatullah, 2014).

2. Résultat de dosage des phénols totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydants, antimicrobiennes, etc....).

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Au cours du dosage des polyphénols, après l'addition du réactif de Folin-Ciocalteu, une couleur bleue est apparue, ce qui confirme la présence des polyphénols dans les extraits de la spiruline.

À partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, les teneurs en polyphénol totaux sont présentés dans le tableau ci-dessous.

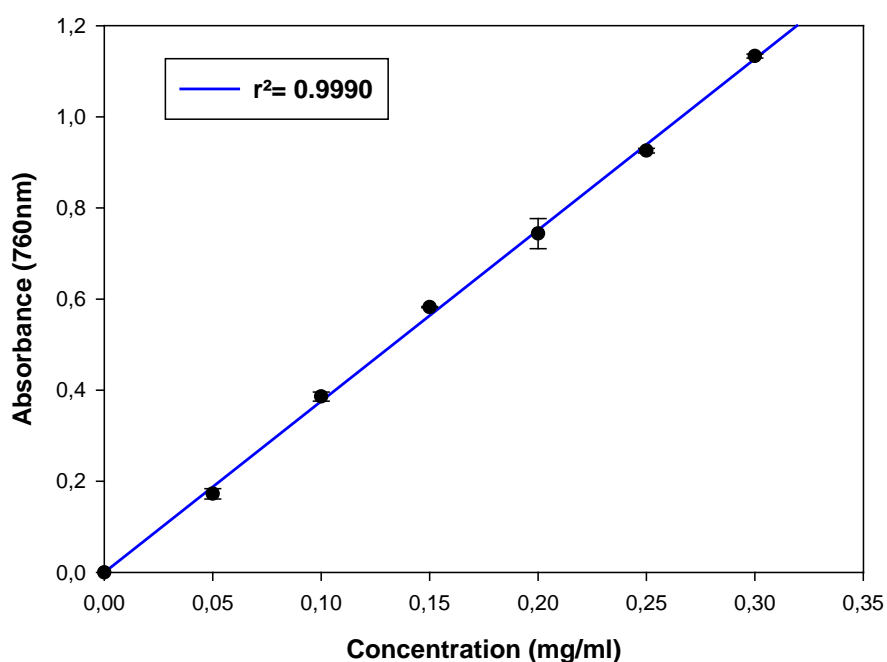


Figure 9 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique

Tableau 6 : Teneur en polyphénols totaux des extraits de la plante

	Acétone	Ethanol	Chloroforme
Polyphénols totaux (mg EAG/g résidus sec)	446,93±3	451.31±1,5	184.62±2,5

La teneur des composés phénoliques de la plante étudiée (*Spirulina plantensis*) le plus haute ont été détecté dans la fraction éthanol ($451,31 \pm 1,5$) et la fraction d'acétone ($446,93 \pm 3$) par contre la fraction de chloroforme est moyenne faible ($184,62 \pm 2,5$).

L'éthanol peut être considéré comme un excellent solvant d'extraction des composés phénoliques chez tous les algues, ou le taux de polyphénols est très élevé dans l'extrait éthanolique (Sabeena Farvin & Jacobsen, 2013).

A travers ces résultats, on peut dire que la *Spirulina plantensis* est une plante très riche par des molécules bioactives qui possèdent des propriétés biologiques très intéressantes.

CONCLUSION

Depuis la nuit des temps, il existe sur Terre une source nutritionnelle et thérapeutique naturelle sans égale. Richesse protéique, acides aminés essentiels, acides gras essentiels, complexes vitaminiques multiples, fer bio disponible, activités antioxydants, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antivirales, immunomodulatrices, tout ceci condense dans une simple algue microscopique nommée *Spirulina platensis*. Plus connue sous le nom de spiruline.

La Spiruline, est une algue bleu-vert d'eaux douces, présentée comme une algue miracle aux mille vertus, cette cyanobactérie est consommée depuis des centaines d'années.

Au vu des propriétés nutritionnelles sans égal de la spiruline, ainsi que du nombre croissant de publications scientifiques en analysant tel ou tel aspect, il apparaît clairement que cette algue devrait connaître ces prochaines années, un important développement,

C'est une étude a permis d'évaluer la capacité antioxydants des extraits Acétonique, éthanolique, chloroformique de la spiruline.

L'activité antioxydant confirmée par les résultats du test de piégeage du radical DPPH, témoigne que cette microalgue constitue une bonne source d'antioxydants ; ont montrées aussi une teneur appréciable de la spiruline en polyphénols, flavonoïdes et en caroténoïdes. Un constat certifié par plusieurs références bibliographiques et connaissances scientifiques.

De ce fait cette algue est une source de traitement potentielle d'antioxydants. Ce traitement est donc bénéfique pour l'organisme du fait d'un effet protecteur contre les maladies dégénératives ; métabolique ou cardiovasculaires, Mais aussi utilisée dans les pays en voie de développement pour ses propriétés nutritionnelles pour lutter contre la malnutrition.

Cette étude n'a pas exploré toutes les propriétés biologiques de cette espèce. Il serait donc intéressant, dans un avenir plus ou moins proche, de compléter ce travail par une étude de l'activité antimicrobienne de cette espèce.

- Ahounou, M. N. (2018). La spiruline: un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation.
- Barry, M., Ouedraogo, M., Sourabie, S., & Guissou, I. P. (2014). Intérêt thérapeutique de la spiruline chez l'homme: revue général. *International journal of biological and chemical sciences*, 8(6), 2740-2749.
- Bermejo-Bescós, P., Piñero-Estrada, E., & Del Fresno, Á. M. V. (2008). Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, 22(6), 1496-1502.
- Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: New York: Springer-Verlag.
- Braakhuis, A. J., & Hopkins, W. G. (2015). Impact of dietary antioxidants on sport performance: a review. *Sports Medicine*, 45(7), 939-955.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.
- Charpy, L., Langlade, M. J., & Alliod, R. (2008). La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique. *Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche*, 67.
- Clement, G. (1975). *PRODUCTION ET CONSTITUANTS CARACTÉRISTIQUES DES ALGUES" SPIRULINA PLATENSIS ET MAXIMA"*. Paper presented at the Annales de la Nutrition et de L'alimentation.
- Cruchot, H. (2008). *La Spiruline, Bilan et Perspective*. (Thèse docteur en pharmacie), Université de France-Comite.
- Delattre, J., Beaudeau, J.-L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques).
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Farooq, S. M., Boppana, N. B., Devarajan, A., Sekaran, S. D., Shankar, E. M., Li, C., . . . Ebrahim, A. S. (2014). C-phycoyanin confers protection against oxalate-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in MDCK cells. *PLoS One*, 9(4), e93056. doi: 10.1371/journal.pone.0093056
- Fox, R. D. (1999). *La spiruline: Technique, pratique et promesse*: Edisud.
- Gelin, D. (2015). La spiruline de l'aliment ancestral à une aquaculture moderne. *NATURE & PROGRÈS*, 14-17.
- Goulamabasse, T. R. (2018). *La spiruline : activités thérapeutiques et son intérêt dans la lutte contre la malnutrition à Madagascar*. (Doctorat de pharmacie), Université de Lille.
- Guangrong, H., Jiabin, J., & Dehui, D. (2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnology*, 7(9).

- Hortense, F. (2011). *Les applications et la toxicité des algues marines*. (Thèse de doctorat), Université de Limoges, France.
- James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R., & Vasudevan, I. (2006). Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*.
- Kim, C.-J., Yoon, S.-K., Kim, H.-I., Park, Y.-H., & Oh, H.-M. (2006). Effect of *Spirulina platensis* and probiotics as feed additives on growth of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(8), 1248-1254.
- Lafri, I. (2018). *Optimisation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline*. (Thèses Doctorat), Université Saad Dahleb - Blida.
- Li, B., Chu, X.-M., Xu, Y.-J., Yang, F., Lv, C.-Y., & Nie, S.-M. (2013). CD59 underlines the antiatherosclerotic effects of C-phycocyanin on mice. *BioMed research international*, 2013.
- 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.
- Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T., & Cai, Y. (2016). Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016.
- Mabry, T., Markham, K., & Thomas, M. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. 1970. Paper presented at the Library of Congress Catalog Card.
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*(9), 35.
- Manet, A. (2016). La spiruline: indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine.
- Martínez-Galero, E., Pérez-Pastén, R., Perez-Juarez, A., Fabila-Castillo, L., Gutiérrez-Salmeán, G., & Chamorro, G. (2016). Preclinical antitoxic properties of *Spirulina* (*Arthrospira*). *Pharmaceutical biology*, 54(8), 1345-1353.
- Mathew, B., Sankaranarayanan, R., Nair, P. P., Varghese, C., Somanathan, T., Amma, B. P., . . . Nair, M. K. (1995). Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*.
- Min, S. K., Park, J. S., Luo, L., Kwon, Y. S., Lee, H. C., Shim, H. J., . . . Shin, H. S. (2015). Assessment of C-phycocyanin effect on astrocytes-mediated neuroprotection against oxidative brain injury using 2D and 3D astrocyte tissue model. *Scientific reports*, 5, 14418.
- Mitra, S., Siddiqui, W. A., & Khandelwal, S. (2015). C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its antioxidant and anti-inflammatory property: a comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. *Chem Biol Interact*, 238, 138-150.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Morris, G., Li, P., Puaud, M., Liu, Z., Mitchell, J., & Harding, S. (2001). Hydrodynamic characterisation of the exopolysaccharide from the halophilic cyanobacterium

- Aphanothece halophytica GR02: A comparison with xanthan. *Carbohydrate Polymers*, 44(3), 261-268.
- Mouritsen, O. G. (2015). *Algues marines: propriétés, usages, recettes*: Delachaux et Niestlé.
- Mühling, M., Belay, A., & Whitton, B. A. (2005). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (Spirulina) strains. *Journal of Applied Phycology*, 17(2), 137-146.
- Parikh, P., Mani, U., & Iyer, U. (2001). Role of Spirulina in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Journal of medicinal food*, 4(4), 193-199.
- Person, J. (2010). *Livre turquoise – Algue, filières du futur*. Romainville: Édition Adebitech.
- Regunathan, C., & Wesley, S. (2006). Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using Spirulina as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition*, 12(6), 425-432.
- Remirez, D., Fernández, V., Tapia, G., González, R., & Videla, L. (2002a). Influence of C-phycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflammation Research*, 51(7), 351-356.
- Remirez, D., González, R., Merino, N., Rodriguez, S., & Ancheta, O. (2002b). Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. *Mediators of Inflammation*, 11.
- Riss, J., Décordé, K., Sutra, T., Delage, M., Baccou, J.-C., Jouy, N., . . . Rouanet, J.-M. (2007). Phycobiliprotein C-phycocyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7962-7967.
- Sabeena Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2), 1670-1681. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>
- Safari, P., Rezaei, M., & Shaviklo, A. R. (2015). The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian gulf green algae (*Chaetomorpha* sp.) using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2974-2981.
- Salamatullah, A. (2014). *Characterization of extraction methods to recover phenolic-rich antioxidants from blue green algae (spirulina) using response surface approaches*. (Master of Science), University of Nebraska.
- Samuels, R., Mani, U., Iyer, U., & Nayak, U. (2002). Hypocholesterolemic effect of Spirulina in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *Journal of medicinal food*, 5(2), 91-96.
- Schwartz, J., & Shklar, G. (1987). Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45(6), 510-515.
- Sguera, S. (2008). *Spirulina platensis et ses constituants: intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques*. UHP-Université Henri Poincaré.
- Simpore, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., . . . Musumeci, S. (2006). Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutrition Journal*, 5(1), 1-7.

- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Teas, J., Hebert, J. R., Fitton, J. H., & Zimba, P. V. (2004). Algae—a poor man's HAART? *Medical Hypotheses*, 62(4), 507-510.
- Vidalo, J.-L. (2008). *Spiruline: l'algue bleue de santé et de prévention*: Ed. du Dauphin.
- Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A. C. M. A., Kato, T., & Sakai, M. (2006). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 258(1-4), 157-163.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of toxicology*, 90(8), 1817-1840.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., Mccarty, M. F., Fujii, M., . . . Takayanagi, R. (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(2), R110-R120.