

ÉVALUATION DES MÉTHODES D'EXTRACTION DE LA PHYCOCYANINE ET SON RENDEMENT À PARTIR DE *SPIRULINA PLATENSIS*

LAFRI Imène^{1*}, JEMNI Monia² BENSEHAILA Sarra³ et BOUTEKRABT Lynda⁴

1. Université de Blida1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Département des Biotechnologies - Laboratoire de recherche en Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, route de Soumaâ, Blida- Algérie.

2. Centre de Recherche et d'Agriculture Oasienne, B.P. 62, km1 Route deTozeur, Tozeur Tunisie

3. Laboratoire des bioressources naturelles Université Hassiba Benbouali Chlef Algérie

4. Université de Blida1, Institut des Sciences et Techniques Appliquées, Blida, Algérie

Reçu le 01/12/2017, Révisé le 31/12/2017, Accepté le 31/12/2017

Résumé

Description du sujet : *Spirulina platensis* est une algue bleu-vert grâce à la chlorophylle (vert) et la phycocyanin (bleu) contenue dans les phycobilisomes. En raison de ces applications pharmaceutiques et alimentaires, le choix de la méthode d'extraction de la phycocyanine revêt une importance primordiale.

Objectifs : Les travaux ont porté sur l'évaluation de plusieurs méthodes d'extraction de la phycocyanin issue de deux types de spiruline provenant des régions de Tamanrasset (Algérie) et de Djerba (Tunisie) pour déduire la méthode optimale d'obtention d'une grande masse de phycocyanin.

Méthodes : Six méthodes d'extraction ont été évaluées (eau, congélation, sonication, solvant, séparation biphasée et macération par le glycérol) sur deux souches de spiruline provenant de la région de Tamanrasset (Guelta à 1824m d'altitude (23°N., 5°E) et la région de Milita Djerba, située (33° 48' N ; 10° 51' E).

Résultats : L'extraction biphasée a donné des rendements supérieurs comparativement aux autres méthodes (eau, solvant) (0,39 vs 0,19 mg/ml). Par macération avec le glycérol, la spiruline algérienne a donné une concentration de phycocyanin de 0,625 mg/ml et 1,37de pureté. La spiruline tunisienne a donné des rendements plus élevés. La concentration des polyphénols totaux varie entre 4 et 22 mg/g/ms pour la souche algérienne et 6 et 25 mg/g/ms pour la souche tunisienne.

Conclusion : La macération avec le glycérol est la méthode optimale d'extraction de la phycocyanin. Sa caractérisation a permis de déterminer en termes de rendement les composés phénoliques, les flavonoides et son activité antioxydante tant recherchée dans le domaine médical et cosmétique.

Mots clés: spiruline, phycocyanin, extraction, pureté, antioxydante.

EVALUATION OF METHODS OF EXTRACTING PHYCOCYANINE AND YIELD FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

Summary

Description: *Spirulina platensis* is a blue-green alga with chlorophyll (green) and phycocyanin (blue) contained in phycobilisoms. Due to pharmaceutical and food applications, the best of the method of extraction is the vital.

Objectives: Work focused on an evaluation of several phycocyanin extraction methods from two types of *Spirulina*, from two regions; Tamanrasset (Algeria) , Djerba (Tunisia) to deduce the optimal method.

Methods: Six extraction methods were evaluated (water, freezing, sonication, solvent, biphasic separation, maceration with glycerol) on two spirulina strains from the Tamanrasset (Guelta at 1824m, (23° N. ,5° E) and Milita Djerba (33° 48' N; 10° 51'E).

Results: Two phase extraction gave higher yields versus other methods (water, solvent) (0.39 vs 0.19 mg / ml). By maceration with glycerol, algerian *Spirulina* gave phycocyanin concentration of 0.625 mg/ml, purity of 1.37. Tunisian *Spirulina* yielded 50% higher yields. Concentration of total polyphenol is between 4-22 mg/g/dm for algerian strain and 6-25 mg/g/dm for the tunisian strain.

Conclusion: Maceration with glycerol is the optimal method of extracting. Characterization determine the yield of the phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the medical and cosmetic field.

Key words: spirulina, phycocyanin, extraction, purity, antioxidant

* Auteur correspondant: LAFRI Imène, E-mail : i.lafri1703@yahoo.fr

INTRODUCTION

Les phycobiliprotéines, regroupées généralement en phycocyanines, phycoérythrine, et allophycocyanines sont constituées de protéines pigmentaires photosynthétiques présentes chez certaines algues (algues rouges et cryptophycées) et chez toutes les cyanobactéries [1 ; 2]. La phycocyanine est généralement extraite à partir de la cyanobactérie spiruline (*Arthrospira platensis*). Actuellement, la demande du consommateur en produits naturels pour des impératifs écologiques est en constante progression confortée par une législation qui tend à substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Elle est déjà introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires [3].

L'extraction des phycobiliprotéines à partir d'une biomasse sèche ou fraîche entraîne une lyse cellulaire qui consiste en une rupture des membranes plasmiques de cellules ou de bactéries en utilisant notamment des moyens physiques/mécaniques (par sonication, cycles de congélation/décongélation) ou des moyens chimiques (solutions de CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ou encore des moyens biologiques (enzymes). L'extrapolation de tels procédés à une échelle industrielle génère des coûts d'investissement élevés [4]. D'autres procédés, plus simples, utilisent la précipitation par les sels et particulièrement le sulfate d'ammonium qui permet en plus de conserver les phycobiliprotéines contre les bactéries et les champignons [5].

La production de phycocyanine à un coût accessible, sans dégradation de ses propriétés constitue un défi pour la plupart des chercheurs [3 ; 6]. Ainsi beaucoup de travaux basés sur des méthodes efficaces de bio-séparation à grande échelle, qui permettraient d'atteindre de hautes valeurs de pureté ont été effectuées. Parmi les méthodes de purification qui pouvaient répondre à tous ces critères, figurait l'extraction aqueuse biphasée (ATPE) [7] ou encore le procédé d'extraction et de stabilisation de la phycocyanine qui consiste en l'étape de macération du ou des matériaux dans du glycérol ou un mélange eau/glycérol [8].

L'objet des travaux étant l'obtention d'une bonne masse de la phycocyanine extraite à partir de la spiruline provenant de deux régions géographiquement différentes, la région de Tamanrasset (sud Est du Sahara, Algérie) et la région de Djerba, Sud Ouest de Tunisie).

Les travaux portent ainsi sur une comparaison du rendement d'extraction pour les deux souches tout en préservant d'une part, ses qualités intrinsèques, et d'autre part, de pouvoir déduire après, la méthode optimale en termes de rendement pour une récupération maximale des phycobiliprotéines dans l'état naturel des algues.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

La spiruline algérienne est produite artisanalement dans des bassins où les conditions de culture et de production sont maîtrisées [9]. La souche algale utilisée est dénommée Behatam, elle est située à 1824 m d'altitude près de Tamanrasset dans le Sahara algérien, à la Guelta Taguemart (N 23°01.- E 5°25.473'). La récolte de nos échantillons a été faite durant le mois de juin 2014. Les feuilles de la plante sont ensuite séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité pour les besoins de l'étude.

La souche tunisienne dénommée « *Spirulina platensis* » provient de la région de Milita Djerba située 33°48' N 10°51'E. Elle est produite en paillettes au niveau de la station de Djerba, représentant un environnement le plus adapté à sa croissance.

2. Méthodes d'extraction

2.1. Extraction par l'eau

Une suspension de 4 % de spiruline dans l'eau a été préparée à l'obscurité. La solution obtenue, subit une décantation puis une centrifugation (9000 tours/15 mn) à 4°C. On prélève alors le surnageant lequel subit une dilution (facteur 100) avec de l'eau. On a mesuré ensuite la densité optique de la solution à 615 nm, 652 nm, 620 nm et 280 nm. Le calcul du taux (%) en phycocyanine est effectué selon la formule de M'Baye et al. [10].

$$\% \text{ en phycocyanine} : 1,873 \times (Abs_{620} - 0,474 \times Abs_{652}) = f/C$$

Avec :

C : % de la concentration de spiruline sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %
f : le facteur de dilution en volume

2.2. Extraction par sonification

On met 10 mg de spiruline en suspension dans 100 ml de tampon phosphaté, la solution est mise sous l'action de l'ultrason E 3010 NA pendant 5 min suivie d'une centrifugation (9000 tours/15min à 4°C). On prélève le surnageant et on ajoute de nouveau au culot 100 ml de tampon et on le remet à l'action de l'ultrason pendant 2 à 3 min, puis centrifugation afin de prélever de nouveau le surnageant et le mélanger avec le premier et mesurer les absorbances à 615, 652, 620 et 280 nm. Le taux (%) en phycocyanine est calculé selon la formule de Bennett & Bogorad [11].

$$PC = [Abs_{615} - 0,474 \times Abs_{652}] / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11].

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.3. Extraction par congélation

On met 100 mg d'algues secs dans 200 ml de tampon. La solution subit des cycles de congélation/décongélation (congélation à -20°C) jusqu'à l'éclatement des cellules. La solution obtenue subit une première centrifugation. Au surnageant, on ajoute 20% de sulfate d'ammonium saturé ((NH₄)₂SO₄), on le laisse reposer pendant 2 heures. Après une deuxième centrifugation, on ajoute au surnageant obtenu 45% de sulfate d'ammonium saturé. Enfin une troisième centrifugation est effectuée directement et le culot est récupéré. Des lectures de spectrophotométrie sont effectuées à des absorbances de 615nm, 620nm, 652nm et 280nm.

$$PC (mg/ml) = (Ab_{615} - 0,474 \times Ab_{652}) / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11].

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.4. Extraction par solvant

On verse 4 g de spiruline dans 120 ml de tampon phosphate, au début on l'incube à l'obscurité à 4 °C pendant 12h (pour permettre la lyse des cellules à l'hypotonie de mise), puis centrifuger pour la première fois et récupérer le surnageant bleu. Ensuite, on ajoute 120 ml du tampon phosphate au précipité et incubé 12h à l'obscurité. Après la deuxième centrifugation, les deux surnageants sont mélangés afin de lire l'absorbance à 615, 652, 620 et 280 nm. Le calcul du % en phycocyanine est basé sur de l'équation de Chen et al. [12].

$$PC (mg/ml) = (Ab_{615} - 0,474 \times Ab_{652}) / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11].

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.5. Extraction par séparation aqueuse à double phase

Une solution de spiruline de 90 % est préparée à l'obscurité. On lui rajoute une solution de 40% de polyéthylène glycol (PEG) : 40 g PEG dans 60 g d'eau, ensuite une solution de sels de phosphates à 20% : mélange de 10 g de K₂HPO₄ et 10 g de KH₂PO₄ dans 60 g d'eau (on a utilisé une solution glucosée à 20% et on a comparé le rendement d'extraction) [13].

En se référant à la méthode d'Albertson [4] on a prélevé 1g de 40 % (W/W) de PEG, 1,25 g de 20 % (W/W) de sels phosphates + 0.5 g de spiruline et 2.25 g d'eau. Après mélange, le composé mis à l'obscurité, subit une agitation pendant 20 min à l'aide d'un agitateur, puis une centrifugation, mesure de volumes de phases, de lecture de l'absorbance à 620, 652, 615 et 280 nm. Le calcul du pourcentage en phycocyanine et de sa pureté est basé sur les équations suivantes :

$$PC (mg/ml) = (Ab_{615} - 0,474 \times Ab_{652}) / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11]

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.6. Extraction par macération dans le glycérol

En s'inspirant des travaux de Potcher [7], on a mélangé 800 g de poudre de spiruline algérienne dans un volume de 60/40 eau/glycérol. On laisse macérer pendant 15 j à température ambiante à l'obscurité. Une filtration frontale lente est ensuite effectuée, avec un filtre compatible alimentaire (filtre en nylon, finesse de 25 µm). Nous avons suivi le même protocole pour la spiruline tunisienne au sein du Laboratoire de l'Institut des Régions Arides (IRA) (Médenine, Tunisie). Le calcul de pourcentage de la phycocyanine est réalisé selon les formules suivantes :

$$PC \text{ (mg/ml)} = (Ab_{615} - 0,474 \times Ab_{652}) / 5,34$$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : Ab_{620}/Ab_{280} [11]

Avec :

Ab à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

Ab à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

3. Caractérisation des extraits de phycocyanine

3.1. Analyse des composés phénoliques

3.1.1. Polyphénols totaux

On fait diluer l'extrait de la phycocyanine algérienne ainsi que celui de la souche tunisienne, puis on met 0,5 ml de chaque dilution dans des tubes à essai pour chacune d'elles. On ajoute 5ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin à 10%. Après 3 mn on ajoute 0.5 ml de carbonate de sodium 20%. La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure à l'obscurité. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage [14] (Figure 1).

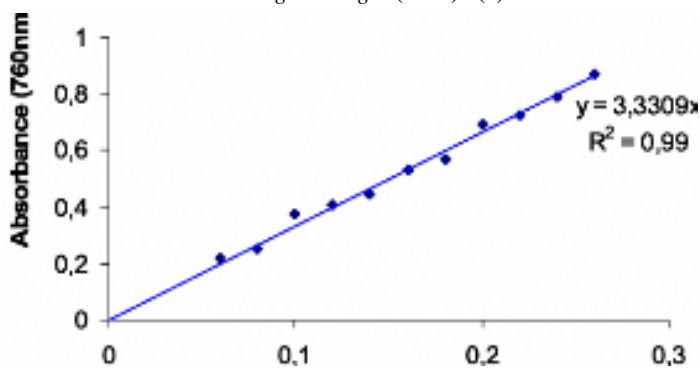


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique [15]

3.1.2. Quantification des composés phénoliques par chromatographie (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters Alliance 2695) avec détection UV (détecteur UV 24889 et un logiciel empower V3) a été utilisée pour l'identification et la détection du profil phénolique de l'extrait. La phase mobile est de composition gradiente. Elle est composée de deux solvants A et B dont la proportion est mentionnée dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : Composition des deux éluant en fonction du temps de l'opération [15]

Temps (mn)	Proportion (%)	
	Solvant A (Acétonitrile)	Solvant B (H ₂ O, pH 2,5)
Initial	2	98
5,00	2	98
15,00	5	95
17,00	100	0
25,00	100	0

3.2. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de la phycocyanine a été mesuré par deux méthodes :

3.2.1. Méthode au diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)

Une quantité de 12 mg de DPPH a été solubilisée dans 50 ml de méthanol. De la solution mère, on prélève 3 ml pour faire la dilution dans 7 ml de méthanol. Pour la spiruline algérienne : On prend 0,21 ml de l'extrait de phycocyanine dans 1,94 ml de la solution de DPPH et on fait une incubation à l'obscurité pendant 30 min à 20°C.

Le même protocole est utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante pour la spiruline tunisienne. La lecture de l'absorbance s'est effectuée à 517 nm. L'activité antioxydante pour chacune des solutions a été calculée selon la formule:

$$\text{Delta-DPPH} = \text{ADPPH} - [A_{517}] \text{ simple}$$

Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme standard [15]

3.2.2. Détermination du pouvoir réducteur par la méthode de FRAP [16]

Un volume de 1 ml de phycocyanine algérienne ou tunisienne a été mélangé à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium $K_3 [Fe (CN)_6]$ à 1 %. Après 30 mn d'incubation à 50 °C, nous avons ajouté 2,5 ml de la solution d'acide trichloracétique à 10 % au mélange, qui a ensuite subi une centrifugation pendant 10 mn. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combiné à 2,5 ml d'eau distillée et à 0,5 ml de solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1 % puis l'absorbance a été mesurée à 700 nm.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Extraction de phycocyanine

Les concentrations de phycocyanine obtenues pour les deux souches (algérienne et tunisienne) selon les différentes méthodes d'extractions sont représentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline algérienne et tunisienne en fonction du mode d'extraction.

Méthodes d'extraction	Concentration (mg/ml)		Degré de pureté	
	Sp Alg (*)	SpTun (**)	Sp Alg (*)	SpTun (**)
Eau	0,19	0,20	0,20	0,25
Congélation	0,06	0,10	0,80	0,90
Sonification	0,25	0,25	0,60	0,80
Solvant	0,30	0,35	0,55	1,00
Séparation aqueuse à double phase	0,39	0,41	0,30	0,4

(*) Spiruline algérienne, (**) spiruline tunisienne

La concentration en phycocyanine de la spiruline sèche varie entre 0,06-0,39 mg/ml pour la souche algérienne et 0,20-0,41 mg/ml pour la souche tunisienne. On remarque ainsi que l'extraction aqueuse à deux phases a donné des concentrations supérieures en C-phycocyanine comparativement aux autres méthodes (congélation et eau) pour les deux souches (algérienne et tunisienne) (0,39 vs 0,19 mg/ml) et (0,41 vs 0,20).

Un effet significatif du pays de production sur la concentration d'extraction est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée. En effet, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des concentrations de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne. Nous avons regroupé les différentes concentrations et les rapports de pureté selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 2.

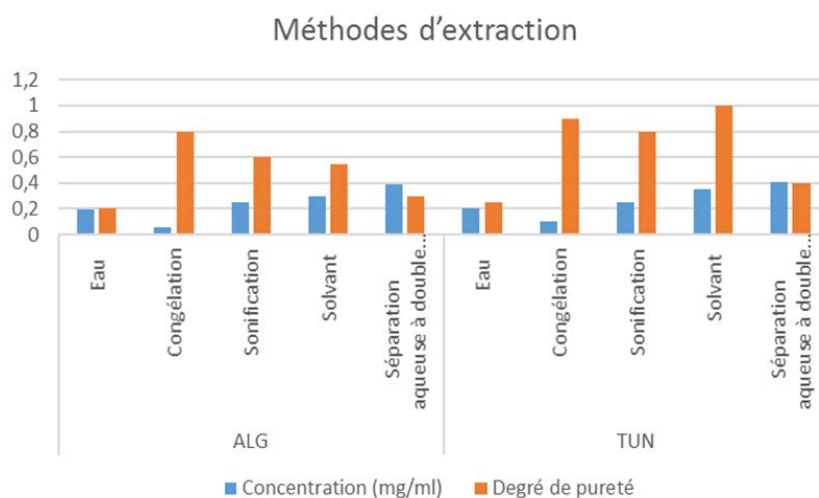


Figure 2. Concentrations et pourcentages de pureté de la phycocyanine des souches (algérienne et tunisienne) de la spiruline.

Concernant la pureté, l'extraction par la congélation a donné des valeurs de pureté supérieures aux autres méthodes (par sonification, par solvant) (0,80 vs 0,60) et (0,80 vs 0,55). Une pureté de C-phycocyanine de 0,7 est considérée comme grade alimentaire, 3,5 comme grade réactive, par contre si elle est supérieure 4, elle est considérée comme grade analytique [17]. Ces valeurs indicatives permettent d'affirmer que cette extraction est de l'ordre alimentaire. Un effet significatif du pays de production sur le degré de pureté est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée. Toutefois, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des degrés de pureté de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne.

D'après Silveira *et al.* [2], la pureté d'extraction est de l'ordre de 0,40 avec une extraction de phycocyanine de l'ordre de 3,73 mg/ml avec l'eau et 4,20 mg/ml avec le tampon phosphate. Benedetti *et al.* [18] ont obtenu une pureté de 2,74 avec une extraction avec sulfate d'ammonium à 50%.

Toutefois, une concentration de phycocyanine de l'ordre de 2,67 mg/ml et un rendement de 0,79 ont été obtenu en utilisant l'extraction aqueuse à double phase [19]. Alors qu'Antelo *et al.* [20] ont obtenu par la même méthode une pureté de 5,1 et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 1,11 mg/ml.

2. Extraction par macération avec le glycerol

A la fin de la filtration, nous avons obtenu avec la spiruline algérienne une concentration de phycocyanine de 0,625 mg/ml avec une pureté de l'ordre de 1,37 avec environ 2,5 l de filtrat (phycocyanine) et 7,5 l de retentât (retenu par le filtre). Par contre avec la spiruline tunisienne nous avons obtenu une concentration de 1,90 mg/ml et un rendement de 2,3 soit un taux de rendement plus élevé de 50%. Ces différences de valeurs pourraient être liées aux conditions de culture, au climat, à la souche mère, ou encore aux moyens de séchage.

3. Caractérisation de phycocyanine

3.1. Polyphénols totaux

Nous avons regroupé les différentes concentrations selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 3.

On remarque que la concentration des polyphénols totaux à partir des différentes méthodes d'extractions de C-phycocyanine est comprise entre 4 et 22 mg/g de matière sèche pour la souche algérienne et 6 et 25 mg/g de matières sèches pour la souche tunisienne. Les phycocyanines sont riches en poly phénols. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Bujard *et al.* [15] à 4,9 µg/g. Toutefois nous avons noté que la concentration des polyphénols totaux la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol (25 et 22 g/gms). Cependant la souche tunisienne a donné des valeurs supérieures en poly phénols par rapport à la souche algérienne (25 vs 22 g/gms).

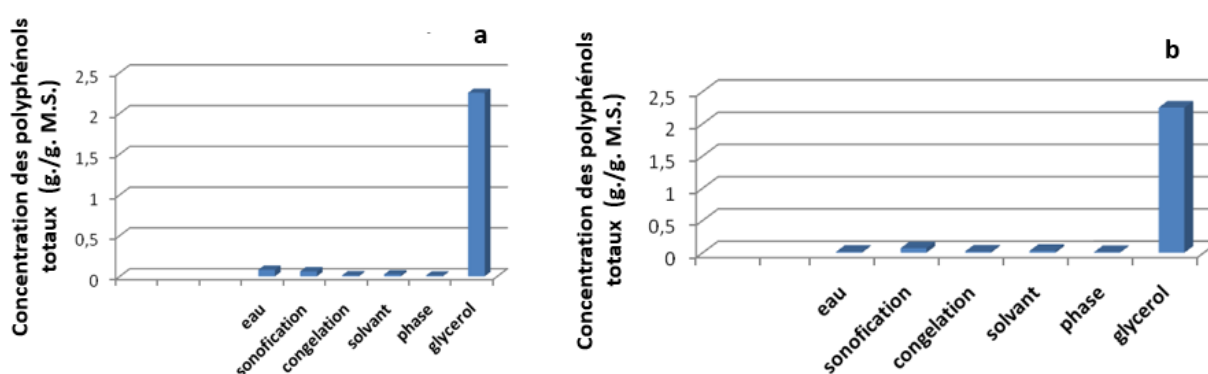


Figure 3: La concentration des polyphénols totaux issue de la phycocianine

(a) : Algérienne, (b) : Tunisienn

3.2. Détermination des polyphénols par HPLC

Nous avons regroupé au niveau du tableau 3 les composés polyphénoliques et flavonoïdes détectés dans chaque extrait selon le temps de rétention.

Tableau 3: Détermination des polyphénols pour chaque Extrait de la spiruline par HPLC

Extrait	Temps de rétention	Polyphénols
	Extrait 1	2,17
18,17		Pyrogallol
18,53		Rutin
19,0		Acide vanilline
Extrait 2	Temps de rétention	Polyphénols
	2,15	Inconnu
Extrait 2	2,4	Inconnu
	4,9	Acide gallique
	18,17	Pyrogallol
	18,53	Rutin
	18,99	Quercitine
Extrait 3	Temps de rétention	Polyphénols
	2,11	Inconnu
Extrait 3	2,3.14	Inconnu
	18,17	Pyrogallol
	18,85	Inconnu
	18,99	Quercitine

L'identification des pics sur le chromatogramme se fait grâce à des échantillons standards en se basant sur le temps de rétention des molécules analysées. Le profil chromatographique représenté dans la figure 4 a permis d'identifier au niveau des extraits, la présence des composés polyphénoliques dans *Spirulina platensis* d'acides phénoliques et de composés flavonoïdes

tels le pyrogallol, l'acide gallique, le rutin et la quercitine.

3.1. Les Flavonoïdes

Les concentrations des flavonoïdes obtenues par différentes méthodes d'extraction sont représentées dans le tableau 4 :

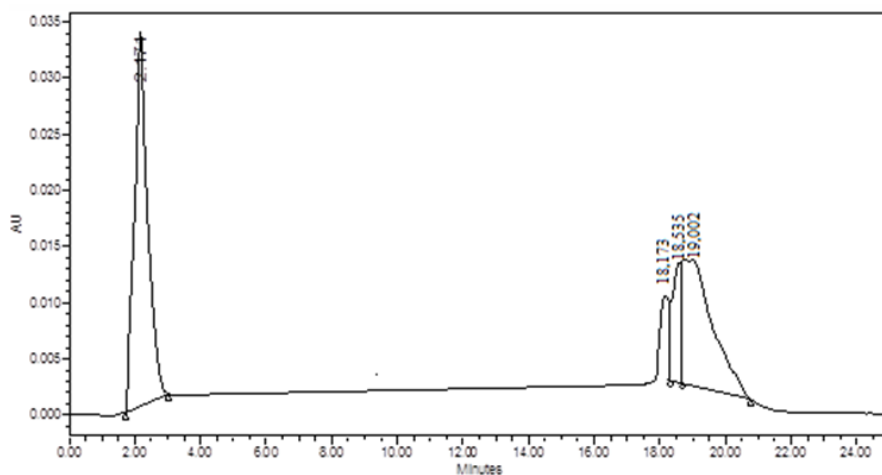
Tableau 4: Concentration en flavonoïdes pour la spiruline (Algérienne et Tunisienne)

Flavonoïde (mg/g)	Spiruline algérienne Spiruline tunisienne	Méthode d'extraction					
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase	Glycérol
	Spiruline algérienne	0,33	0,27	1,878	2,12	0,25	3,4
	Spiruline tunisienne	0,45	0,32	2,1	2,9	0,75	4,5

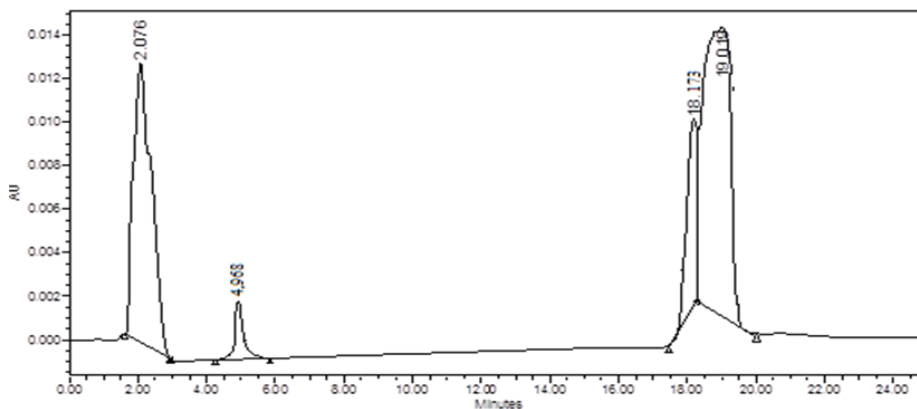
La concentration la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol pour les deux souches (algérienne et tunisienne) avec des valeurs respectives de 3,4 mg/g et 4,5 mg/g. Par contre, les concentrations les plus faibles sont obtenues par les méthodes d'extraction par sonification et par l'eau (0,33mg/g, 0,45 mg/g) respectivement. La phycocyanine Tunisienne montre des valeurs plus élevées par rapport à la phycocyanine Algérienne en flavonoïde quel que soit la méthode d'extraction utilisée.

4. Activité anti oxydante

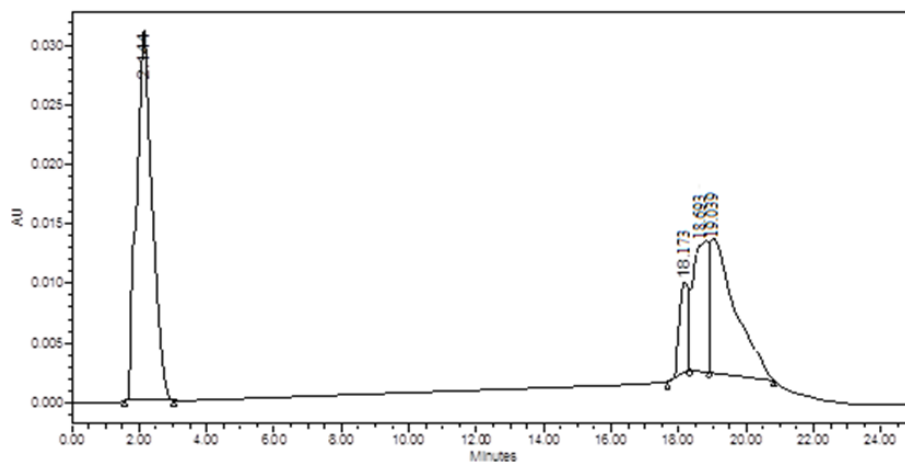
Les résultats de l'activité anti oxydante sont représentés dans le tableau 5. Nous avons obtenu une activité qui varie de 0,2 à 0,6% pour la souche Algérienne et une activité qui varie de 0,4 à 1,4% pour la souche Tunisienne.



Chromatographe de l'Extrait 1



Chromatographe de l'Extrait 2



Chromatographe de l'Extrait 3

Figure 4: Profils des polyphénols obtenus pour les 3 extraits
 Les conditions d'analyse par HPLC : Longueur d'onde 254 nm,
 Concentration de l'échantillon : 1mg/ml, Temps d'analyse 25 mn

Tableau 5: Valeurs (en %) d'activité anti oxydante pour la spiruline (Algérienne et Tunisienne)

		Méthode d'extraction				En phase	Glycérol
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant		
Activité anti oxydante (%)	Souche algérienne	0,2	0,16	0,01	0,23	0,06	0,6
	Souche tunisienne	0,4	0,13	0,015	0,33	0,09	1,4

D'après le tableau 6, nous remarquons que les méthodes d'extraction par le glycérol montrent une activité antioxydante la plus élevée avec toutefois, une activité antioxydante supérieure pour la souche tunisienne. Patil *et al.* [21], ont obtenu une activité antioxydante variant de 0,17 à 51,94% selon que la concentration de spiruline varie de 0,3 à 15 mg/ml.

La quantification de l'activité antioxydante d'un extrait par le biais du pouvoir réducteur (PR) implique la capacité des antioxydants analysés à transformer le fer (III) en fer (II), grâce à leur faculté donatrice d'électrons.

Tableau 6 : Pouvoir réducteur des deux souches de phycocyanine (Algérienne et Tunisienne)

Méthode d'extraction	Macération au glycérol Pouvoir réducteur (Abs)
Pycocyanine Algérienne	1,749 ±0,052
Pycocyanine Tunisienne	1,788 ±0,0026

Le même tableau indique que la phycocyanine Tunisienne extraite par macération avec le glycérol possède le meilleur pouvoir réducteur. Cependant, la différence est non significative ($p > 0,05$), sachant que la phycocyanine présente une meilleure activité antioxydante révélée par le test de DPPH.

CONCLUSION

Les travaux entrepris sur la spiruline avaient pour but une évaluation de différentes méthodes d'extraction pour un meilleur rendement d'extraction. Les résultats obtenus ont montré que l'extraction aqueuse à double phase a donné des valeurs supérieures comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant). La caractérisation de la phycocyanine de souche algérienne a permis de déterminer en termes de rendement les composés phénoliques, en flavonoïdes et surtout son activité antioxydante. Ainsi, différentes extractions sur *S. platensis* ont été réalisées par des solvants afin d'étudier l'activité antioxydante des composés phénoliques contenus dans cette souche algale. L'analyse s'est faite par chromatographie liquide de haute performance (HPLC). L'extraction des polyphénols a montré une richesse de la spiruline en polyphénols totaux, ainsi que les

composés phénoliques qui disposent d'un pouvoir antiradicalaire important.

Il est à noter enfin, que la souche algérienne, en pleine culture et de production artisanale au Sahara, espace de soleil et d'eau de la chaleur et des sels minéraux se doit à être valorisée. Sa production est simple à mettre en œuvre car la souche est maintenant disponible sur place. Une caractérisation plus poussée de cette souche par les techniques de résonance magnétique (RMN) permettrait de lui donner sa valeur indicative pour des éventuelles valorisations principalement en cosmétique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Bermejo-Bescós P; Piñero-Estrada E; and Ma Villar del Fresno A; (2008). Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron- induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in vitro*, 22: 1496 - 1502.
- [2]. Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert C.A.V., and Kalil, S.J., (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98: 1629–1634.
- [3]. Mata, T., Martins, A.A., and Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): 217-232.
- [4]. Albertson P.A. and Tjerneld F. (1994). *Methods in enzymology. Volume 228. Aqueous two phase systems*. Edited by: Harry Walter, Göte Johansson. Academic Press, INC. London.
- [5]. Cruchot, H., (2008). La spiruline : bilan et perspectives ; Thèse de doctorat en pharmacie N° 25.08.15. Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon. Université de Franche-Compte.
- [6]. Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., and Pinto, L.A.A., (2009). Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. *Bioresource Technology*, 100 : 1297–1303.
- [7]. Pottcher F. (2014). *Procédé d'extraction et de stabilisation de phycocyanine et ses applications*. WO 2014045177 A1

- [8]. Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A.S., and Raghavarao, K.S.M.S. (2006). Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, 1127: 76–81.
- [9]. Hiri 2013 <http://www.les-sahariens.com/theme/actualites/>
- [10]. M'Baye, B.K., Lô, B.B., and Bassene, E., (2011). Etude des caroténoïdes, des phycocyanines et des protéines de la spiruline en Mauritanie. ScienceLib Editions Mersenne, 3, (110906). ISSN 2111.4706pp.
- [11]. Bennett. A. and Bogorad. L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58: 419 – 435.
- [12]. Chen, T., Wong, Y.S., and Zheng, W., (2006). Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry* 67(22): 2424-2430.
- [13]. Bulgariu, L., and Bulgariu, D., (2008). Cd (II) extraction in PEG (1550)–(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase systems using halide extractants. *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (3) :341–350.
- [14]. Brand-Williams. W. Cuvelier. M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie /Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- [15]. Moukette Moukette, B., Pieme, C.A., Nya Biapa, P.C., Njimou, J.R. and Ngogang Yonkeu, (2015). Radicals quenching potential, protective properties against oxidative mediated ion toxicity and HPLC phenolic profile of a Cameroonian spice: *Piper guineensis*. *Toxicology Reports*; 2:792–805
- [16]. Bujard, E., Baco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholtz, A., and Wuhrmann, J.J., Clément, G., (1970). Composition and nutritive value of blue green algae (*Spirulina*) and their possible use in food formulations. 3rd International Congress of Food Science and Technology.
- [17]. Rito-Palomares, M., Nunez L., and Amador D., (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 76: 1273–128.
- [18]. Benedetti. S. Benvenuti. F. Pagliarani. S. Francogli. S. Scoglio. S. and Canestrari. F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences* 75: 2353 – 2362.
- [19]. Rito-Palomares, M., Nunez L., and Amador D., (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 76: 1273–128.
- [20]. Antelo F.S. Anschau, A. Costa. J.A.V. and Kalil, S.J. (2010). Extraction and Purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* in Conventional and Integrated Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5): 921-926.
- [21]. Patil, G.K.S. and Raghavarao M.S. (2007). Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34: 156–164.
- [22]. Colla, L.M., Furlong, E.B., and Costa, J.A.V., (2007). Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilien Archives of Biology and Technology*. 5(1): 161-167.
- [23]. Sudha, S.S., Karthic, R., Rengaramanujam, J., Athulya (2011). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* and *Aphanothece sp.* on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. *South As. J. Biol. Sci.* 1 (2): 87- 98.