

République Algérienne Démocratique et Populaire
UNIVERSITE KASDI MERBAH –OUARGLA-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE
Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :
BENMALEK Amina
TOUAHIR Asma

Thème

**RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE
DE LA SPIRULINE (*Arthrospira platensis*)**

Soutenu publiquement le : 04/06/2021.

Devant le jury :

Président	M. SEGGAI A.	M.A.A.	U.K.M. Ouargla
Promoteur	Mme. OULD EL HADJ KHELIL	A. Pr.	U.K.M. Ouargla
Co-Promoteur	Mlle. BELDI N.	M.C. B.	U.K.M. Ouargla
Examineur	Mr. BOURICHA M.	M.A.A.	U.K.M. Ouargla

Année universitaire : 2020-2021.

Remerciements

Tout d'abord nous tenons à remercier **Allah** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier notre encadreur **Mme OULD EL HADJ KHELIL AMINATA** Professeur à U.K.M. Ouargla pour ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de notre profonde gratitude pour nous avoir guidé et aidé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à notre Co-promotrice **Melle BELDI NADIA M.C.B.** à U.K.M. Ouargla pour son aide, ses orientations et ses conseils qu'elle nous a prodigués.

Nous exprimons nos vifs remerciements à **M. SEGGAI ALI M.A.A** à U.K.M. Ouargla pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Nous remercions vivement à **M. BOURICHA** (U.K.M. Ouargla) nous a fourni les souches de référence nécessaires pour la présente étude et le plaisir d'examiner ce modeste travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à **Dr .HAMDI IMEN** et **M. KADOUR** et tous l'équipe d'Ecole Normale Supérieure de Ouargla a son chaleur réception.

Nous remercions nos collègues et nos amies et tous ce qui nous ont aidés pendant notre travail

Dédicaces

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu « le tout

Puissant » de nous

avoir accordé la force et le courage afin de réaliser

Ce modeste travail.

À mes parents qui m'ont donné la naissance et la

Croyance religieuse

À ma mère qui ne cesse de m'orienter.

***À mon père qui m'a élevé, éduqué et ma donnée les actes
les plus nobles de la vie pour grandir dans un environnement sain.***

A Ma chère fille : KHADIDJA.

Mes sœurs :FATIMA et AICHA.

À mes frères : ABD EL WAHED, ISHAK et OUSSAMA.

À mes belles sœurs : YAMINA et HANANE.

À mes neveu : OUM KELTHOUM et M .A .GHANI .

À tous les membres de la grande famille BENMALEK.

À ma binôme et amie de travail ASMA.

À toute ma promotion d'étude Microbiologie Appliqué.

À tous ceux qui utilisent la science pour

le bonheur et la prospérité de l'humanité.

Je dédie cet humble travail.

..AMINA..

Dédicaces

Avant tout, je remercie le Bon Dieu Clément et Miséricordieux pour tous ces dons et facilitations, que ce présent travail a vu le jour.

Je dédie affectueusement ce modeste travail :

*À mes très **CHERS PARENTS** qui m'ont soutenu tout au long de mes études par leur amour, leurs prières et leurs encouragements.*

Puisse Dieu, le très haut, leur préserve leur santé,

Bonheur et longue vie.

A MON MARIE :

Mon cœur merci pour la patience, le soutien et surtout

Merci de m'avoir supporté.

A les fleurs de ma vie bien sûr mes enfants :

LOUDJAIN HIBET ERRAHMAN

WAEL ZIAD

À mes très chères et adorables sœurs :

*La star de ma vie : **Dr. IKRAM***

*Et la petite : **NADA FATIMA ZAHRAA***

*À ma très cher frère : **TAREK***

Pour leurs encouragements permanents, leur soutien moral et leurs bonnes humeurs. Que Dieu vous garde pour moi, vous protège et j'espère que leur chemin soit plein de succès.

*À ma binôme et amie de travail **AMINA***

À mes connaissances et à tous ceux qui sont chers à mon cœur.

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer Merci d'être une part de ma vie

ASMA

Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des abreviations	
Introduction.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I Présentation de la Spiruline

I.1. Les cyanobactéries.....	3
I.2. La spiruline.....	3
I.2.1. Historique.....	3
I.2.2. Étude biologique.....	4
a. Définition.....	4
b. Taxonomie.....	5
c. Reproduction.....	5
d. Souches de <i>l'Arthrospira platensis</i>	6
I.3. Ecologie.....	7
I.4. Distribution géographique.....	8
I.5. Culture de la Spiruline.....	8
I.5.1. Condition de culture.....	8
a. Température.....	8
b. Lumière.....	8
c. pH.....	8
I.5.2 Milieu de culture.....	9
I.5.3. Les systèmes de culture.....	9

Chapitre II Valorisation de la Spiruline

II.1. Aspect nutritionnel.....	11
II.1.1. Protéines.....	11
II.1.2. Glucides.....	11
II.1.3. Lipides.....	11

II.1.4. Les enzymes	12
II.1.5. Vitamines	12
II.1.6. Minéraux et Oligoéléments	12
II.1.7. Pigments	13
II.1.7.1. La phycocyanine	13
II.1.7.2. La chlorophylle	14
II.1.7.3. Les caroténoïdes	14
II.2. Les activités biologiques de la spiruline	14
II.2.1. L'activité anti-oxydante	14
II.2.2. L'activité anti-inflammatoire	14
II.2.3. Activité antibactérienne	15
II.2.4. L'activité antifongique	15
II.2.5. L'Activité antivirale	15
II.2.6. Activité anticancéreuse	15
II.3. Substances antimicrobiennes	16
II.4. Potentialités et utilisation de la spiruline	16
II.4.1. Pour la santé	16
II.4.2. Autres utilisations.....	17

PARTIE PRATIQUE

Chapitre III Matériel et Méthodes

III.1. Matériel.....	18
III.1.1. Objectif du travail.....	18
III.1.2. Lieu de stage	18
III.1.3. Matériel biologique.....	18
III.1.3.1. Origine des souches de spiruline	18
III.1.3.2. Microorganismes testés.....	18
III.2. Méthodes.....	19
III.2.1. Extraction des composés bioactifs par macération hydro-méthanolique.....	20
III.2.2. Calcul de rendement d'extrait sec.....	21
III.2.3. L'activité antibactérienne de l'extrait de la spiruline	22
III.2.3.1 . Préparation des cultures bactérienne.....	22
III.2.3.1.1. Revivification des souches.....	22
III.2.3.1.2. Repiquage	22

III.2.3.2. Activité antibactérienne	22
III.2.4. l'activité antifongique de l'extrait de la spiruline	23
III.2.4.1. Préparation des cultures fongiques	24
III.2.4.1.1. Revivification des souches	24
III.2.4.1.2. Repiquage	24
III.2.4.2. Activité antifongique	24

Chapitre IV Résultats et Discussion

IV.1. Rendement en extrait brut	26
IV.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la spiruline	26
IV.2.1. Résultat de l'activité antibactérienne	26
IV.2.1.1. Activité antibactérienne de l'extrait sur <i>Bacillus subtilis</i>	Error! Bookmark not defined.
IV.2.1.2. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Listeria monocytogenes</i> :	28
IV.2.1.3. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Micrococcus luteus</i>	29
IV.2.1.4. Activité antibactérienne de l'extrait sur <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> :	29
IV.2.2. Activité antifongique	29
IV.2.2.1. Activité antifongique de l'extrait sur <i>Fusarium culmorum</i>	30
IV.2.2.2. Activité antifongique de l'extrait sur <i>Aspergillus carbonarius</i> :	30
IV.3. Discussion	31
Conclusion et perspectives	34
Références Bibliographiques	35
Annexe	43
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des tableaux

Tableau 01: Analyse typique des minéraux dans la spiruline.....	13
Tableau 02: Teneurs en pigments de <i>Spirulina plantensis</i>	13
Tableau 03 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques	16
Tableau 04 : Les souches bactériennes utilisées.....	18
Tableau 05 : Résultats de l'effet de l'extrait de la spiruline sur les souches bactériennes étudiées.....	27
Tableau 06 : Résultats de l'effet de l'extrait de la spiruline sur les souches fongiques étudiées.....	29
Tableau 07 : L'effet de l'extrait de <i>S. plantensis</i> sur différents microorganismes.....	31

Liste des figures

Figure 01:Forme végétative de <i>S. plantensis</i>	4
Figure 02: Morphologie de la spiruline	5
Figure 03: Cycle biologique de la Spiruline selon.....	6
Figure 04: Morphologies typiques de Spiruline	7
Figure 05: Exemple d'un système ouvert de culture d'algue	9
Figure 06: Exemple d'un système fermé (bioréacteur) de culture d'algue.....	10
Figure 07 : Plan générale de la partie expérimentale.....	19
Figure 08 : Les étapes d'extraction hydrométhanolique à partir de la poudre de spiruline des extraits bruts par macération.....	21
Figure 09:Les étapes de l'antibiogramme par la méthode de disques/puits.	25
Figure 10 :L'effet inhibiteur de l'extrait de <i>S. plantensis</i> contre <i>B. subtilis</i>	28
Figure 11 :L'effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre <i>L. monocytogenes</i>	28
Figure 12 :L'effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre de <i>M. luteus</i>	29
Figure 13:L'effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre de <i>P. Aeruginosa</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Figure 14:L'effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre <i>F. culmorum</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Figure 15:Effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre d' <i>A. Carbonarius</i>	30

Liste des photos

Photo 01: Evaporation sous vide à l'aide de rotavapeur.....	20
---	----

Liste des abréviations

ARDA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis.

SOD : Le superoxyde dismutase .

DMSO : Le diméthyle sulfoxyde .

Gélose MH : Mueller-Hinton.



INTRODUCTION

Introduction

Au-delà des micro-algues d'eaux douces ou salées, bien connues de tous, les algues présentent une formidable diversité que ce soit par le nombre d'espèces ou par leur forme et leur biologie (**Ahounou, 2018**).

Apparues, il y a probablement plus de trois milliard d'années, les algues bleues furent les premiers organismes photosynthétiques présents à la surface du globe.

Les algues ont des formes très complexes avec un niveau de diversité élevé : on compte environ 30 000 espèces actuellement réparties en 11 Embranchements.

De nos jours, la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses espèces d'algues comme la spiruline qui commence à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentiel de molécules naturelles bioactives (**Andreani, 2012**).

La Spiruline est une cyanobactérie consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique. Elle intéresse les scientifiques depuis plusieurs décennies par sa richesse nutritionnelle et ses multiples intérêts thérapeutiques. Riche en protéines, vitamines, molécules complexes, la spiruline permet de couvrir de nombreuses carences nutritives (**Ahounou, 2018**).

La recherche scientifique de plusieurs pays a mis en évidence son intérêt dans la lutte contre le cancer, le vieillissement cellulaire, les maladies infectieuses et les baisses du système immunitaire.

Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, et la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit à rechercher des substances naturelles dotées d'activités antimicrobiennes (**Tan, 2007**).

La prévention des épidémies ou le traitement de la maladie avec des médicaments ou les programmes de dépistage pour sélectionner des produits chimiques thérapeutiques s'attaquent à ce problème. La recherche des composés naturels ayant une activité antimicrobienne a gagné en importance ces dernières années en raison de l'inquiétude croissante dans le monde concernant l'augmentation alarmante du taux d'infection par des micro-organismes résistants aux antibiotiques (**Kaushik et Chauhan, 2008**).

Diverses souches des cyanobactéries et d'algues sont connues pour produire des métabolites intracellulaires et extracellulaires avec diverses activités biologiques telles que

des activités antalgiques, antibactériennes, antifongiques et antivirales. (Noaman *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2011; Al-Wathnani, 2012).

L'attention se concentre désormais sur les composants naturels produits par les organismes aquatiques. Les cyanobactéries sont des sources potentielles de produits chimiques et pharmaceutiques de grande valeur (Tan, 2007).

De nombreuses substances ont été identifiées comme agents antimicrobiens à partir d'algues (les dérivés de la chlorelline, l'acide acrylique, les composés aliphatiques halogénés, les terpènes, les composés hétérocycliques contenant du soufre, les inhibiteurs phénoliques, etc...) (Lavanya et Veerappan, 2011).

La cyanobactérie, *Spirulina platensis* (*S. platensis*), est devenue l'un des agents les plus prometteurs pour synthétiser de nouveaux composés thérapeutiques potentiels. Il est connu pour produire des métabolites intracellulaires et extracellulaires avec diverses activités biologiques telles que les antifongiques antivirales et antibactériennes (Kaushik et Chauhan 2008; Kumar *et al.*, 2011).

Le présent travail a été entrepris afin d'évaluer les activités antibactériennes et antifongiques de l'extrait de l'algue blue-vert *S. platensis* vis-à-vis à quelques souches microbiennes.

Afin de répondre à nos objectifs, nous avons divisé notre travail en deux parties :

La partie bibliographique de ce travail est consacrée à la présentation de la spiruline et sa valorisation sur le plan nutritionnel, les activités biologiques et son utilisation.

La partie pratique porte sur les méthodes utilisées, les résultats obtenus avec leur discussion.



PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Présentation

de

la Spiruline

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**Chapitre I : Présentation de la spiruline****I.1. Les cyanobactéries**

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques capables de synthétiser la chlorophylle en utilisant le H₂O comme donneur d'électron qui mène à la production d'oxygène. Ce sont également les seuls procaryotes à réaliser la photosynthèse oxygénique, similairement aux algues et les plantes supérieures (**Mary, 2003**).

Les cyanobactéries présentent une très grande diversité morphologique, elles peuvent être unicellulaires ou filamenteuses, regroupées en colonies, ou sous forme isolée (**Debois, 2007**).

I.2. La spiruline**I.2.1. Historique**

La Spiruline est considérée, par les biologistes, comme l'un des premiers "végétaux apparus sur la terre, il y a environ 3,5 milliards d'années (**Dujardin et al., 2007**).

En 1492, Christophe Colomb la découvre **au Mexique**, sous forme de petites galettes vertes séchées et le note dans son carnet de bord. Il mentionne ce qu'il croit être une algue, sous le vocable « potion magique » (**Fox, 1999**). La Spiruline constituait alors la nourriture principale des Aztèques au Mexique, jusqu'à la conquête espagnole au XVI^e siècle ; ils la récoltaient sous le nom de "tecuitlatl", autour du lac de Texcoco (**Fox, 1999**).

Retrouvée **au Tchad** en 1940, c'est surtout à partir de 1946 qu'intrigués par les pratiques anciennes à la recherche de ressources alimentaires à bon marché, des scientifiques ont redécouvert la Spiruline et ses propriétés remarquables (**Jourdan, 1999**).

Depuis les années 80, la Spiruline a fait l'objet de plusieurs dizaines d'études scientifiques, par des chercheurs du monde entier, et nous sommes encore loin de connaître tous les effets bénéfiques d'une consommation quotidienne de Spiruline (**Girardin et al., 2011**).

I.2.2. Étude biologique

a. Définition

La Spiruline est une cyanobactérie (anciennement désignée par le terme « **algue bleue** » puis (**cyanophycée**). Son habitat aquatique. Sa morphologie proche de celle des algues; Sa couleur liée à sa teneur en pigments bleu (phycocyanine) et vert (chlorophylle). Elle appartient donc au domaine des bactéries (*Bacteria*) et se classe parmi les bactéries gram négatives. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. (Jean ,2011).



Figure 01:Forme végétative de *S. plantensis* (Jean, 2011).

La Spiruline se présente sous la forme d'un filament pluricellulaire bleu-vert, mobile, non ramifié et enroulé en spirale. Ce filament est appelé trichome ; sa forme hélicoïdale, observable uniquement en milieu liquide, est caractéristique du genre. Par ailleurs, contrairement à certaines autres cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*), la spiruline ne possède pas les cellules spécialisées permettant la fixation de l'azote de l'air (hétérocystes). La longueur moyenne du filament est de 250 μm lorsqu'il a 7 spires et son diamètre est d'environ 10 μm à 12 μm . Mais les paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur) ne sont pas toujours les mêmes selon les chercheurs qui étudient la Spiruline. (Cruchot ,2008).



Figure 02: Morphologie de la spiruline (Ciferri, 1983).

(a)- sous microscope optique ; (b)- Micrographie électronique de *S. platensis* ;

b. Taxonomie

La Spiruline était à l'origine considérée comme une algue. Cependant, en 1960 une claire distinction entre procaryote et eucaryote a été définie, basée sur la différence d'organisation cellulaire. En 1962, **Stanier *et al.***, constataient que cette algue bleue verte était dépourvue de compartiments cellulaires, et donc faisait partie des procaryotes ; ils proposaient de désigner ce microorganisme «**Cyanobactérie**».

On la classe selon (**Charpy *et al.*, 2008**) :

Règne : *Monera*

Sous règne : *Prokaryota*

Phylum : *Cyanobacteria*

Classe : *Cyanophyceae*

Ordre : *Nostocales*

Famille : *Oscillatoriceae*

Genre : *Arthrospira*

Espèce : *Arthrospira platensis*.

c. Reproduction

La spiruline se développe de 25% chaque jour, sa quantité doublant en 4 jours. Sa reproduction est végétative (asexuée) et s'effectue par scission simple (séparation), fission binaire (= scissiparité, se divise en deux cellules égales) ou multiple, par bourgeonnement ou

fragmentation au hasard. La cyanobactérie fait copie de son seul chromosome. La cellule s'allonge et les chromosomes se séparent. La paroi se forme pour diviser les deux cellules.

Les 3 étapes fondamentales de son cycle de vie sont :

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

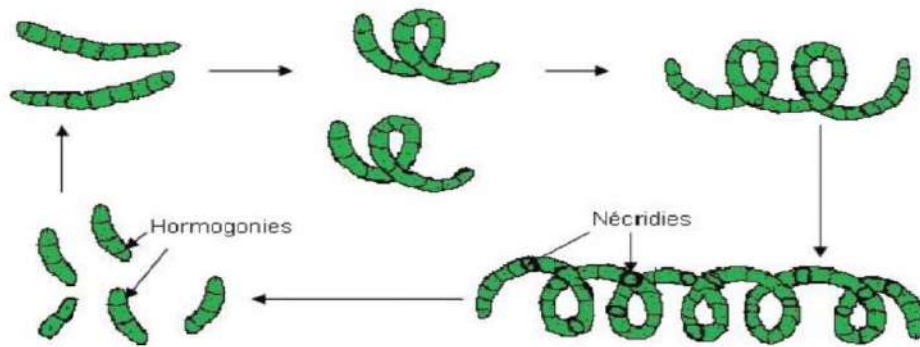


Figure 03: Cycle biologique de la Spiruline selon (Balloni *et al.* 1980 in Charpy, 2008).

d. Souches de l'*Arthrospira platensis*

C'est la plus connue et la plus utilisée lors des travaux de recherche ou lors de l'ensemencement de nouvelles cultures. Elle se compose de trichomes atteignant 350µm de long et entre 6 et 12,45µm de diamètre ; ils sont un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50µm, diminuant légèrement vers les extrémités (Fox, 1999). On trouve cependant des Spirulines ondulées et parfois droites.

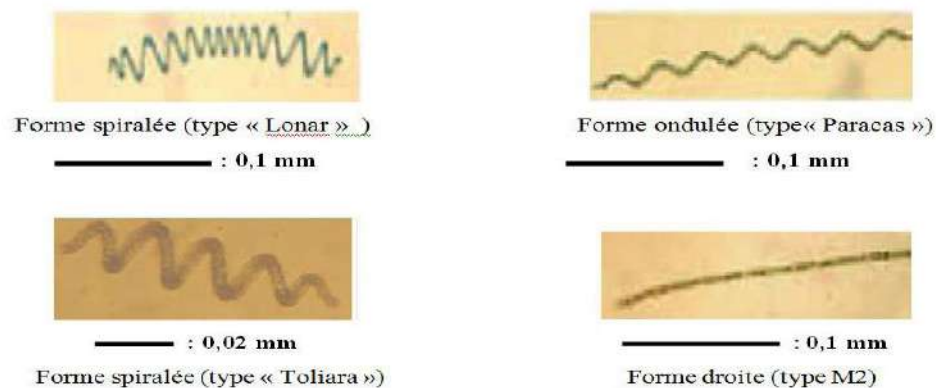
L'analyse des caractéristiques génétiques de l'espèce *S. platensis* effectuées par (Scheldeman *et al.*, 1999), basées sur l'ARDA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) montre une grande plasticité morphologique.

Sachant que certaines souches initialement spiralées peuvent devenir ondulées ou droites (Cruchot, 2008), ceci est peut-être dû aux facteurs physicochimiques exogènes tels que la température, ou d'autres facteurs probablement liés aux changements génétiques (Belay, 2007).

En ce qui concerne les différentes souches (ou variétés) de *S. platensis*, on distingue les souches "spiralées", "ondulées", et "droite (Figure N° 03):

- **Les souches "spiralées"** : désigne les souches dont les filaments ont la forme d'une queue de cochon, telle la "Lonar" (Inde)
- **Les souches "ondulées"** : le terme "ondulées" désigne les souches dont les filaments sont en spirale étirée, telle la "Paracas" (Pérou).
- **Les souches "droites"** : le terme "droites" désigne les souches dont les filaments sont tellement étirés qu'ils donnent l'impression d'être presque rectilignes.

Quelque soit la forme de la *S. platensis*, cela ne change en rien sa composition. Le changement de forme est lié à son adaptabilité dimensionnelle se rapportant au milieu de culture. (Callara, 2008).



**Figure 04: Morphologies typiques de Spiruline (Source: Antenna Technologie)
(Falquet et Hurni ,2006).**

I.3. Ecologie

La Spiruline est un organisme ubiquiste et thermophile, elle a été trouvée dans des milieux ayant une concentration de 8,5 à 270 grammes de sel par litre (Ilits, 1968).

Le genre *Arthrospira* se trouve naturellement dans les eaux marines, les lacs alcalins, contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3), ou du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) d'autres minéraux et une source d'azote fixée (Fox, 1999). Certaines formes sont planctoniques par la présence de vésicules de gaz, d'autres sont benthiques sans vésicules de gaz (Castenholz, 2001).

I.4. Distribution géographique

Contrairement à de nombreuses autres algues, la spiruline se développe naturellement dans des lacs alcalins riches en sels minéraux des régions chaudes et ensoleillées, soit dans une zone tropico-équatoriale entre la 35° latitude nord et 35° latitude Sud (Castenholz, 2001)..

En dehors des sites cités dans (annexe N°01), d'autres endroits sont possibles.

I.5. Culture de la Spiruline

Arthrospira (*S. platensis*) est une micro algue largement cultivée dans le monde. La production mondiale de cette première a augmenté depuis 1995 de plus de 4000T/an (Statistique Cubia, 2000). La *S. platensis* se développe soit dans des cultures artificielles soit dans des cultures de lac. Elle s'adapte à de nombreux biotope (sable, eau douce et eau de mer) (Tredeci *et al.*, 1986 ; wu *et al.*, 1993; Halland, 2006).

I.5.1. Condition de culture

Il existe trois facteurs essentiels déterminants pour la culture de la Spiruline ,la température, la lumière et le pH.

a. Température

La Spiruline pousse idéalement lorsque la température du milieu de culture est de 37°C. Des températures supérieures à 40°C ne lui conviennent pas et, elle meurt lorsqu'elle est exposée à 43°C. Par ailleurs, à 20°C, sa croissance est pratiquement nulle (Fox, 1999).

b. Lumière

Comme en diminuant l'éclairement, on diminue aussi la photosynthèse totale, il faut, si possible, éviter la photolyse. Autrement dit deux conditions sont nécessaires pour la croissance de la Spiruline (Danesi *et al.*, 2004).

c. pH

Le pH sera entre 8.5 et 10.5 (Jordan, 1999), naturellement, la spiruline a tendance à alcaliniser le milieu. En effet le CO₂ dissous dans l'eau, une fois mobilisé par la Spiruline, libèrent des ions carbonates (CO₃²⁻) qui en s'hydrolysant vont libérer des ions (OH⁻) (Danesi *et al.*, 2004).

D'autres facteurs moins importants seront aussi à prendre en compte comme la salinité et l'agitation du milieu.

I.5.2 Milieu de culture

Il s'agit d'une reproduction artificielle du milieu dans lequel la Spiruline croît naturellement. C'est donc une solution natronée et alcaline constituée d'un mélange d'eau et de sels minéraux, qui apporte à la Spiruline tous les éléments chimiques qui lui sont nécessaires (Jourdan, 2014) : azote (N), phosphore (P), potassium (K). (Annexe N° 03) donne la composition chimique d'un milieu de culture typique (Fox, 1999).

✓ L'eau

Les spirulines vivent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable (mais ne sentant pas fortement le chlore) au moins filtrée (sur bougie filtrante ou sable), le plus important étant l'élimination des algues étrangères. L'eau de pluie, de source ou de forage est en général de qualité convenable. (Jordan, 1999).

I.5.3. Les systèmes de culture

La culture de spiruline nécessite des sels inorganiques au milieu de culture et une énergie lumineuse, on distingue deux systèmes sont (Zighmi, 2017):

- **Les systèmes ouverts** : ils sont des systèmes non contrôlés et ont des couts de construction très faible, ils nécessitent un moins d'entretien et avoir des besoins énergétiques inférieures, mais la productivité de biomasse est très faible (figure05).



Figure 05: Exemple d'un système ouvert de culture d'algue (Zighmi., 2017).

- **Les systèmes fermés** : les systèmes fermés sont plus chers que l'ouverts en termes de construction, les exigences énergétiques et l'entretien, mais ils permettent le contrôle des paramètres comme le pH, l'injection de CO₂ et la température. Donc on obtient une biomasse d'une qualité supérieure (Zighmi., 2017)(Figure 06).



Figure 06: Exemple d'un système fermé (bioréacteur) de culture d'algue .



Chapitre II

Valorisation

de

la spiruline

Chapitre II. Valorisation de la Spiruline**II.1.Aspect nutritionnel**

La Spiruline est utilisée, en alimentation humaine, grâce à sa richesse en protéines, vitamines, minéraux et acides gras. C'est l'ensemble de tous se nombreux facteurs nutritifs qui en fait un aliment si précieux. La composition chimique des spirulines est variable selon les conditions de culture, mais Les caractéristiques les plus intéressantes restent toujours présentes (**Clement, 1975**).

II.1.1.Protéines

Les protéines représentent entre 50 et 70% du poids sec, ces valeurs sont tout à fait exceptionnelles, même parmi les micro-organismes. D'un point de vue qualitatif, ces protéines sont complètes. puisqu'on y retrouve tous les acides aminés essentiels (valine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane), (**Bujard et al., 1996**). (Pourcentage moyen des acides aminés de spirulina selon différentes auteurs et de *spirulina maxima* d'après (**Browitzka, 1988**) (voir annexe 3).

Ce pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (35%) et des céréales (14%) (**Henrikson, 1994**).

Plus la luminosité est élevée, plus le pourcentage en protéines est élevé. De ce fait, la Spiruline ne nécessite pas de cuisson ni même l'administration d'un traitement spécial pour une bonne digestibilité protéique. (**Falquet, 1996 ; Kozlenko, 1996**).

II.1.2. Glucides

Les glucides constituent globalement 15 à 25% de la matière sèche des Spirulines. L'essentiel des glucides assimilables est constitué de polymères tels que des glucosannesaminés (1.9% du poids sec) et des rhamnosannes aminés (9.7%) ou encore de glycogène(0.5%). Les glucides simples ne sont présents qu'en très faibles quantités (glucose, fructose et saccharose), on trouve aussi des polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol (**Ciferri, 1983; Flaquet, 2006**).

II.1.3. Lipides

La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. La composition des principaux acides gras révèle la

présence d'une forte concentration en acides gras essentiels, incluant des oméga-3 et des oméga-6 qui préviendraient l'accumulation de cholestérol dans l'organisme (**Hug et al., 2011**).

Les lipides peuvent être séparés en une fraction saponifiable (83 %) et une fraction insaponifiable (17%) contenant essentiellement une paraffine, des pigments, des alcools terpéniques et des stérols

II.1.4. Les enzymes

De nombreuses enzymes entrent aussi dans la composition de la spiruline, sortes de «facilitateurs» biologiques, dont l'exceptionnel SOD (superoxyde dismutase), qui représente une arme majeure contre l'oxydation ou le vieillissement cellulaire (**Ahounou, 2018**).

La biodisponibilité de la SOD est très importante grâce à la membrane de la spiruline dépourvue de cellulose (**Manet, 2016**).

II.1.5. Vitamines

La Spiruline est une algue vitaminée, elle est la deuxième source de vitamine B1 derrière la levure de bière. Elle contient aussi une concentration relativement élevée de provitamine A, vitamine B 12 et β -carotène (**Belay, 1997 ; Sall et al., 1999 ; Cruchot, 2008**).

II.1.6. Minéraux et Oligoéléments

La spiruline contient tous les minéraux essentiels (7% du poids sec). Selon le pH et la composition du milieu de culture, elle absorbe plus ou moins les minéraux d'où des teneurs variables (**Goulambasse, 2018**).

Les oligoéléments ou éléments traces présents dans la spiruline sont le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, l'iode, le fluor, le chrome, le calcium et magnésium, les autres éléments, en quantité plus significative, sont considérés comme des minéraux (**Avino et al., 2000**).

Tableau 01: Analyse typique des minéraux dans la spiruline (mg/kg)(Falquet *et al.*, 2006).

Minéraux	Teneur de la spiruline (mg/kg)	Doses requises (mg/jour)*
Calcium	1300-14000	1200
Phosphore	6700-9000	1000
Magnésium	2000-4000	250-350
Fer	600-6000**	18
Zinc	21-6000**	15
Cuivre	8-2000**	1.5-3
Chrome	2.8	0.5-2
Manganèse	25-37	5
Sodium	4500	500
Potassium	6400-15400	3500
sélénium	0.01-50**	0.05

II.1.7. Pigments

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

Tableau 02: Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de *S. plantensis* (Pierlovisi, 2007).

Pigments	Teneur en mg/10g
Chlorophylles totales	115
Chlorophylle a	61-75
Caroténoïdes (orange)	37
Phycocyanine (bleu)	1500-2000
Phycoérythrine (rouge)	2900-10000

II.1.7.1. La phycocyanine

Elle est constituée d'une structure protéique reliée à un chromophore. C'est un pigment assez rare dans la nature qui absorbe la lumière dans une longueur de 61 à 650 nanomètres. Elle est représentée à environ à hauteur de 10 à 11% en moyenne dans la spiruline. Appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses recherches sont en cours pour connaître toutes ses propriétés. Sa structure

particulière lui confère des propriétés antioxydants, anti radicalaires et détoxifiantes. (Charlemagne, 2008).

II.1.7.2. La chlorophylle

Elle est un pigment essentiel de la photosynthèse puisqu'elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique. Constituée d'un atome de magnésium en son centre, la chlorophylle est parfois comparée à l'hémoglobine qui possède quant à elle un atome de fer. La spiruline en contient environ 1%, ce qui stimulerait les fonctions de presque tous les organes (Charlemagne, 2008).

II.1.7.3. Les caroténoïdes

Elles sont des pigments non azotés dont la coloration varie du jaune au rouge. La plupart des caroténoïdes sont des provitamines a indispensables aux hommes et aux animaux. La spiruline en contient entre 20 et 25 fois plus que les carottes. Le bêta carotène représente 80% des caroténoïdes présents. Les caroténoïdes ont une action anti radicalaire. Ils participent également à la croissance et au développement de l'individu, ainsi qu'au maintien de la vision nocturne (Charlemagne, 2008).

II.2. Les activités biologiques de la spiruline

II.2.1. L'activité anti-oxydante

Les principaux actifs antioxydants qui confèrent un statut indétrônable d'antioxydant puissant à la spiruline sont : la phycocyanine, la bêta carotène, les polyphénols, le superoxyde dismutase (SOD) et d'autres vitamines et minéraux contenus dans cette matière (Goulambasse, 2018).

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont identifié cette activité potentielle de la spiruline (ou de ses extraits) et ont montré que le traitement à la spiruline réduit significativement le stress oxydatif (Goulambasse, 2018). Elle permet le ralentissement du vieillissement et de la destruction des cellules (Barth et Leo, 2019).

II.2.2. L'activité anti-inflammatoire

La richesse de la spiruline en protéines et en acides gras notamment les oméga 3 et 6 qui ne peuvent pas synthétisés par l'organisme lui donnent un intérêt biologique particulier puisque cet acide gras est un précurseur des prostaglandines, molécules ayant une activité anti-inflammatoire et immunostimulante au sein de l'organisme (Charpy *et al.*, 2008).

II.2.3. Activité antibactérienne

La spiruline possède des mécanismes de défense pour lutter contre les bactéries pathogènes. En effet, des études *In vitro* d'extraits de spiruline sur les bactéries *Escherchia coli* et *Staphylococcus aureus* ont permis d'observer un potentiel antimicrobien. (**Kaushik et Chauhan, 2008**).

II.2.4. L'activité antifongique

L'activité antifongique de la spiruline a été démontré par l'étude de **Boutalbi S. 2014**, qu'elle a trouvé que la *Spiruline* possède une bonne activité antifongique, le diamètre de croissance mycélienne est inversement proportionnel aux concentrations extraits de *spiruline* dans le milieu de culture.

II.2.5. L'Activité antivirale

La spiruline bloque l'adsorption et la pénétration virale dans la membrane Cellulaire a cause de sa richesse en β -carotène, en vitamine B12 (**Hayashi et al., 1993**).

Le mécanisme semble reposer sur le fait que le virus, ne pouvant se fixer sur la membrane de la cellule hôte, ne peut donc ni pénétrer celle-ci ni, par voie de conséquence, se répliquer (**Andreani, 2012**).

II.2.6. Activité anticancéreuse

Différentes études ont affirmé que la bêta-carotène, un des antioxydants implanté dans la spiruline, pourrait inverser le processus cancéreux et inhiber le déploiement des cellules cancérigènes. Une de ces études confirmatives du résultat fut élaborée avec des personnes qui avaient une leucoplasie buccale (état précancéreux de la bouche). Ces derniers, ont montré après une prise quotidienne d'1g de spiruline pendant un an une amélioration de leur état et réussirent à arrêter le développement de la pathologie (**Vidalo, 2015**).

La phycocyanine intervient aussi dans cette activité en s'attaquant aux radicaux libres responsables du cancer (**Vidalo, 2015**).

II.3. Substances antimicrobiennes

L'activité antibactérienne de *S. platensis* était due aux composés bioactifs qui les contient notamment les composés phénoliques : les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins (Setyaningsih *et al.*, 2020) (Tableau 03).

Tableau 03 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Hennebelle, 2007 ; Li *et al.*, 2007 ; Habauztt et Horcajada, 2008 ; Bondla *et al.*, 2009 ; Gresele *et al.*, 2011 ; KEBBAB, 2014).

Composés phénoliques	Activité biologique
Acides phénols	Antifongique, antioxydant, antibactérienne
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant Anti diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur.
Flavonoïdes	Anti tumorale, anti carcinogène, anti-inflammatoire, antioxydant, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, anti-bactérienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, antioxydant, protectrice vasculaire et anti-œdémateuse
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants anti-tumoraux, antifongiques et anti-inflammatoires
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydants
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques.

II.4. Potentialités et utilisation de la spiruline

II.4.1. Pour la santé

Dans les pays développés et dans quelques régions d’Afrique, la spiruline est consommée comme complément alimentaire « bénéfique à la santé ». Elle est vendue dans le secteur des produits dits « Bio ». Diverses utilisations sont proposées par les négociants avec des arguments basés sur la composition de cet organisme et les études sur les activités de ses composants. Nous présentons ci-dessous certaines utilisations, sans pouvoir juger de leur efficacité.

La spiruline n’est pas un médicament. Donc, elle n’est pas soumise à l’obligation de test d’efficacité: le dosage recommandé et la qualité du produit vendu ne sont pas nécessairement en adéquation avec les effets affichés.

La spiruline est vendue :

- Pour une alimentation équilibrée : par ses apports en micronutriments ;
- Dans les régimes amaigrissants : pour ses taux importants en protéines et en Phénylalanine, qui régulerait l'appétit ;
- Pour l'amélioration des capacités sportives : par ses teneurs en fer, en vitamine B12, et en β -carotène qui faciliteraient la récupération ;
- Pour son activité antioxydant liée à la phycocyanine ;
- Pour son activité anticoagulante liée à la spiruline Calcique (Sp-Ca) et au spiruline Sodique (Sp-Na) ;
- Pour renforcer le système immunitaire grâce aux polysaccharides ;
- Pour son activité antivirale : liée au β -carotène et vitamine B12 ;
- Pour son activité anti tumorale : liée à la phycocyanine ;
- Pour son activité de diminuer le cholestérol grâce aux acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6 (**Parikh et al., 2001**).

II.4.2. Autres utilisations

- ✓ **En cosmétique**, la spiruline est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge, grâce à son action sur le renouvellement cellulaire et la tonicité des tissus. Elle est aussi utilisée en synergie avec d'autres algues, comme agent cicatrisant et antiseptique (**Spolaore et al, 2006**).
- ✓ **Dans l'agroalimentaire**, elle est utilisée comme colorant naturel (la phycocyanine est un des rares pigments naturels de couleur bleue) dans les chewinggums, sorbets, sucreries, produits laitiers, boissons non alcoolisées.
- ✓ **Spiruline à usage animal**, la spiruline est utilisée comme complément nutritionnel en agroalimentaire, pour des effets très spécifiques :
 - ❖ **Favoriser la croissance et la fertilité**
Des études sur les poissons d'aquarium tels la crevette (**Kim et al., 2006**) ont montré les effets bénéfiques de *S. platensis* en ce domaine. L'influence bénéfique sur la croissance, de l'incorporation de spiruline dans la nourriture des poulets de chair a été présentée par d'autres chercheurs (**Razafindrajaona et al., 2000**).
 - ❖ **Renforcer les défenses immunitaires**
La spiruline est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage, plus souvent soumis à des infections virales et/ou bactériennes que les poissons sauvages (**Watanuki, 2006**).



PARTIE

PRATIQUE

Chapitre III

Matériel

et

Méthodes

Chapitre III: Matériel et méthodes

III.1. Matériel

III.1.1. Objectif du travail

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antibactérien des produits naturels extraits des algues. C'est dans ce contexte que le présent travail a étudié l'activité antimicrobienne de la spiruline.

III.1.2. Lieu de stage

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie d'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Ouargla.

III.1.3. Matériel biologique

III.1.3.1. Origine des souches de spiruline

Nous avons travaillé avec une souche de cyanobactéries : *S. platensis* d'origine Tchadienne.

III.1.3.2. Microorganismes testés

Notre étude a porté sur 6 souches de référence qui sont :

Quatre bactéries pathogènes : à Gram différents (**Tableau 04**) et **deux espèces de champignons** : *Aspergillus carbonarius* (*A. carbonarius*) et *Fusarium culmorum* (*F. culmorum*).

Tableau 04 : Les souches bactériennes utilisées.

	Bactéries	Références
Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i> (<i>B. subtilis</i>)	ATCC 6633
	<i>Listeria monocytogenes</i> (<i>L. monocytogenes</i>)	ATCC 13932
	<i>Micrococcus luteus</i> (<i>M. luteus</i>)	ATCC 9314
Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. Aeruginosa</i>)	ATCC9027

III.2. Méthodes

Ce travail a été effectué selon le plan illustré dans la **figure 07** :

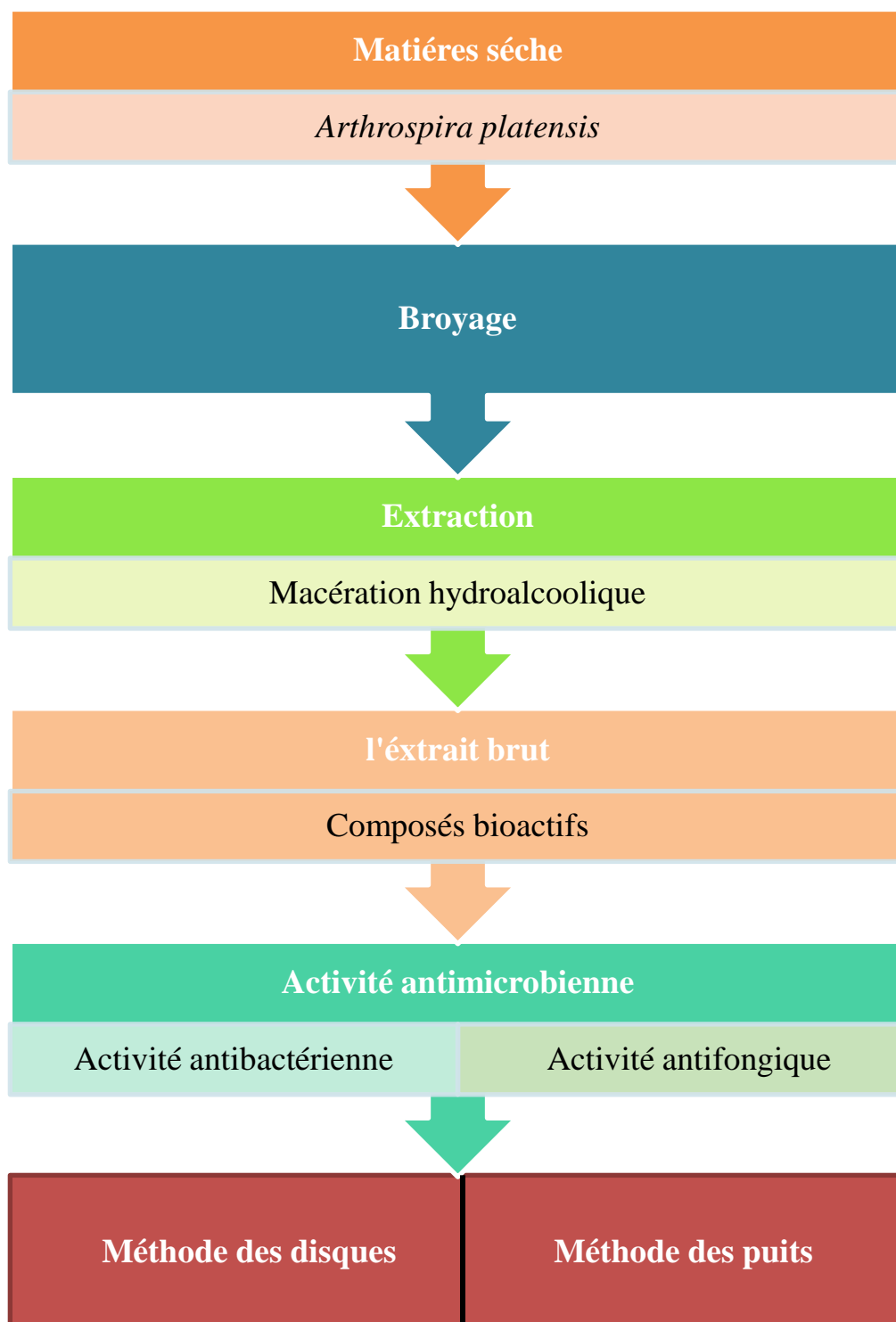


Figure 07 : Plan générale de la partie expérimentale.

III.2.1. Extraction des composés bioactifs par macération hydro-méthanolique

Pour l'extraction des principaux composés bioactifs tels que les polyphénols contenus dans les plantes nous avons opté pour l'utilisation d'une méthode décrite par **Sultana *et al.*, (2009)**. Cette méthode d'extraction n'est qu'un procédé d'extraction discontinu solide-liquide par macération et qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante durant quelques temps et à extraire les constituants solubles par évaporation du solvant sous vide.

L'extraction des composés bioactifs des micro-algues est réalisée par usage de Méthanol comme solvant d'extraction. Elle est effectuée sur des prises d'échantillons de 10 g de matière broyée. Le broyat est mélangé avec 100 ml de solvant aqueux (70/30, solvant/eau). Le mélange est laissé pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. La durée de l'extraction favorise la dépolymérisation des principaux composés constitutifs de l'algue tels que la lignine ainsi que les substances pectiques et permet une meilleure solubilisation des principaux composés bioactifs (**Ali et Doumandji, 2017**) (**Figure 08**).

L'extrait hydro alcoolique obtenu sera filtré en utilisant un papier filtre Wattman et débarrassé du solvant par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapeur à 45°C (**Photo 01**).

L'extrait est transféré dans un four à air chaud, où il est séché à 40°C et stockés et conservé dans un flacon sombre à 4 °C.



Photo 01: Évaporation sous vide à l'aide de rotavapeur.

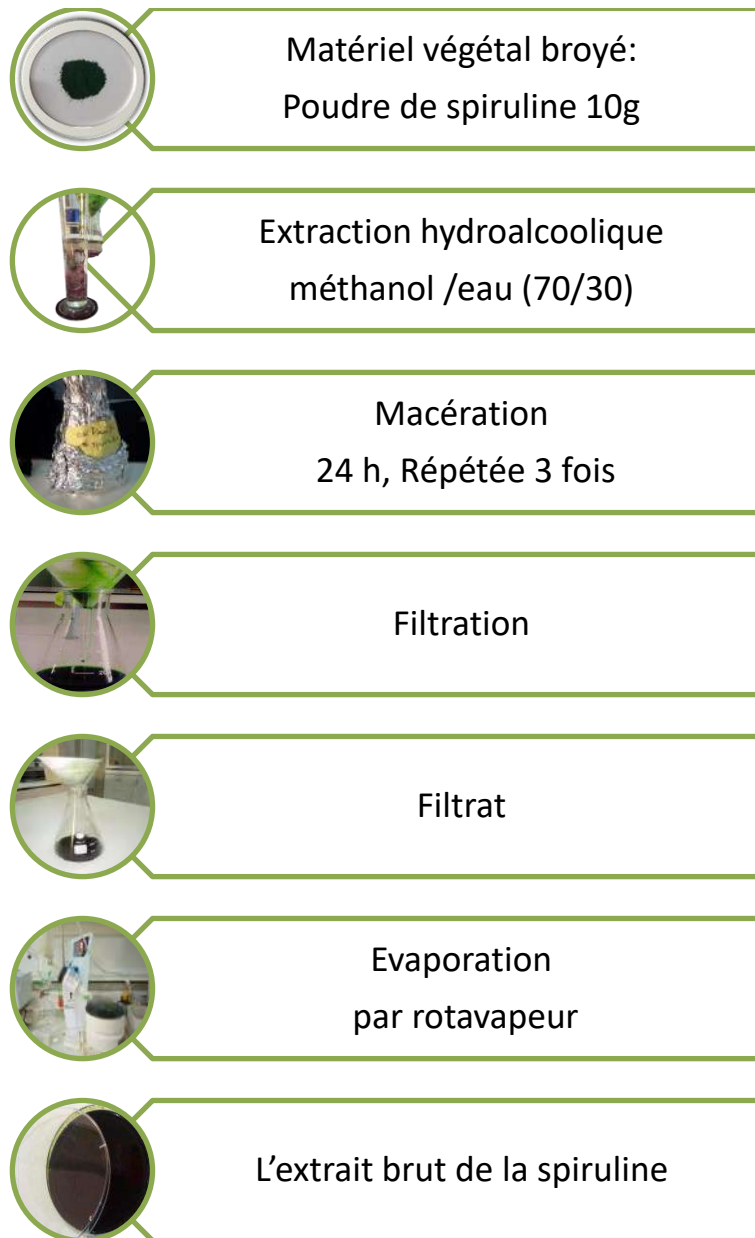


Figure 08 : Les étapes d'extraction hydrométhanolique à partir de la poudre de spiruline des extraits bruts par macération.

III.2.2. Calcul de rendement d'extrait sec

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$R_{dt} = (PB / PA) \times 100$$

PB : poids d'extrait brut

PA : poids de la plante sèche en poudre (Abe E *et al.*, 2010).

III.2.3. l'activité antibactérienne de l'extrait de la spiruline

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait de *S. platensis* est réalisée par deux méthodes de diffusion : sur disque et sur puits (Hellal, 2011), selon les étapes suivantes :

III.2.3.1. Préparation des cultures bactérienne**III.2.3.1.1. Revivification des souches**

Les souches conservées sontensemencées dans 5 ml de bouillon nutritif (Annexe 04). L'ensemble est incubé à une température de 37°C pendant 24h. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches (Sivakumar et Santhanam, 2011).

III.2.3.1.2. Repiquage

Le milieu Mueller-Hinton (gélose MH) est utilisé pour étudier l'activité antibactérienne des différentes souches bactériennes(Annexe 04). Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre a une épaisseur de 4 mm (Environ 15 ml). Les boîtes sont ensuite refroidies 30 min avant leur utilisation. Après refroidissement et solidification du milieu de culture sur la paille, la suspension bactérienne (conserves en bouillon nutritif) estensemencée sur milieu solidifié. Les boîtes sont ensuite fermées et incubée à température de 37°C pendant 24h.

III.2.3.2. Activité antibactérienne**a. Préparation de l'inoculum**

Après incubation, une quantité équivalente de 0.5 Mc Farland à l'aide d'un colorimètre (on obtient alors des inoculum estimés de 10^6 à 10^8 unités formant colonies par millilitre (UFC/ ml)) de chaque colonie des souches étudiées estensemencée dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique. Toutes les souches bactériennes à étudier sontensemencées par la méthode d'inondation sur une gélose MH à partir de l'inoculum préparé dans des conditions aseptiques à raison de trois répétitions pour chaque souche et pour chaque méthode.

b. Méthode de diffusion sur disques

La méthode de diffusion sur disques est basée sur la diffusion des substances à tester dans une gélose de culture sur laquelle pousse les bactéries (Hellal, 2001).

Dans les conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques stériles de papier wattman de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface de la gélose (7 disques/boîte). Les disques sont chargés chacun par 10 µl des extraits de la spiruline. Ces extraits ont été préparé avec une solution à 1 mg/ml dans le diméthyle sulfoxyde (**DMSO**) a déférentes concentrations (0,1, 10, 25, 50, 75 et 100 mg / ml). Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24h (**Hellal, 2001**).

Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés avec précision, et en fonction des valeurs de références, l'effet de notre extrait a été évalué. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible (**Pibiri, 2006**).

c. Méthode de diffusion sur puits

Cette méthode est basée sur la diffusion des substances à tester qui sont imprégnées dans des puits sur un milieu solide ensemencé avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre ces substances et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (**Hellal., 2011**).

A la surface des boîtes inoculées on provoque des puits (7 puits/boîte) de 8 mm de diamètre et chacun est imprégné par 60 µl d'extrait de *S. platensis* à différentes concentrations (**Vardar et al., 2003**).

Pour une bonne diffusion, les boîtes sont laissées sur la paillasse pendant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Après incubation, la zone d'inhibition autour du puits est observée et mesurée (**Annexe 05**).

L'activité antibactérienne de l'extrait de spiruline testé est déterminée par la mesure avec précision des diamètres des zones d'inhibition obtenues au contact et autour les puits et les disques. La comparaison des résultats obtenus avec les valeurs des références nous permet d'évaluer l'effet de notre extrait.

III.2.4. l'activité antifongique de l'extrait de la spiruline

Deux méthodes sont réalisées dans cette étude pour la détermination de l'activité antifongique : méthodes de diffusion sur disque et sur puits (**Aboun et al., 2008 ; Abi-ayad, 2009**).

III.2.4.1. Préparation des cultures fongiques

III.2.4.1.1. Revivification des souches

Les souches conservées sont ensemencées dans 5 ml de bouillon nutritif. L'ensemble est incubé à une température de 25°C pendant 24h. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches (**Sivakumar et Santhanam, 2011**).

III.2.4.1.2. Repiquage

Dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre, 15 ml des milieux MH sont coulés et l'épaisseur doit être impérativement de 4 mm. Les milieux sont laissés se solidifier sur une surface dans des conditions aseptiques.

L'ensemencement de la suspension fongique est fait par inondation sur toute la surface du milieu solidifié.

Les boîtes sont ensuite fermées et incubées à température de 37°C pendant 24h.

III.2.4.2. Activité antifongique

a. Préparation de l'inoculum

Les colonies qui ont été isolées à partir des cultures jeunes sur milieu gélose nutritive incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures sont transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile, afin de préparer des suspensions ayant une turbidité équivalente au standard Mc Farland 0.5 ce qui correspond à 10^8 UFC/ml.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort (**Aboun et al., 2008 ; Abi-ayad, 2009**).

b. Méthode de diffusion sur disques

Des disques de diffusion sont à la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Dans chaque boîte, 7 disques de 6 mm de diamètre (papier wattman) sont imbibés des extraits de la spiruline. Ces extraits ont été préparés avec une solution à 1 mg/ml dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à différentes concentrations (0,1, 10, 25, 50, 75 et 100 mg / ml) (**Annexe 05**). Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24h (**Aboun et al., 2008 ; Abi-ayad, 2009**).

L'inhibition de la croissance est traduite par l'apparition des halos clairs autour des disques et les résultats sont obtenus en mesurant le diamètre de ces zones d'inhibition (**Eucast, 2010**).

c. Méthode de diffusion sur puits

Après l’ensemencement et le séchage des boîtes de pétri, les puits sont comblés avec les extraits de micro-algue. Et les semences sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures (Eucast, 2010).

L’activité antibactérienne des métabolites extracellulaires testés est déterminée par la mesure des zones d’inhibition obtenues au contact et autour des disques.

Tous les tests sont réalisés en triplicata.

Le dispositif expérimental adopté pour la réalisation de cette partie de travail est représenté dans la **Figure 09**.

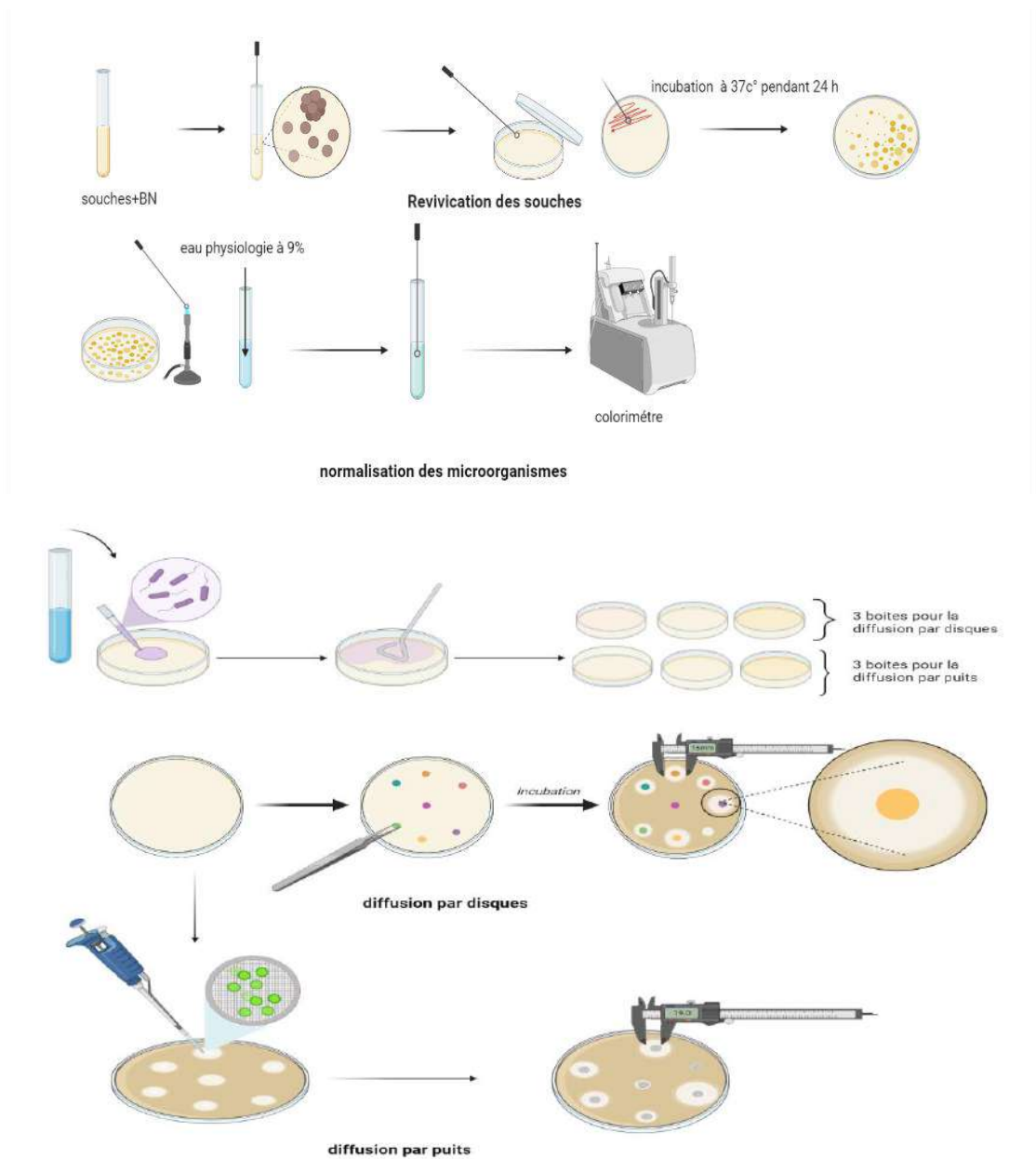


Figure 09:Les étapes de l’antibiogramme par la méthode de disques/puits.

Chapitre IV

Résultats

et

Discussion

Chapitre IV: Résultats et discussion

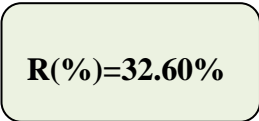
IV.1. Rendement en extrait brut

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement et l'identification des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leurs activités biologiques diverses en particulier leur propriétés antioxydants (**Sultana *et al.*, 2006**).

La macération de 10 g de la poudre de *S. platensis* dans la solution hydro-méthanolique a permis d'obtenir un extrait sec de couleur verte foncée, aspect solide avec une odeur piquante, ces résultats sont similaires aux résultats des études précédentes tel que celle de **Doumandji *et al.*, (2011)** (**Doumandji *et al.*, 2011**).

Le rendement de l'extrait a été déterminé par rapport au matériel végétal sec. Le résultat du calcul du rendement massique et le pourcentage obtenu est :

$$R(\%)=(3.260/10)\times 100=32.60\%$$



R(%)=32.60%

IV.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait de la spiruline

L'activité de l'extrait méthanolique de *S. platensis* a été testée contre deux Champignons (*A. carbonarius* et *F. culmorum*) et quatre bactéries : trois bactéries à Gram positif (*B. subtilis*, *L. monocytogenes*, et *M. luteus*) et une bactérie à Gram négatif (*P. aeruginosa*).

IV.2.1. Résultat de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu par la méthode de diffusion sur le milieu Mueller-Hinton gélosé par disques et par puits sont présentés ci-dessous (**Tableau 05**). Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition sont incluses en (mm± écart-type).

Tableau 05 : Résultats de l'effet de l'extrait de la spiruline sur les souches bactériennes étudiées.

Souches	Diffusion sur disques	Diffusion sur puits
<i>B. subtilis</i>	14±0.10 mm	17±0.5 mm
<i>L. monocytogenes</i>	18±0.25 mm	15±0.10 mm
<i>M. luteus</i>	10±0.14 mm	13±0.75 mm
<i>P. aeruginosa</i>	R	R

R : Résistance.

Les résultats des tests antibactériens montrent que l'extrait de la *S. platensis* à une activité antibactérienne. Cette activité est révélée que contre les bactéries à Gram positif (*B. subtilis*, *L. monocytogenes*, et *M. luteus*).

En effet les deux méthodes de diffusion utilisés révélées la sensibilité de toutes les bactéries à Gram positif avec des diamètres varient entre 10 et 18 mm marqués respectivement contre les bactéries *M. luteus*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes*, la plus grand sensibilité est marquée contre la dernière souche.

Par contre une résistance est marquée contre la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa*.

IV.2.1.1. Activité antibactérienne de l'extrait sur *Bacillus subtilis*

Notre extrait de la spiruline exerce un effet inhibitrice contre la *B. subtilis* apparait par un halo de (17±0.5 mm) par la méthode des puits et de (14±0.10 mm) par la méthode des disques. La zone d'inhibition par la méthode de puits est relativement remarquable (Tableau 07).

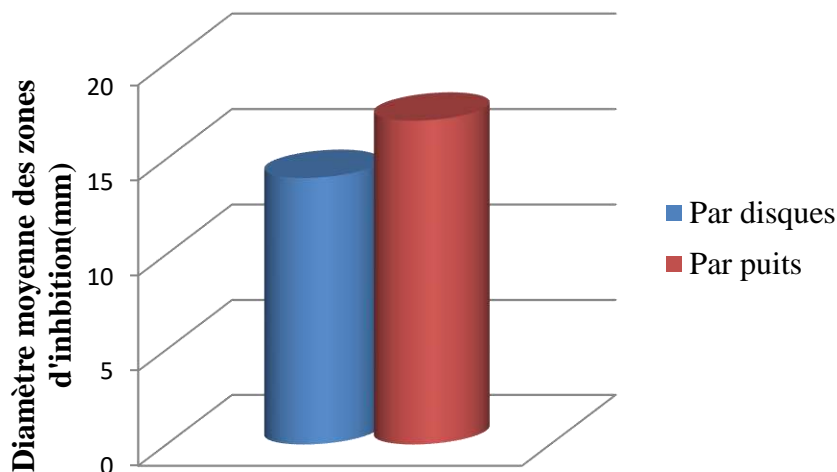


Figure 10 :L'effet inhibiteur de l'extrait de *S. plantensis* contre *B. subtilis*.

IV.2.1.2. Activité antibactérienne des extraits sur *Listeria monocytogenes*

L'extrait de la spiruline a un effet inhibiteur vis-à-vis *L. monocytogenes*. Il se traduit par une zone d'inhibition de (18 ±0.25mm) par la méthode des disques et de (15±0.1mm) par la méthode des puits (Tableau 07).

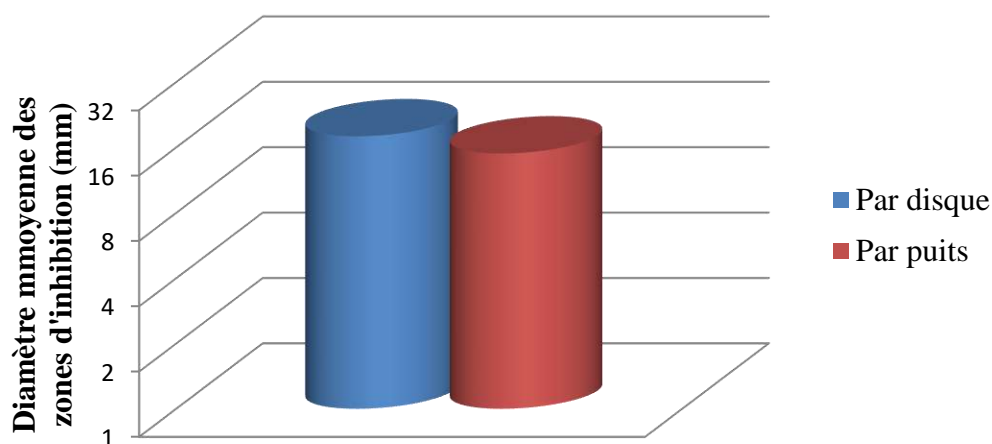


Figure11 :L'effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre *L. monocytogenes*.

IV.2.1.3. Activité antibactérienne des extraits sur *Micrococcus luteus*

L'extrait méthanolique de la micro-algue *S. platensis* montre une sensibilité de (12 mm) à (13 mm) contre *M. luteus* respectivement par puits et par disques mais les zones d'inhibitions dans cette dernière sont moins remarquables (Tableau 07).

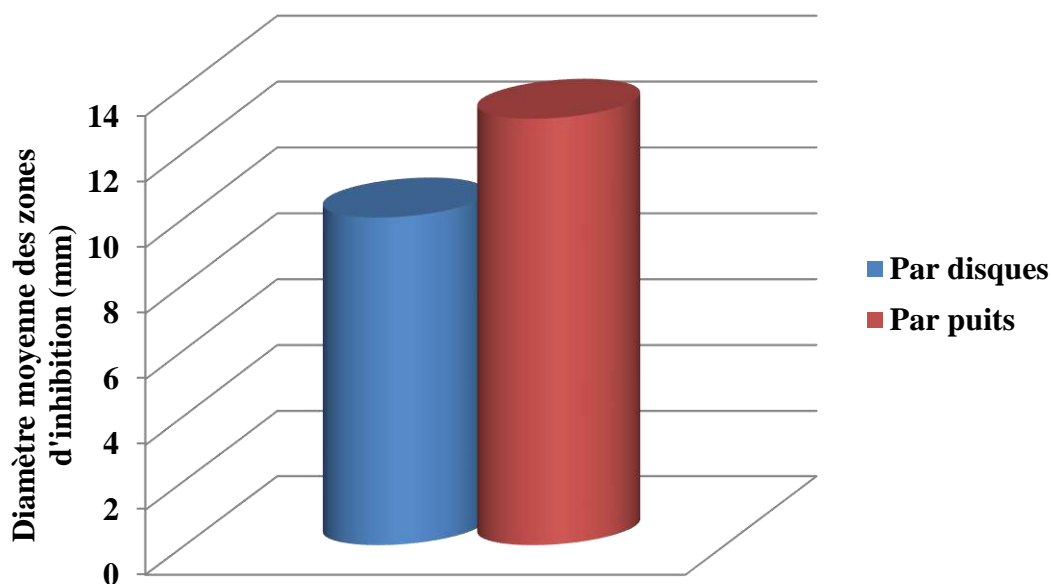


Figure 12 :L'effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre de *M. luteus*.

IV.2.1.4. Activité antibactérienne de l'extrait sur *Pseudomonas Aeruginosa*

L'extrait de la spiruline n'a pas d'effet inhibitrice vis-à-vis *P. Aeruginosa* (Tableau 07).

IV.2.2. Activité antifongique

Les résultats de l'activité antifongique des souches testés sont regroupés dans le tableau 06 :

Tableau 06 : Résultats de l'effet de l'extrait de la spiruline sur les souches fongiques étudiées.

Souches	Diffusion sur disques	Diffusion sur puits
<i>A. carbonarius</i>	10±0.20 mm	12±0.26 mm
<i>F. culmorum</i>	11±0.35 mm	14±0.50 mm

Les résultats obtenus montrent une moyenne activité antifongique de l'extrait de *S.platensis* contre les deux souches testées. Cette activité apparue par des zones d'inhibition de diamètre entre 10 et 14 mm marqués respectivement contre *A. Carbonarius* et *F. culmorum*. Par les deux méthodes de diffusion, la souche la plus sensible est *F. culmorum*.

IV.2.2.1. Activité antifongique de l'extrait sur *Fusarium culmorum*

Le champignon *F.culmorum* est sensible à l'extrait d'algue bleu-vert ; La zone d'inhibition observée est de (11 ±0.35 mm) par la diffusion sur disque et de (14±0.5 mm) par la diffusion sur puits (**Tableau 07**).

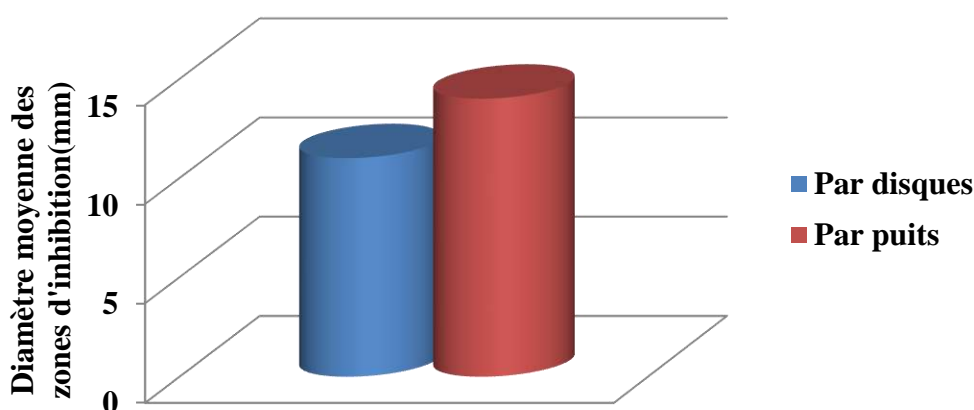


Figure 15: Effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre *F.culmorum* .

IV.2.2.2. Activité antifongique de l'extrait sur *Aspergillus carbonarius*

L'effet antifongique de l'extrait de *la spiruline* a été remarqué vis-à-vis *A.Carbonarius* avec un diamètre d'inhibition de (12±0.5 mm) par la méthode de diffusion sur puits et de (10±0.20 mm) par la méthode des disques (**Tableau 07**).

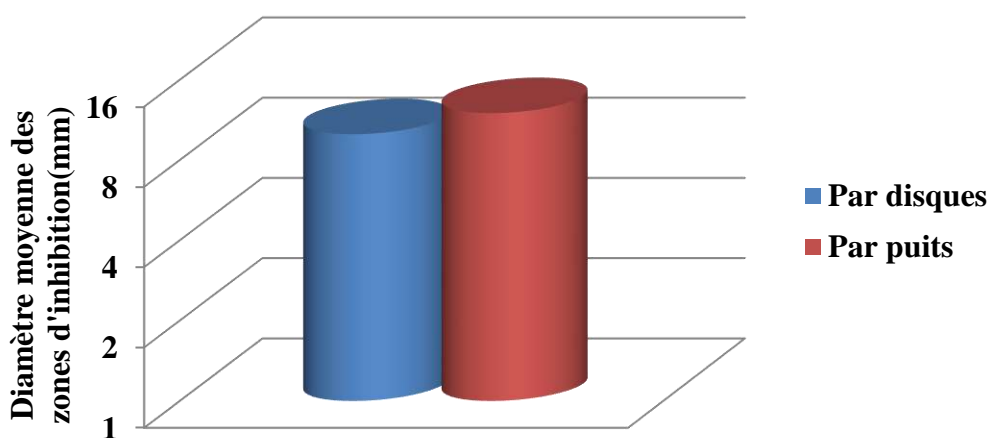


Figure 15: Effet inhibiteur de l'extrait de la spiruline contre d'*A. Carbonarius*.

	Méthode de diffusion sur puits	Méthode de diffusion sur disques
<i>B. subtilis</i>		
<i>L. monocytogenes</i>		
<i>M. luteus</i> Photo 04		
<i>P. Aeruginosa</i>		
<i>F.culmorum</i>		
<i>A. Carbonarius</i>		

Tableau 07 : L'effet de l'extrait de *S. plantensis* sur différents microorganismes.

IV.3. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait de la spiruline (Extrait brut méthanolique) sur quatre souches bactériennes: *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* et *P. aeruginosa* et deux Champignons (*A. carbonarius* et *F. culmorum*) qui sont responsables de plusieurs infections chez l'Homme et les animaux.

Cette étude nous a permis de prouver l'efficacité de l'extraction par la macération hydroalcoolique avec un bon rendement de plus de 30%. Cela est due à :

La méthode d'extraction (macération), l'origine de la spiruline et la composition chimique des extraits préparés jouent un rôle important dans la détermination du rendement (**Etahiri, 2015**).

La combinaison méthanol-eau dans les proportions 70:30 en volume donne le meilleur rendement d'une macération et que cette même combinaison a donné la teneur la plus élevée en composés phénoliques des micro-algues par rapport à d'autres solvants dont l'éthanol-eau, acétone-eau et eau distillée (**Mohammedi et Atik, 2011**).

D'après **Moreda, (2007)**, si le diamètre critique d'inhibition est supérieur à 18 mm, la souche bactérienne est dite sensible. Si le diamètre est compris entre 10 et 18 mm la bactérie possède une sensibilité intermédiaire. Par contre, si le diamètre critique d'inhibition est inférieur à 10 mm, la souche bactérienne est considérée résistante (**Moreda, 2007**).

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'extrait de la spiruline contre *B. subtilis* sont élevés par rapport aux autres travaux, tel que celui de **Shalini et al., (2012)** avec une zone de (10±0.17mm) par la méthode des puits et ceux de **Jannaatul (2015)** avec une zone de (0.7±0.1mm) par la même méthode. Par contre, notre résultat est faible par rapport à celui de **Ali et al., (2017)** qui ont marqué une zone de (23± 0.24 mm) par diffusion sur disques (**Shalini et al., 2012 ;Jannaatul ,2015 ;Ali et al., 2017**).

Les résultats obtenus contre *L. monocytogenes* s'accordent approximativement avec ceux obtenus par **Francesco et al., (2020)** et **Shalini et al., (2012)** dont ils montrent une forte inhibition entre 15 mm et 19 mm par la méthode des puits (**Francesco et al., 2020 , Shalini et al., 2012**).

Plusieurs travaux antérieurs ont montré un effet inhibiteur moyen de la spiruline contre *M. luteus* comparable à nos résultats comme les recherches de **Challof, R et al., (2011) et al.,**

(2011) et **Trabelsi**, (2009) avec 7 jusqu'à 15 mm de diamètre (**Challof, R et al., 2011 ; Trabelsi, 2009**).

L'absence d'inhibition observée chez *P. Aeruginosa* est signalée avant par **Velichkova et al. (2018)** . Ils ont rapporté que l'extrait méthanolique de la spiruline n'a pas d'activité inhibitrice vis-à-vis *P. Aeruginosa* (**Velichkova et al., 2018**).

Concernant l'activité antifongique de la spiruline vis-à-vis *F. culmorum*, elle a été rapportée par **Ben halima et al., (2019)**. Ces auteurs ont rapporté que l'extrait méthanolique de la spiruline exerce une inhibition moyenne contre le champignon *F. culmorum* de (10±0.75mm). Ces valeurs sont moins élevées par rapport à les nôtres (**Ben halima et al., 2019**).

Les résultats obtenus contre *A. carbonarius* sont compatibles avec l'étude de **Velichkova et al., (2018)** qui ont montré une activité moyenne entre 10 mm et 13 mm (**Velichkova et al., 2018**).

En effet, sur les quatre souches étudiées, l'activité antibactérienne n'est observée que sur les bactéries Gram positives alors qu'elle est totalement absente chez la bactérie *P. aeruginosa* qui est Gram négative.

L'extrait hydroalcoolique de la spiruline peuvent exerce des activités différentes : inhibitrice pour les champignons (*A. carbonarius* et *F. culmorum*) et les bactéries Gram positives (*B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*) et inactive pour la bactérie Gram négative (*P. aeruginosa*).

La sensibilité des bactéries à Gram positif due à l'action sélective des métabolites secrétés par la spiruline en fonction de la nature membranaire de la bactérie cible .Il a été signalé dans plusieurs études que les bactéries Gram positif semblent plus sensibles que les bactéries Gram négatives (**Jannaatul ,2015**).

L'absence d'inhibition observée chez *P. Aeruginosa* est peuvent être due au choix du solvant selon **Zheng et al., (2001) ; Hellio et al., (2004) et Manilal et al., (2009)**. Les méthodes expérimentales et le type de solvant utilisé constituant des facteur très importants pour déterminer la bioactivité des micro-algues (**Zheng et al., 2001 ; Hellio et al., 2004 ; Manilal et al., 2009**).

Enfin l'extrait méthanolique de la spiruline a montré une activité antimicrobienne. **Cox et al., 2010** et **Srivastava et al., 2010** ont rapporté que l'extrait

méthanolique des cyanobactéries contient des composés phénoliques, des alcaloïdes et des acides aminés qui sont responsables de l'activité antimicrobienne (**Cox *et al.*, 2010** et **Srivastava *et al.*, 2010**).

En plus, il est rapporté que l'activité antimicrobienne des algues peut être influencée par l'habitat, le stade de croissance et la saison de la collecte des algues (**Zheng *et al.*, 2001**; **Farid *et al.*, 2007**).

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

La spiruline (*S. platensis*) est parmi les algues qui peuvent être introduites en alimentation humaine et animale grâce à leurs propriétés thérapeutiques et sa valeur nutritionnelle.

L'étude des propriétés antibactériennes et antifongiques de l'extrait de la spiruline nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

L'extrait de la spiruline s'est avéré efficace contre les Bactéries Gram positives : *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*. Par contre, elle n'a pas d'effet contre la Bactérie Gram négative: *P. aeruginosa*.

Notre étude confirme qu'en plus que son effet nutritionnel, la supplémentation alimentaire en spiruline peut-être recommandée comme traitement anti-microbien en vue son inhibition de l'activité bactérienne et anti fongique. Cela peut être attribué à leur richesse en composés biologiquement actifs.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidences.

Alors, et comme perspectives, nous envisageons entreprendre les différentes activités de recherche suivantes :

- Optimiser la culture de la spiruline tout en réduisant les moyens nécessaires (réactifs,...) et le coût.
- Etudier l'effet antagoniste de la spiruline par rapport une large gamme de micro-organismes (Bactéries multi-résistantes, champignons, parasites).
- Etudier l'effet synergique de substances bioactives de la spiruline contre les micro-organismes.
- Identification de différentes substances bioactives de la spiruline.



RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- **Abi-ayad. M., (2009).** Contribution à l'étude physico-chimique de l'huile essentielle du Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) de la région de Tlemcen & de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister ; Université Abou-Bakr Belkaïd, Tlemcen. p50-55.
- **Aboun. A., Ammari. H., Belazouz. T., Benslimani. A., Rahal. K., Tali M.H., (2008).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale. Selon les recommandations de l'OMS. Ministère de l'Agriculture et du développement rural, Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. 4^{ème} Ed., Algérie, p 98.
- **Ahounou, M. (2018).** La spiruline : Un complément alimentaire en conseil à l'officine. Enquête d'utilisation. Sciences pharmaceutiques 2018.
- **Ali, I. H., & Doumandji, A. (2017).** Comparative phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activities of the cyanobacterium *Spirulina platensis* and the green alga *Chlorella pyrenoidosa*: potential application of bioactive components as an alternative to infectious diseases. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie*, (39), 41-49.
- **Allen, U., Embree, J., Langley, J., Moore, D., Pেকেles, G., Samson, L. E., Harsany R., Mac, D. N., Halperin, S., Naus, M., Pickering, L. (2006).** Les produits antimicrobiens à domicile : Le problème de l'antibiorésistance. *Paediatr Child Health*. 11(3) :177-182.
- **Andreani, C. G. (2012).** Algues et Cyanobactéries, Cours Dumenat PhytoAromathérapie, Faculté de Médecine Paris XIII, p 8, 9.
- **Antenna Technologie.** La culture de spiruline en images.
- **Avino, P., Carconi, P. L., Lepore, L., Moauro, A (2000).** Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2000; 244 (1): p. 247-252 .
- **Balloni, W., Tomaselli, L., Giovannetti L., et MARGHERI, M. C. (2008).** Biologia fondamentale de gener *Spirulina*. In: Materassi R (ed) Prospettive della Coltura Massiva di *Spirulina* in Italia. CNR Rome, pp.
- **Barth et Leo. (2019).** Le Guide Complet de la Spiruline, Article scientifique, <https://naturalathleteclub.com/blog/savoir-spiruline-bienfaits,3,5,12,21p>.

Références Bibliographiques

- **Belay.** (2007). Spirulina (*Arthrospira*): production and quality assurance in Spirulina in Gershuin ME et Belay A. *Human Nutrition and Health*. Taylor et francis.
- **Ben Halima, N. Ben Slima, A., Moalla, I., Fetoui, H., Pichon, C., Gdoura, R., Abdelkafi, S.** (2014). Protective effects of oat oil on deltamethrin-induced reprotoxicity in male mice. *Food Funct.* **2014**, 5, 2070–2077. [[CrossRef](#)]
- Biologia fondamentale del genere Spirulina. In: Materassi R (ed) Prospettive della Coltura Massiva di Spirulina in Italia. CNR Rome, pp 49–85.
- **Boutalbi, S.** (2014). Criblage chimique et l'activité biologique de spiruline (*Arthrospira platensis*).Thème Soutenu publiquement Le : 08/06/2014, UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.
- **Browitzka, M., Borowitzka, L. J.** (1988). Micro-algal biotechnology. Cambridge University press, Cambridge, pp85-121.
- **Bruneton, J.** (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 2ème Ed. Lavoisier. Paris, 274-285.
- **Bujard, E., Braco, U., Mauron, J., Mottu F., Nabholz, A., Wuhrmann, J. J. et Clement, G.** (1970). Composition and nutritive value of blue-green algae (spirulina) and their possible use in food formulations. 3rd International Congress of Food Science & Technology. Washington.
- **Callara.** (2008). les algues –les micro-algues.
- **Castenholz.** (2001). Form-genus I. *Arthrospira Stizenberger 1852*. D. R. Boone & R.W. Castenholz, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York, USA: Springer; 2001. **1**. p. 542-543.
- **Challof, R.** (2011) .Evaluation de la cytotoxine et des activités biologique dans les polysaccharides extracellulaire libérés par la cyanobactérie *Arthrospira platensis* et *Oscillatoria sp.* *J. Appl Microbiol.* 2007 ,1(1) :127-129.
- **Charlemagne, D.,** (2008). La spiruline :Aliment santé .Mémoire, DIU Alimentation Santé et Micronutrition de la faculté de pharmacie de Dijon. Année 2007/2008.
- **Charpy, L.** (2008). Colloque International « la Spiruline et le développement », formation et transfert de thechnologie, en matière de culture de Spiruline: 28 - 29 et 30 avril 2008. Toliara -Sud- Ouest Madagascar: 8, 9, 89, 91, 131-134.

Références Bibliographiques

- **Ciferi. (1983).** Spirulina, the Edible Microorganism. Microbial. Rev. Vol. 47:551-578.
- **Clement, G. (1975).** Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina maxima et platensis*. Ann. Nutr. Aliment. 29(6), pages 477-487.
- **Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J.E., Warmington, J. R., Wyllie, (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) journal of applied Microbiologie 88(1):170-175.
- **Cruchot, H., (2008).** La Spiruline, Bilan et Perspective. Thèse docteur en pharmacie. université de France-Comite. Cruchot Hélène, (2008) la spiruline bilan et perspectives; facute de medecine et de pharmacie de besancon. P 5, 9,18, 23,69, 180,183. Darcas C. 2000. La spiruline, une algue pour la santé.
- **Danesi, E. D., Rangel, Y., Carvalho et Sato., (2004).** Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass and Bioenergy: 329-335 dans les mares natronées du Kanem (Tchad). Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Hydrobiol., vol 2, 119-125.
- **Debois, E.G. (2007).** Mise au point d'une méthode de lyse cellulaire et évaluation d'un test de terrain pour la mesure des microcystines libérées par les cyanobactéries dans les eaux de surface. Centre d'expertise eu analyse environnementale. Québec. p. 1-17.
- **Doumandji, S., Boutekrabt, L., Saidi, N. A., Hamerouch, D., et Haouari, S, 2011.** Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal. Revue « Nature & Technologie ». n° 06/Janvier 2012. Pages 40 à 50.
- **Elshouny1, El-Sheekh1, M., Shawky., Maha, A., Hanaa, M. (2017).** Antimicrobial Activity Of *Spirulina Platensis* Against Aquatic Bacterial Isolates.
- **Etahiri, S. (2015).** Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte. J. Appl. Biosci. (24). 1543 – 1552
- **EUCAST, 2010.** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST, (2010).M100-S9, (19). 44-67p.
- **Falquet J.(1999).** Un module d'apprentissage pour la production de la spiruline. *Antenna Techn., Genève, 16 p.*

Références Bibliographiques

- **Faquet et Hunri. (2006).** Spiruline Aspects Nutritionnels, Antenna Technologies Novembre 2006.
- **Farid Y., Chennaoui M., Assobhei O., Etahiri S., (2012).** Screening des algues marines d'Oualidia à la recherche d'activités antimicrobienne et anti-inflammatoire. Microbiol. md. San et Environn, **6** (2). 192-209.
- **Fox, R. D, (1996).** Spirulina: techniques pratiques et promesse. Traduction de Hubert Latham. (Edisud, Aix-en-Provence). pp.246.240.
- **Francesco, M., Martina, c., Camilla, L., Eransmo, N. (2020).** Edible Seaweeds and Spirulina extract for food application :In vitro and in situ evaluation of antimicrobial activities towards foodborne.
- **Girardin, Andréani. (2011).** Girardin C et Schwitzgebel V. Diabète de type 2 en pédiatrie : diagnostic et Goksan T, A et Zekruyaoulu, Ü. 2007. The Growth of *Spirulina platensis* in Different Culture Systems Under Greenhouse Condition. *Turk J Biol:* 47-52.
- **Goulamabasse, T . (2018).** « la spiruline : Activité thérapeutique et son intérêt dans la lutte contre la malnutrition à Madagascar ». Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie 20/06/2018.
- **Halland, (2006).** Energy-green-algae for carbon capture and biodiesel isis.
- **Hayashi, K., Hayashi, T., et Morita, N. (1993).** An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex type 1 penetration into HeLa cells. *Phytotherapy Research*, **7**, 76-80.
- **Hellal, (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus: Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister." Biochimie appliquée et Biotechnologies". Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, p. 16-17.
- **Henrikson, (1994) .** Microalgue Spiruline , superalimento del futuro , Ronore Enterprises. 2^a éd. Ediciones Urano, Barcelone, Espagne. p. 222.
- <http://www.antennafrance.org/95931.html>, page consultée le 15 octobre 2008.
- **Hug, Et Von Der Wied. (2011).** La spiruline dans la lutte contre la malnutrition,Bilan et perspectives. Antenna Technologies, Genève, p 30.
- **Iltis, (1968).**Tolérance de salinité de *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl., (Cyanophyta).

Références Bibliographiques

- **Jannaatul, (2015)**. Adissertation submitted to brac university in partial fulfilment of the requirement for the degree of bachelor of science in biotechnology.
- **Jean Paul, (2011)**. Pyrénées Orientales. Collectif, Dominique Auzias. Page 233.
- **Jordan.,(1999)**. Cultivez votre spiruline : manuel de culture artisanal. Publication Antenna Technologies.
- **Jourdan, J. (2014)**. Manuel de culture artisanale de la spiruline. 2014. Disponible sur <https://www.fichier-pdf.fr/2015/09/18/manuel-de-la-culture-artisanale-despiruline/manuel-de-la-culture-artisanale-de-spiruline.pdf> (dernière consultation janvier 2018).
- **Jourdan, (1999)**. Cultivez votre spiruline revue antenna technology, 125 pages. Jourdan J. *Manuel de culture artisanale de la spiruline*. 2014. Disponible sur <https://www.fichier-pdf.fr/2015/09/18/manuel-de-la-culture-artisanale-despiruline/manuel-de-la-culture-artisanale-de-spiruline.pdf> (dernière consultation janvier 2018).
- **Kaushik, p., Chauhan, a. (2008)**. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian J Microbiol*, 48, 348-352.
- **Kim, M., Kim., WY. (2005)**. The change of lipid metabolism and immune function caused by antioxidant material in the hypercholesterolemic elderly women in Korea. *Korean J. Nutr.*, 38: 67–75.
- **Korver, D. R., et Klasing, K. C. (1997)**. Dietary Fish Oil Alters Specific and Inflammatory Immune Responses in Chicks *J. Nutr.* 127 :2039-2046.
- **Kozlenko, R. D. (1996)**. Les dernières recherches scientifiques sur la spiruline : Effets sur le virus du SIDA, le cancer et le système immunitaire. *Spirulina Health Library*, 8 p.
- **LAVANYA, R., VEERAPPAN, V. (2011)**. Antibacterial potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of southeast coast of India. *Advances in Biological Research*, 5(1), 38-44.
- **Manet. (2016)**. La spiruline: indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine. Thèse d'exercice. Université Grenoble Alpes, 2016.
- **Mary, (2003)**. Mécanismes moléculaires au stress environnementaux chez la cyanobactérie marine *Prochlorococcus*. Thèse, Université de Rennes I. p. 1-151.

Références Bibliographiques

- **MOHAMED, Z and ATIK, F. (2011).** Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle et *Lavandula stoechas* L. revus « nature et technologie ». 2011 : p.35.
- **Moreda, R. (2007).** Edition janvier du comité de la société française de la microbiologie.
- **Neelam, Shalini, G. et Singh, D.P.(2012)** .Antioxydant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil fermented juice flavonoids journal of Ethnopharmacology 66 :11-17.
- **Noaman,; Kumar et Al-Wathnani. (2012).** Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. Microbiol Res, 156, 359- 402.
- **Panigua., Michel, J., Dujardin, E., Sironval, C., Panigua, M., Dujardin, E., Sironval C. (2007).** Histoire de spiruline, communication botanique (en ligne). c 2007.[consulté le : 24/01/2007]. Disponible sur :Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D and Juárezoropeza MA. 1997. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sci*: 211-9.
- **Parikh, P., Mani, U., Iyer, U. (2001).** Role of *Spirulina* in the Control of Glycemia and Lipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Med Food*, 4(4): 193-199.
- **Pibiri, (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de lausanne. 161p.
- **Pierlovisi, (2007).** L'Homme et la Spiruline: Un avenir commun Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques. Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris (162) Prise en charge''. *Rev Med Suisse.*, 3: 1001 - 1006.
- **Razafindrajaona, J.M., Rokotozandriny, J.N., Rakotozandrindrainy, R, Antsivasoa Tsivingaina, Kotonirina, Ramapiherika, Randria, J. N (2008).** Influence de l'incorporation dans les provendes de la Spiruline de Madagascar (*Spirulina platensis* var. *toliara*) sur la croissance des poulets de chair. Colloque International sur la Spiruline, Toliara, 28, 29 et 30 avril 2008.
- **Sall, M., Souccar T., Periault, A., Trembalais, P., Elvir, N., Molean, V. (1999).** La nutrition. Edi Axis Media [www. Lanutrition.fr/ alimentsindex. Php](http://www.Lanutrition.fr/).

Références Bibliographiques

- **Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B.A., Belay, A. et Wilmotte, A. (1999).** Arthrospira (Spirulina) strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *Fems Microbiology Letters*. Vol. 172: 213-222.
- **Sguera, S. (2008).** *Spirulina platensis* et ses constituants nutritionnelle et activites therapeutique. thèse docteur en pharmacie 12/12/2008.
- **Shalini, G., Neelam, A., D. P., Slingh. (2012).** Antimicrobien et antioxydant propriété de communémenttrouvé microalgues *Spirulina platensis Nostoc Muscorumet Chlorella pyrenoidosa* contre certaines bacterieset champignons pathogénique.
- **Sivakumar J and Santhanam P.,(2011).**Antipathogenic activity of Spirulina powder. *Recent Research in science and Technology*. 3(4): 158-161
- **Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambet, A. (2006).** Applications commerciales des microalgues. *J Biosci Bioeng* 101(2):87-96.
- **Srivastava, N., Saurav, K., Mohanasrinivasan, V., Kannabiran, K. and Singh,M. (2010).**Antibacterial potential ofmacroalgae collected from the Madappam coast, India. *British J. Pharm. & Toxicol.*, 1(2): 72-76.92 K.
- **Stanier, RY., VANNIEL, CB. (1974).** Le concept de bactérie. *Arche Mikrobiol.* 1962 ; 42 :17-35.
- **Statistique Cubia. (2000).** Projet de développement de la production de spirulines.
- **Sultana, M. (2009).**Algalculture in different inexpensive culture media,MSThesis Departement of Fisheries Management Faculty of Fisheries Bangladesh Agriculture University ,Mymensingh Bangladesh.pp30-31.
- **Tan, L. T. (2007).** Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochem*, 68, 954–979.
- **Trabelsi, L. (2009).** Activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie filamenteuse Arthrospira platensis, *Phytothérapie*, Octobre 2010.
- **Tredici, M., Papuzzo, T., Tomaselli, L. (1986).**Outdoor mass culture of Spirulina maximain seawater *App. Microbiol. and Biotechnol*, pp 47-50.
- **Ulrich, N., Ferran, G. et Gerard, M. (2000).** The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description

Références Bibliographiques

of *Halospirulina tapeticola* gen. nov. sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 50 : 1265–1277.

- **Vardar-Unlu, G., Canadan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E and Tep, B. (2003).** Antimicrobial antioxydant activities of the essential oil and methanol extract of *thymus pectinarius* Fisch et Mey. Var. *pectinarius* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 : 63-67.
- **Velichkova¹, Ivaylo Sirakov¹, Nikolina Rusenova, Georgi Beev, Stefan Denev, Nedyalka Valcheva, Toncho Dinev (2018).** *In vitro* antimicrobial activity on *lemna minuta*, *chlorella vulgaris* and *spirulina* sp. extracts
- **Vidalo, (2015).** Spiruline : L'algue bleue de santé et de prévention.
- **Watanuki. (2006).** Effets immunostimulants de *Spirulina platensis* alimentaire sur la carpe, *Cyprinus carpio*.
- **Wu Bo-Tang, Xiang W., Zeng, C. K. (1998)** .*Spirulina* cultivable in China.
- **Zheng Y., Chen Y.S., Lu H.S., (2001).** Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **19** (4). 327-33.
- **Zighmi, S. (2017).** Production de biodiésel et optimisation des paramètres des procédés de culture des microorganismes. Le 6 juillet 2017 (thèse doctorat).

The image shows a rectangular area with rounded corners, filled with a marbled paper pattern. The pattern consists of irregular, light-colored shapes (possibly representing stone or marble) set against a darker, greyish background. The word "ANNEXE" is printed in the center of this area in a bold, black, serif font.

ANNEXE

Répartition géographique de la spiruline à l'état naturel actuel et passé



Carte extraite du livre : *Les incroyables vertus de la spiruline*,
Géraldine Laval Legrain & Benoit Legrain

Annexe 01 : Distribution géographique de la spiruline (Castenholz, 2001).

Acides aminés	Jacquet 1974	Clément 1975b	Fox 1999	Borowitzka
Acides aminés essentiels (%)	Jacquet 1974	Clément 1975b	Fox 1999	Borowitzka
Isoleucine	5.60	6.40	5.98	5.70
leucine	8.00	9.00	8.71	8.70
Lysine	4.20	4.50	5.25	5.10
Méthionine	2.25	2.60	2.85	2.60
Phénylalanine	4.40	4.60	5.09	5.00
Thréonine	4.70	5.50	5.58	5.40
Tryptophane	1.00	1.60	1.48	1.60
Valine	5.70	6.90	7.72	7.50
Acides aminés nonessentiels(%)	Jacquet 1974	Clément 1975b	Fox 1999	Borowitzka
Alanine	7.25	7.90	8.24	7.90
Arginine	6.60	6.70	7.92	7.60
Acide aspartique	9.30	9.20	9.50	9.10
Cystéine	0.95	0.90	0.93	0.90
Acide glutamique	NC	12.90	13.2	12.70
Glycine	4.80	5.00	5.07	4.80
Histidine	1.60	1.60	1.50	1.50
Proline	3.60	1.90	4.32	4.10
Sérine	5.00	5.60	5.46	5.30
tyrosine	4.30	4.90	NC	4.60

NC :

Annexe 02 : Pourcentage moyen des acides aminés de la spiruline selon différentes auteurs (Browitzka, 1988).

Eléments	Concentration en mg /l
Bicarbonate	2800
Phosphate	614
Sulfate	25
Chlore	350
Sodium	3030
Potassium	4380
Magnésium	642
Calcium	10
Ammonium	5
Ammoniac	5
Fer	1

Annexe 03 : Tableau d'Analyse d'un milieu de culture typique (Fox, 1999).

❖ **Formule Bouillon nutritif**

Pour 1 litre de milieu :

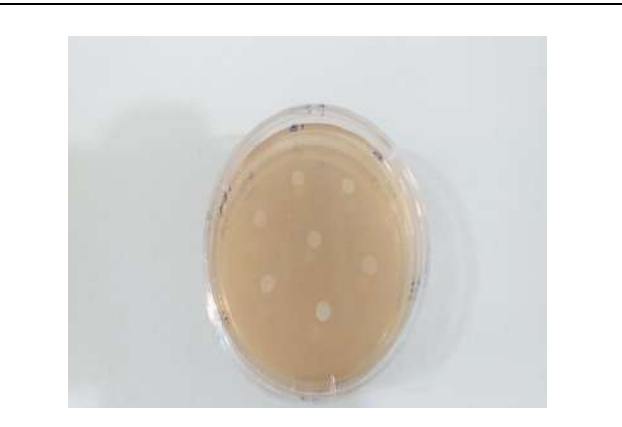
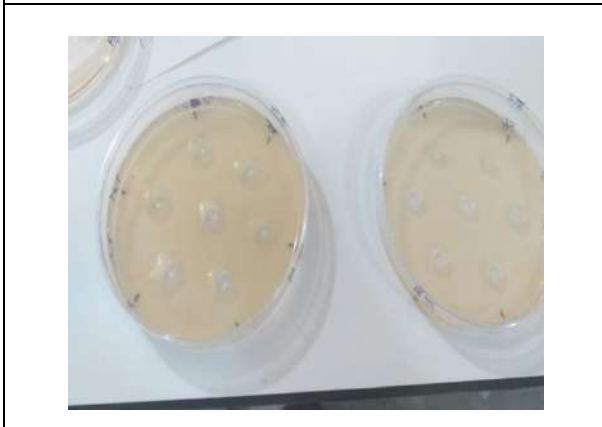
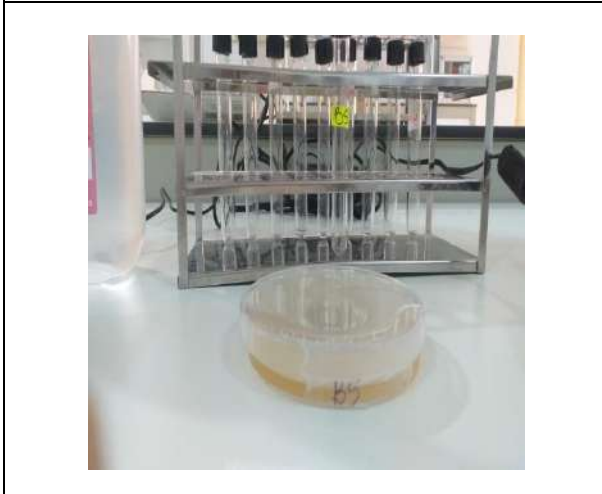
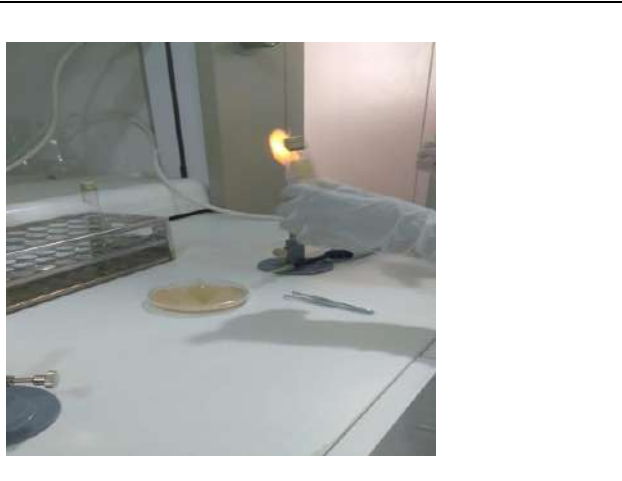
- Peptones 10,0 g
- Hydrolysate de caséine 5,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g

❖ **Formule Gélose Mueller-Hinton**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée
ou déminéralisée:

- Peptones 3,0 g
- Hydrolysate de caséine 17,5
- Agar 15 g
- Ca⁺² 20 - 25 mg/L
- Mg⁺² 10 - 12,5 mg/L
- pH final 7,4 ± 0,2

Annexe 04 :Composition des milieux de culture utilisés.



Annexe 05 : Photos des manipulations au laboratoire.

Recherche de l'activité antimicrobienne de la spiruline

Résumé :

Les cyanobactéries en général, synthétisent et secrètent dans leur milieu de culture des substances diverses a activité antibiotique. Afin de prédominer dans leurs écosystèmes, comme chez l'espèce *Arthrospira platensis*.

Notre travail vise la mise en évidence de l'activité antimicrobienne (par la méthode de diffusion sur puits et sur disques) de l'extrait méthanolique de la cyanobactérie *A. platensis*, a savoir, l'activité antibactérienne sur les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) et les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* et *Micrococcus luteus*).

L'activité antifongique est mesurée sur les champignons *Aspergillus carbonarius* et *Fusarium culmorum*.

Les résultats obtenues montrent que les champignons et les souches bactériennes Gram positif étudiées ont une sensibilité intermédiaire (10 à 18 mm) vis-à-vis l'extrait bruts de la spiruline, par contre que cet extrait n'a pas d'activité inhibitrice vis-à-vis la bactérie Gram négatif : *P. Aeruginosa*.

Enfin, notre extrait a montré un effet antimicrobien de la spiruline comparable aux travaux publiés dans la littérature.

Mots clés : *Arthrospira platensis*, substances diverses, méthode de diffusion sur puits et sur disques ,

Research of antimicrobial activity of spirulina

Abstract :

Cyanobacteria in general synthesize and secrete various substances with antibiotic activity in their culture medium. In order to predominate in their ecosystems, as in the species *Arthrospira platensis*.

Our work aims to demonstrate the antimicrobial activity (by the diffusion method on wells and on disks) of the methanolic extract of the cyanobacteria *A. platensis*, namely, the antibacterial activity on Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* and *Micrococcus luteus*).

The antifungal activity is measured on the fungi *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium culmorum*.

The results obtained show that the fungi and the Gram positive bacterial strains studied have an intermediate sensitivity (10 to 18 mm) towards the crude extract of spirulina, on the other hand that this extract has no inhibitory activity. with respect to the Gram-negative bacteria: *P. Aeruginosa*.

Finally, our extract showed an antimicrobial effect of spirulina comparable to work published in the literature.

Key words: *Arthrospira platensis*, various substances, well and disc diffusion method, antibacterial activity, antifungal activity.

بحث حول نشاط السبيرولينا لمضاد للجراثيم

المخلص

تقوم البكتيريا الزرقاء بشكل يافراز مواد مختلفة ذات نشاط مضاد حيوي في وسط عيشها من أجل ضمان الاستمرارية في أنظمتها البيئية ، كما هو الحال في *Arthrospira platensis*.

يهدف عملنا إلى إظهار النشاط المضاد للميكروبات (من خلال طريقة الانتشار على الثقوب وعلى الأقراص) للمستخلص الميثانولي للبكتيريا الزرقاء *A. platensis* ، من خلال النشاط المضاد للبكتيريا على البكتيريا سالبة الجرام (*Pseudomonas aeruginosa*) والبكتيريا موجبة الجرام (*Bacillus subtilis* و *Listeria monocytogenes* و *Micrococcus luteus*)، كما تم قياس النشاط المضاد للفطريات على فطر *Aspergillus carbonarius* و *Fusarium culmorum*.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن الفطريات والسلالات البكتيرية موجبة الجرام المدروسة لها حساسية متوسطة (10 إلى 18 مم) تجاه المستخلص الخام من سبيرولينا ، كما أظهرت من ناحية أخرى أن هذا المستخلص ليس له أي نشاط مثبط فيما يتعلق بالبكتيريا سالبة الجرام :

Pseudomonas aeruginosa أظهر مستخلصنا تأثيراً مضاداً للميكروبات للسبيرولينا مماثل لما أظهرته الدراسات السابقة.

الكلمات المفتاحية: *Arthrospira platensis* ، مواد مختلفة ، طريقة انتشار البئر والقرص ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للفطريات.