

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologiques
Option : Bioprocédés et Technologie Alimentaire



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Impact d'enrichissement de la margarine par
l'extrait de Spiruline sur ses propriétés
physico-chimiques et sa stabilité oxydative**

Présenté par :
M^{elle} YAHIAOUI Nabila

Soutenu le : **22/06/2017**

Devant le jury composé de :

M.Kati.D	MCA	Président
M ^{elle} Brahmi F	MAA	Encadreur
M ^{elle} Achat.S	MCB	Examinatrice
M. Zeroual.B	Ingénieur	Co-encadreur

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Tout d'abord je remercie le Bon Dieu de m'avoir donné la santé, la volonté, et la patience pour la réalisation de ce modeste travail.

J'adresse en particulier mes remerciements les plus sincères à Docteur Brahmi. F, directrice de ce mémoire, pour sa confiance, sa patience, son entière disponibilité, ses conseils, ses orientations, ses encouragements incessants et de tous les efforts qu'elle a fournis pour mener à bien ce mémoire, pour la qualité de son encadrement, ses compétences scientifiques qui m'a permis d'élargir mes connaissances et m'enrichir d'avantage, pour sa gentillesse et pour son amitié.

Mes remerciements vont aux membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger mon travail.

M. Kati maître de conférences qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

M^{lle} Achat maître de conférences qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail.

M^{lle} Oudjedi chercheur à l'Université de Constantine qui a bien voulu accepté de participer.

Mes remerciements à D^r Chader qui a eu l'amabilité de me fournir l'échantillon de Spiruline ainsi que, M. Saggai. A et M. Saggai. S. Safa, Affaf, Hadja.

Je remercie M. Hedjal Samir et M. Zeroual Brahim, d'avoir bien voulu accepté de m'accueillir au sein de Laboratoire de Recherches et Développement afin de réaliser la formulation de mon échantillon, aussi mes vifs remerciements à l'ensemble du personnel de laboratoire margarinerie au niveau de Cévital, à leur tête Samia, Linda, M. Ouathmani, Ahmed, H' manou, Said, ...

Je remercie également M et M^{me} Mansouri d'avoir bien voulu me recevoir au niveau de leur laboratoire « Qualilab », ainsi que leur personnel.

J'adresse également mes remerciements pour le personnel de l'administration, le personnel de la bibliothèque, le personnel de laboratoire (BBS)

Ma grande gratitude à l'encontre de mes enseignants et amis qui m'ont encouragé et crus en moi, en particulier M^{lle} Louailache à qui je souhaite un prompt rétablissement, à M. Kati, M^{lle} Achat, M^{me} Khemtache. S, M^{lle} Bendali, M^{me} Chougui, M^{me} Djouder, M^{me} Guendouz, M^{me} Smail, M^{me} Fella, M^{me} Hassissane, M^{me} Hamri, M. Chikhoune, M. Bouderies, M^{me} Zellaq, M. Touati et bien particulièrement M^{lle} Dendoune et M^{me} Kherfellah responsables du laboratoire « Prouvolab », et bien d'autres.

Je tiens à remercier ici de tout mon cœur tous ceux qui, de près ou de loin, ont voulu contribuer à m'aider avec compréhension et bienveillance à mener à bien ce mémoire.

Nabila.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mon défunt père, ma mère, mes frères et sœurs, à ma belle-sœur, à ma petite nièce adorée « Yakout » et mes neveux « Abdelaziz et Walid », à toute ma famille, à mes amis (es) : Drifa, Soraya, Imed, Hakima, Chérif, Benjamin Kanou, Fadila, Soraya, Kahina, Katia, Salim, Nassima, Khodir, Nabila, Lamine, Sabine, Mabrouka, Salima, Karim Tedjani, K'rim Djenas, Rachida, Affaf, Toufik, Souad, Chirez, Ferroudja...à tout les camarades des trois promotions, et à tous ceux que j'aime.

Nabila.

Liste des abréviations

AH	donneur d'hydrogène
AlCl₃	trichlorure d'aluminium
Ar-OH	composés phénoliques
Ar-OH	polyphénol
BC	caroténoïdes
BSA	bis(triméthylsilyl)acétamide
CE	comité d'entreprise
DPPH	2,2-diphényl-1-picrilhydrazyl
EDTA	ethylene diamine tétra acétique
ERO	espèce réactive de l'oxygène
Fe²⁺	fer ferreux
FeCl₃	trichlorure ferrique
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
IC₅₀	concentration d'inhibition à 50%
ISO	organisation international de normalisation
meq O₂/kg	milliéquivalent d'oxygène par kilogramme
mg Eq AG /g	milligramme équivalent d'acide gallique par gramme
mg Eq Q /g	milligramme équivalent de quercitrine par gramme
mg Eq AT /g	milligramme équivalent d'acide tannique par gramme
MS	matière sèche
NA	norme algérienne
Na₂CO₃	monocarbonate de sodium
NC	nomenclature coombinée
NO·	oxyde nitrique
O₂⁻	anion superoxide
OH	groupement hydroxyle
OH·	radical hydroxyle
ROO·	Radical peroxyde
SDS	dodécylsulfate de sodium
TEA	tétraéthyl ammonium
X·	radical

Liste des figures & annexes

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<i>Synthèse bibliographique</i>		
<i>Figure 1</i>	Photographies de différentes formes de <i>Spirulina platensis</i>	5
<i>Figure 2</i>	Structures des acides phénoliques	14
<i>Figure 3</i>	Structure de base des flavonoïdes	14
<i>Figure 4</i>	Structure des principaux caroténoïdes	16
<i>Matériel & Méthodes</i>		
<i>Figure 5</i>	Photographies de serre (A) et de bassin de culture avec système d'agitation (B) et de formes séchées (C- D) et broyée (E) de <i>Spirulina plarensis</i> .	17
<i>Figure 6</i>	Mécanisme d'action de DPPH	21
<i>Résultats et discussion</i>		
<i>Figure 7</i>	Courbes représentants la variation de l'indice de peroxyde en fonction du temps (test de Shaal)	41
<i>Annexes</i>		
<i>Annexe I.1</i>	Matériel et réactifs	
<i>Annexe II.1</i>	Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux	
<i>Annexe II.2</i>	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes	
<i>Annexe II.3</i>	Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins	
<i>Annexe II.4</i>	Courbe d'étalonnage pour le dosage des caroténoïdes	
<i>Annexe III.1</i>	Courbes utilisées pour le calcul d'IC ₅₀ pour l'activité scavenger du radical DPPH [*]	
<i>Annexe III.2</i>	Courbes utilisées pour le calcul d'IC ₅₀ pour le test au phosphomolybdate	
<i>Annexe IV</i>	Indice de peroxyde des margarines élaborés et de la margarine témoin	

Liste des tableaux

<i>Tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<i>Synthèse bibliographique</i>		
<i>Tableau I</i>	Classification de la Spiruline	4
<i>Tableau II</i>	Composition chimique de <i>Spirulina platensis</i> selon la littérature	6
<i>Tableau III</i>	Principaux acides gras de la Spiruline	7
<i>Tableau IV</i>	Principaux éléments constituant la margarine	10
<i>Tableau V</i>	Mécanisme d'oxydation des lipides	12
<i>Résultats & discussion</i>		
<i>Tableau VI</i>	Rendement d'extraction et teneurs en composés phénoliques de l'extrait éthanolique de <i>Spirulina platensis</i>	30
<i>Tableau VII</i>	Teneur en caroténoïdes de <i>Spirulina platensis</i>	34
<i>Tableau VIII</i>	Résultats des analyses physico-chimiques des margarines incorporées de <i>Spirulina platensis</i>	38

Remerciements
Dédicaces
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Sommaire

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

I.1 Présentation de la micro-algue étudiée.....	3
I.1.1 Histoire de la Spiruline.....	3
I.1.2 Habitat et répartition géographique.....	3
I.1.3 Taxonomie et dénomination.....	3
I. 1.4 Morphologie et caractères généraux.....	5
I.1.5 Composition de la Spiruline.....	5
I.1.6 Effets thérapeutiques.....	7
II.1.Généralités sur la margarine.....	9
II.1.1 Définition de la margarine.....	9
II.1.2. Composition de la margarine.....	9
II.1.2.3 Fabrication de la margarine.....	10
II.2. Radicaux libres et antioxydants.....	11
II.2.1.Définition de radical libre.....	11
II.2.2.Antioxydants naturels.....	13
II.2.1.1Composés phénoliques.....	13
II.2.1.2 Caroténoïdes.....	15

Partie pratique

III. Matériel et méthodes	17
III. Caractérisation de <i>Spirulina platensis</i>	17
III .1.1. Matériel biologique.....	17
III.2.Extraction des principes actifs.....	18
III. 2 .1 .Procédés d'extraction.....	18

III.2.2. Dosage des composés phénoliques.....	18
III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux	18
III.2. 2. 2. Dosage des flavonoïdes.....	19
III.2. 2. 2. Dosage des tanins.....	19
III.2.2.3. Dosage des caroténoïdes.....	20
III.2.3. Détermination de l'activité antioxydante.....	20
III.2.3.1. Activité Scavenger du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH*).....	20
III.2.3.2. Capacité antioxydant totale (TAC).....	22
III.2.4. Formulation des margarines.....	22
III.4 .Caractérisation de la margarine élaborée.....	23
III.4 .1. Analyses et contrôle de qualité des margarines.....	23
III.4.1.1. Détermination du pH de la phase aqueuse (NE. 1. 2.430 /1989).....	23
III.4.1.2. Dosage de sel (NE. 1. 2.429/ 1989)	23
III.4.1.3. Test de point de fusion (NE 1.2.91 /89).....	24
III.4.1.4. Mesure de la teneur en eau (ISO 662).....	25
III.4.1.5. Dosage de l'indice de peroxyde (NA. 274/ 1990).....	25
III.4.1.5. Test de Schaal (test d'oxydation dans les conditions réelles).....	26
III.2. Analyse physique et spectroscopique.....	27
III.2.1. Détermination du taux de solide par RMN (teneur en corps gras solides).....	27
IV .Extraction et dosages des composés phénoliques	29
IV.1. Rendement d'extraction par macération alcoolique.....	30
IV.2. Teneurs en antioxydants.....	31
IV.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	31
IV.2.2. Teneurs en flavonoïdes.....	32
IV.2.3. Teneur en tanins.....	33
IV.2.4. Détermination de la teneur en caroténoïdes.....	33
IV.3. Détermination de l'activité antioxydante.....	34
IV .3 .1. Activité scavenger du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl	35
IV.3.2. Test au phosphomolybdate.....	37
V. Caractérisation des margarines formulées.....	38
V.1. Analyses physico-chimiques.....	38
V.2. Analyse physique et spectrophotomique.....	39
V.2.1. Test de Shaal.....	39

Conclusion.....42

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

L'oxydation des lipides représente un problème important pour certaines industries telles que l'industrie des corps gras, puisqu'elle est responsable de la baisse de qualité et de la diminution de la durée de conservation des produits alimentaires (Penchev, 2010). Malgré une relative stabilité apparente et les soins apportés pour les conserver, tous les produits alimentaires subissent des altérations. Leur manipulation (transformation, conditionnement, stockage...) éloigne les produits transformés de leur état originel. Pour maintenir l'état souhaité des aliments, certaines pratiques physiques sont utilisables (cuisson sous vide, conditionnement sous atmosphère modifiée...), mais l'emploi d'additifs rajoutés aux préparations est un moyen facile et économique pour pallier les évolutions oxydatives; principale cause de dégradation hors celles des micro-organismes (Deglène-Benbrahim, 2004).

Maîtriser l'oxydation est indispensable en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire (Marc *et al.*, 2004). Parmi ces produits alimentaires, la margarine, émulsion plastique constituée essentiellement de deux phases grasse et aqueuse, contient en outre 2% d'additifs hydro et liposolubles. Sa composition est représentée à 82% par un mélange d'huiles: première cible de l'oxydation, qui est une cause majeure de dégradation de la margarine lors de sa fabrication et de sa conservation. La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables. Ces odeurs conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (Himed et Barkat, 2013). Ainsi, l'addition des antioxydants est une solution pour protéger de tels produits de l'oxydation.

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Cependant, beaucoup d'études ont porté sur leur toxicité élevée, utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ), etc. (Penchev, 2010). Certains antioxydants fréquemment ajoutés aux margarines; tels que, le propylgallate, l'octylgallate et le gallate de dodécyle, induisent à des problèmes d'allergie (Achat, 2013). Le besoin de réduire leur utilisation impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine. L'industrie des aliments propose plusieurs antioxydants naturels comme additifs alimentaires; la préférence pour ces antioxydants pose le problème de leur efficacité, leur utilisation dans les formulations doit apporter une valeur ajoutée aux aliments sans être préjudiciable à la santé humaine (Penchev, 2010). Les antioxydants contenus dans les

Cyanobactéries, genre *Spirulina platensis* pourront être une bonne alternative (Sguera, 2008). Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à extraire et à quantifier les antioxydants (composés phénoliques et caroténoïdes) de ce micro-algue; dans l'objectif de mettre en évidence leurs propriétés. Nous allons ensuite évaluer *in vitro* l'activité antioxydante de l'extrait de *S. platensis* avec deux méthodes complémentaires.

Dans le souci de préserver la santé du consommateur contre tout risque de santé et/ou apporter une valeur ajoutée, nous avons proposé au cours de notre étude une éventuelle substitution de l'additif synthétique « α tocophérol» utilisé comme conservateur dans la fabrication de la margarine à tartiner «Fleurial 500 g» par un additif naturel «extrait de Spiruline» aux niveaux du Laboratoire de Recherche et de Développement de Cévital/ Béjaia. Dans ce contexte, nous souhaitons savoir est-ce que les margarines élaborées avec l'extrait de Spiruline seront plus résistantes vis-à-vis de l'oxydation forcée comparativement à celles qui contiennent l'antioxydant synthétique ? Afin de répondre à cette problématique, nous devons faire un suivi de la peroxydation oxydative au cours de temps des margarines formulées via le test de Shaal, afin de démontrer leur résistance à l'oxydation forcée comparativement à la margarine témoin qui contient l'antioxydant artificiel. Au préalable des tests de caractérisation des margarines enrichies de l'extrait de la Spiruline doivent être effectués.

Afin de mener à terme cette étude, une synthèse bibliographique concernant les généralités sur *Spirulina platensis*, la margarine, et les antioxydants est nécessaire. Cette revue de la littérature est suivie d'une partie expérimentale dont le matériel et les méthodes exploités vont être présentés. Une discussion des résultats obtenus est ensuite établie et nous achevons ainsi ce travail par les principales conclusions et les perspectives envisagées.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Présentation de la micro-algue étudiée

I.1 Présentation de la micro-algue étudiée

I.1.1 Histoire de la Spiruline

A leur arrivée au Mexique, les conquistadors espagnols découvrent des aliments inconnus, le plus étrange, une espèce de boue verte récoltait, séchée au soleil, elle est consommée par les riverains du lac Texoco au Mexique et du lac Tchad en Afrique depuis le XIV^{ème} siècle. Les Aztèques l'utilisaient pour préparer une sorte de gâteaux secs (Mouritsen, 2015). Ils avaient déjà compris l'intérêt de cette algue qui constituât leur principale source de protéines (Saunders, 1966).

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-Andréani, 2011).

I.1.2 Habitat et répartition géographique

Les micro-algues utilisent l'énergie solaire, le dioxyde de carbone et les minéraux dans l'eau pour se développer, et leur taux de croissance est très haut (Becker, 1994). En outre, elles peuvent produire divers produits par photosynthèse pendant leur croissance. En ce sens, la microalgue *Spirulina platensis*, se développe naturellement dans les eaux des lacs en raison d'un pH alcalin (Vonshak, 1997); dans la mer et l'eau douce d'Asie, d'Afrique, d'Europe du Sud et d'Amérique du Nord (Hwang et al., 2011).

L'algue bleue se trouve dans les déserts arides (Vidalo, 2008), prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe. La Spiruline est maintenant cultivée en U.S.A, en Inde, en Chine, en Thaïlande (Jourdan, 2016), en République Dominicaine, en Hongrie, en France, en Algérie, en Tunisie, en Ethiopie, au Pérou, au Mexique, etc. (Fox, 1999).

I.1.3 Taxonomie et dénomination

La Spiruline fait partie des micro-organismes procaryotiques, car elle n'a pas de noyau bien individualisé. A noter que cette appartenance à la classe des cyanobactéries est récente. En effet, elle est longtemps restée classée parmi les « algues bleu-vert », et ce pour plusieurs raisons:

- Son habitat aquatique ;

- La présence d'un système photosynthétique producteur d'oxygène ;
- Son aptitude à développer des biomasses importantes ;
- Sa morphologie proche de celle des algues ;
- Sa couleur liée à sa teneur en pigments bleu (phycocyanine) et vert (chlorophylle) (Fox, 1999).

A noter qu'il y a parfois malheureusement une véritable confusion entre les termes "Spiruline", "Spirulina" et "Arthrospira". Ces confusions proviennent à la fois d'erreurs de déterminations scientifiques dans les années 1950 et de la dénomination commerciale de certaines cyanobactéries alimentaires (Cruchot, 2008). Il faut retenir que le terme « Spiruline » correspond au nom commercial d'une cyanobactérie appartenant toujours au genre « *Arthrospira* ». « Spirulina » est le nom commercial anglais de la même cyanobactérie mais il désigne également un genre de cyanobactéries assez proche d'*Arthrospira*, et surtout non comestible. « *Arthrospira* » étant le nom scientifique (genre) d'un groupe de cyanobactéries auquel appartient la Spiruline alimentaire (Fox, 1999 ; Legeard, 2005).

La Spiruline, avait différents appellations dont : La Potion magique : Mentionnée par Christophe Colomb (Fox, 1999), le Dihé : Par les Kanembous, tribu du Tchad (Vidalo, 2008), le Tecuitlatl, fromage vert : Par les Aztèques (Vidalo, 2008), Arc-en-ciel à ses nombreux pigments qui lui permettent de capter la quasi-totalité du spectre solaire et d'en stocker l'énergie (Vidalo, 2008).

Le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, sont des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une bactérie dénommée *Spirulina platensis* (ou *Arthrospira platensis*) plus connue sous le nom d'algue Spiruline (Sguera, 2008). La classification de cet algue est donné dans le tableau I.

Tableau I : Classification de la Spiruline selon Fox (1999)

Règne	Monera
Sous règne ou Sous Règne Procaryotes	<i>Procaryotes</i>
Embranchement	Cyanophyta
Classe	<i>Cyanophyceae</i>
Ordre	<i>Nostocales</i>
Famille	<i>Oscillatoriacelae</i>
Genre	<i>Oscillatoria</i>
Sous genre	<i>Spirulina</i>
Espèces (Merdan, 2009)	- <i>Spirulina platensis</i> ; - <i>Spirulina geitleri</i> ou <i>maxima</i> ; - <i>Spirulina gusiformis</i> ou <i>Jeejibai</i>

I. 1.4 Morphologie et caractères généraux

La Spiruline se présente sous forme de filaments constitués de cellules juxtaposées. La reproduction de la spiruline, asexuée, se fait par division des filaments (Jourdan, 2016). Elle a une longueur moyenne de 250 μm quand elle possède 7 spires. Elle est composée de filaments mobiles (de 10 à 12 μm de diamètre) non ramifiés et enroulés en spirales d'où le nom de «Spiruline» (Geitler, 1932; Charpy *et al.*, 2008). Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis (Muhling *et al.*, 2003). Cependant, les Spirulines présentent différentes formes; telles que les formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites (Figure 1). Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat (Geitler 1932 ; Charpy *et al.*, 2008).



Figure 1 : Photographies de différentes formes de *Spirulina platensis* (Anonyme , 2016).

I.1.5 Composition de la Spiruline

L'utilisation de la Spiruline, comme un aliment fonctionnel a été suggérée depuis plusieurs décennies, étant une source protéique riche en acides aminés essentiels (Mouritsen, 2015), elle contient des acides gras polyinsaturés, qui sont rares dans les sources végétales et animales (Guillaume *et al.*, 2002), possède également une teneur exceptionnellement élevée de vitamine B12, est une bonne source de bêta-carotène, de fer, de calcium et de phosphore (Gutierrez-Salmean *et al.*, 2015), contient aussi des polysaccharides sulfatés et la phycocyanine (El-Baky, 2008; Chu, 2010); (pigment naturel bleu) qui prend une couleur verte avec la photosynthèse (Vautrin 2006 ; Oleivira *et al.*, 2009); d'où l'origine de son appellation « algue-bleu ». En outre, le système pigmentaire de la Spiruline est constitué de chlorophylle a; de pigments hydrosolubles, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et de caroténoïdes (β -carotène, cryptoxanthine) (Sakho et Crouzet, 2009). La composition chimique de *S. platensis* rapportée dans la littérature est récapitulée dans le tableau II.

Tableau II : Composition chimique de *Spirulina platensis* selon la littérature.

	a /100 g	b/100g	b /10 g	c /100 g	d %	e %
Protéines	-	60 g	-	55-70 g	-	-
--Acides aminés essentiels (mg)	1000	-	-	-	-	-
Histidine	3500	-	-	-	1,6%	-
Isoleucine	5380	-	-	-	3,5%	-
Leucine	2960	-	-	-	5,4%	-
Lysine	1170	-	-	-	2,9%	-
Méthionine	2750	-	-	-	1,4%	-
Phénylalanine	2860	-	-	-	2,8%	-
Acides aminés non essentiels (mg)						
Alanine	4590	-	-	-	4,7%	-
Arginine	4310	-	-	-	4,3%	-
Acide aspartique	5990	-	-	-	6,1%	-
Cystine	590	-	-	-	1,6%	-
Acide glutamique	9130	-	-	-	9,1%	-
Glycine	3130	-	-	-	3,2%	-
Proline	2380	-	-	-	2,7%	-
Sérine	2760	-	-	-	3,2%	-
Tyrosine	2500	-	-	-	3%	-
Glucides (g)	17.8	16 g	-	15-23 g	-	-
Fibre diététique	7.7	-	-	2-4 g	-	-
Sucres	1.3	-	-	-	-	-
Lactose	< 0.1	-	-	-	-	-
Polysaccharides	-	-	460mg	2000-4000mg	-	-
Lipides (graisse totale)	4.3	6 g	-	3-5 g	-	-
Graisse saturée	1.95	-	-	-	-	-
Graisse polyinsaturée	1.93	-	-	-	-	-
Graisse de Monounsaturated	0.26	-	-	-	-	-
Cholestérol	< 0.1	-	-	-	-	-
Acides gras	-	-	-	-	-	8%
palmitique (16:0)	-	-	-	-	29,6%	25-60%
palmitoléique(16:1) oméga-6	-	-	-	-	5%	0.5-10%
stéarique (18:0)	-	-	-	-	2,2%	0.5-2%
oléique (18:1) oméga-6	-	-	-	-	2,7%	5-16%
linoléique (18:2) oméga-6	-	-	-	-	13,7%	10-30%
gamma-linolénique(18:3 oméga-3	1080 mg	-	-	1000-1350mg	23,6%	8-40%

	a /100 g	b /100 g	b /10 g	c /100 g	d %	d 10g	
Vitamines	Vitamine A (Béta-caroténe)	352.000 IU	17000 IU	-	100-200mg	-	24000UI 14mg
	Vit B1	0.5 mg	10-35mg	-	3-5mg	-	0,35mg
	Vit B2	4.53 mg	0,2-0,4 mg	-	1,5-4mg	-	0,40mg
	Vit B3	14.9 mg	1,2 mg	-	10-14mg	-	1,6
	Vit B6	0.96 mg	0,8 mg	-	0,4-0,6mg	-	0,8mg
	Vit B8	-	0,5 mg	-	-	-	5mmg
	Vit B9	-	-	-	-	-	0,1mg
	Vit B12	162 mcg	0,15-0,20mg	-	0,2-0,25mg	-	0,29mg
	Vit E	-	1 mg	-	5-10mg	-	1,2mg
	Vit D	-	-	-	-	-	1200UI
	Vit K	1090 mcg	0,2 mg	-	-	-	0,2mg
	Ac. Folique	-	0,1 mg	-	50-150mg	-	-
	Ac.Panto	-	10 mg	-	0,5-1,5mg	-	-
Phyto-nutriments	Chlorophylle	1.2%	100mg	-	900-1200mg	-	1,2%
	Caroténoïdes	504 mg	30-40mg	-	300-400mg	-	0,4%
	B-carotene	-	-	-	-	-	0,18%
	Phycocyanine	17.2%	110mg	-	1000-1600mg	-	>16,5%
Minéraux	Minéraux	-	11g	-	-	-	-
	Calcium	468 mg	-	25-50mg	600-1200 mg	0,7%	-
	Phosphore	961 mg	-	80mg	-	0,8%	-
	Fer	87.4 mg	-	7-10 mg	55-150mg	0,18%	-
	Zinc	1.45 mg	-	0,3 mg	2-4mg	0,03%	-
	Magnésium	319 mg	-	20-40 mg	350-500mg	0,4%	-
	Sodium	641 mg	-	90-120 mg	-	0,09%	-
	Cuivre	0.47 mg	-	0,12 mg	-	1,8%	-
	Manganèse	3.26 mg	-	0,5 mg	-	0,1%	-
	Chrome	25.5 mcg	-	0,25 mg	-	0,25%	-
	Sélénium	25.5 mcg	-	0,1 mg	10-30mg	1,9%	-
	Potassium	-	-	-	-	140%	-
	Humidité	-	7g	-	5-7g	-	-

a : Gabriela Gutiérrez-Salmeán1et al,2015

b : Jean Louis Vidalo, 2008; Spirulina platensis-ferme EARTHRISE (U.S.A) Analyse standards « valeurs moyennes observées en routine »

c : Jean Louis Vidalo, 2008; Dogguang Dong Hu Biotech. Co Lttd : Jean Louis Vidalo, 2008; Spiruline H.T.P.A (à haute teneur en principes actifs) (Institut Hippocampe –Genève)

e : Spiruline aspects Nutritionnels J. Falquet J.-P. Hurni Antenna Technologies 2006

Tableau III: Principaux acides gras de la Spiruline. (Falquet, 2006)

Profil typique des acides gras de la Spiruline (<i>Arthrospira sp</i>)	
Acides gras	% des acides gras totaux
Palmitique	(16:0) 25-60%
Palmitoléique (16:1) oméga-6	0.5-10%
Stéarique (18:0)	0.5-2%
Oléique (18:1) oméga-6	5-16%
Linoléique (18:2) oméga-6	10-30%
Gamma-linolénique (18:3) oméga-6	8-40%
Alpha-linolénique (18:3) oméga-3	Absent

I.1.6 Effets thérapeutiques

La Spiruline a été largement étudié non seulement pour sa richesse en protéines, (Dillon et *al.*, 1995), mais aussi pour ses propriétés nutritionnelles et médicinales (Estrada et *al.*, 2001). Elle est facile à être digérer et absorber dans le corps humain car sa membrane cellulaire ne contient pas de cellulose (Kay, 1991). Il s'avère que la ressemblance structurale de la phycocyanine contenue dans la Spiruline à celle de la bilirubine lui confère une propriété antioxydante (Sguera, 2008). La Spiruline est ainsi considérée comme une source précieuse d'antioxydants naturels Abd El-Baky (2007) qui préserve les aliments et prévient les pathologies (Herrero et *al.*, 2004). De plus, la Spiruline s'est également avérée avoir une bonne acceptation organoleptiques, elle ne pose aucun risque de toxicité ni aiguë ni chronique, ce qui assure une sécurité pour la consommation humaine (Gutiérrez-Salmeán et *al.*, 2015).

Elle renferme plusieurs molécules ayant fait l'objet d'études pour leurs activités biologiques. Les propriétés immunostimulantes et antivirales de la Spiruline présentent notamment un grand intérêt dans la malnutrition (Hug, 2011). Elle est également utilisée contre le Sida, le cancer, et les maladies dégénératives. Au Japon, premier consommateur mondial, ses effets bénéfiques sur le diabète, les ulcères, les maladies du foie, les allergies et les problèmes cardiaques ont été étudiés de façon extensive (anonyme, 2016). En Russie, la Spiruline est autorisée comme « aliment thérapeutique » dans le traitement des maladies irradiées après la catastrophe de Tchernobyl (Loseva et *al.*, 1994).

La Spiruline empêche le dysfonctionnement de la mémoire, réduit les dommages liés au stress oxydatif et augmente l'activité antioxydante (Hwang et *al.*, 2011).

Par conséquent, la Spiruline est d'un grand intérêt car elle offre la possibilité d'être utilisée comme aliment fonctionnel (Ambrosi *et al.*, 2008). Ce terme se réfère aux aliments qui ont prouvé qu'ils aident les fonctions spécifiques du corps, produisant des propriétés favorisant la santé et/ou réduisent le risque de maladie au-delà de ses fonctions nutritionnelles (Hasler, 1996).

Chapitre II

**Généralités sur la margarine, les radicaux libres et les
antioxydants**

II.1. Généralités sur la margarine

II.1.1 Définition de la margarine

Selon le règlement (CE) n° 2991/94 du Conseil, du 5 décembre 1994, établissant des normes pour les matières grasses tartinables; les matières grasses composées de produits végétaux et/ou animaux relevant des codes NC ex 1517 et ex 2106, dont la teneur en matières grasses est au minimum de 10% et inférieure à 90% du poids, destinées à la consommation humaine. La teneur en matière grasse, à l'exclusion du sel ajouté, doit être d'au moins deux tiers de la matière sèche. Le présent règlement s'applique aux produits qui gardent une consistance solide à la température de 20 °C, et qui sont aptes à être tartinés.

La margarine est une émulsion du type eau dans l'huile qui comprend deux phases essentielles, une phase continue : la phase grasse (80%) et une phase dispersée : la phase aqueuse. Elle contient aussi des additifs (lécithines, monoglycérides, sel, colorant, antioxydants, conservateurs, vitamines) répartis en partie dans la phase grasse et en partie en phase aqueuse Faur (1992), de l'acide sorbique (E 200), du sorbate de sodium (E 201), du sorbate de potassium (E 202) et du sorbate de calcium (E 203) est autorisé dans les margarines telles que définies dans Anonyme (1988) l'article 1^{er} du décret n° 88-1205 du 30 décembre 1988 susvisé à la dose maximale de 1 gramme par kilogramme, exprimée en acide ascorbique, seuls ou en mélange entre eux.

II.1.2. Composition de la margarine

Les principaux éléments constituant la margarine sont présentés en tableau IV.

Tableau IV : Principaux éléments constituant la margarine (François, 1974 ; Cheftel et Cheftel, 1977 ; Faur, 1992 ; Ibrahim, 2007 ; Poirier et Ranga, 2008 ; Brien, 2009).

Le blend d'huiles	<input type="checkbox"/> L'origine des huiles alimentaires peut être végétale, animale ou marine
Les Emulsifiants	<input type="checkbox"/> Les émulsifiants ont un rôle important dans la rhéologie des émulsions (la lécithine, les mono et diglycérides , etc.)
Colorants, conservateurs et vitamines	<input type="checkbox"/> Les colorants sont utilisés dans la margarine pour lui conférer une couleur assez voisine de celle du beurre. <input type="checkbox"/> Les colorants les plus utilisés sont des extraits de graine d'annatto (<i>Bixia orellana</i>) et de β -carotène ou provitamine à d'origine synthétique ou naturelle. <input type="checkbox"/> Des extraits naturels contenant des caroténoïdes, tels que l'annatto, l'huile de carotte et huile de palme ont été également employés pour colorer les margarines. L'apocaroténal est un colorant synthétique qui est employé principalement comme renforçateur de couleur pour le bêta-carotène. <input type="checkbox"/> Les conservateurs de la margarine se répartissent en trois catégories : antimicrobien, antioxydants et chélateurs de métaux ; <input type="checkbox"/> La lécithine (palmitate ascorbylique et stéarate), le citrate d'isopropyle, et l'acide éthylènediamin et étracétique disodique de calcium (EDTA) agissent en tant qu'antioxydants synergistes. <input type="checkbox"/> La fortification de la margarine avec de la vitamine A est obligatoire; alors que l'utilisation de la vitamine D est facultative.
Correcteurs de pH	<input type="checkbox"/> Acide citrique, acide lactique pour freiner la croissance des micro-organismes
Révélateurs	<input type="checkbox"/> Amidon permet de différencier la margarine du beurre.
Aromes et vitamines	<input type="checkbox"/> L'aromatisation peut être réaliser par addition de diacétyl (arome de beurre) ou par un cocktail d'aromes, Vitamines A, D et des tocophérols.

II.1.2.3 Fabrication de la margarine

Les étapes de fabrication de la margarine sont les suivantes :

- la préparation de la phase grasse ;

- la préparation de la phase aqueuse ;
- le mélange des deux phases et la constitution de l'émulsion ;
- le refroidissement et la cristallisation ;
- le conditionnement ;
- le stockage et la distribution (O'Brien , 2009).

II.2. Radicaux libres et antioxydants

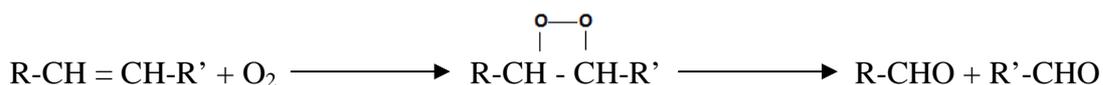
II.2.1. Définition de radical libre

Un radical libre est une espèce chimique, molécule ou atome, capable d'avoir, le plus souvent un ou plusieurs électrons célibataires (électrons non appariés sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable (Dusser, 1997 ; Koppenol, 2000; Poortmans et Boisseau, 2003).

□ Mécanismes de l'oxydation des lipides

Les lipides présents dans les aliments sont plutôt instables à la chaleur et supportent mal le stockage à température ambiante ou à des températures plus basses, dans la mesure où ils s'oxydent facilement. L'oxydation se traduit par une perte de la valeur nutritionnelle et par la détérioration des qualités sensorielles (le rancissement) (Graille, 2003). Elle est la principale altération des matières grasses qui résulte de l'action de l'oxygène sur les doubles liaisons des acides gras insaturés. La réaction est autocatalytique et nécessite des quantités infimes d'oxygène pour se déclencher et se poursuivre. Les premiers corps formés sont des hydroperoxydes qui par réaction en chaîne, donnent à leur tour des molécules plus complexes qui évoluent jusqu'à des acides aldéhydes, cétones et alcools à chaînes courtes volatiles, responsables de la flaveur rance des corps gras oxydés (Tremolières et *al.*, 1970).

Au contact de l'air (O₂)



En présence d'air; y a la formation de peroxydes toxiques qui se scindent ensuite en aldéhydes malodorants : c'est le phénomène de rancissement (Lauron, 2008).

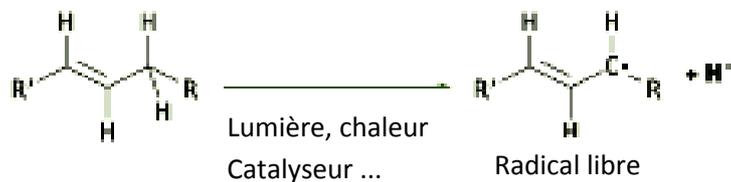
L'oxydation peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes (Tableau V)

Tableau V : mécanisme d'oxydation des lipides (Graille, 2003).

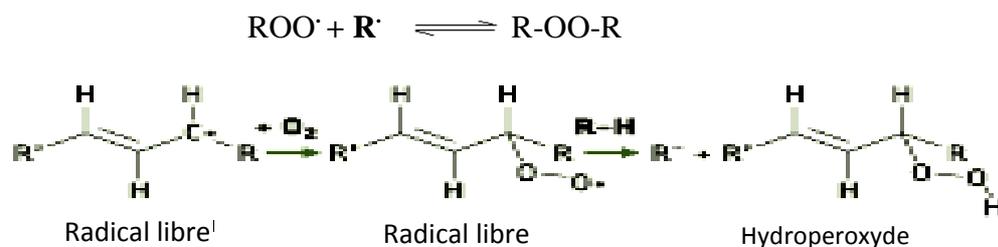
Type d'oxydation	Lipides oxydés	Catalyseur	Agent oxydant	Prévention
Auto-oxydation	Tous les lipides insaturés	Métaux lourds, radicaux libres	Oxygène triplet	Antioxydants
Oxydation enzymatique	Lipides polyinsaturés	Lyoxogénase	Oxygène triplet	Inactivation des enzymes
Oxydation due à l'oxygène singulet	Tous les lipides insaturés	molécules photosensibles	Oxygène singulet	Piégeurs d'oxygène singulet

L'auto-oxydation est accélérée par la lumière, la température, et les métaux dits prooxydants (Cu, Fe, Mn principalement). Un corps gras s'oxydera d'autant plus vite qu'il est riche en acides gras polyinsaturés, et ce en fonction du nombre de doubles liaisons. L'auto-oxydation est le chemin le plus important, c'est une réaction en chaîne de radicaux libres se déroulant en trois étapes :

- Réaction d'initiation : où se forme un premier radical libre. L'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni...) (Graille, 2003), selon les réactions (Tremolières et al., 1970).



- Réaction de propagation : où l'oxygène fixé donne un radical peroxy qui réagit avec une autre molécule et conduit à un néoradical libre et un hydroperoxyde (Chaveron, 1999).
- Réaction de terminaison : correspond à l'interaction entre deux radicaux libres comme décrit dans la réaction suivante : (Graille, 2003)



Globalement, ce processus conduit à des hydrocarbures, des aldéhydes, des cétones, des acides, des esters, des peracides, des peroxydes, mais aussi à des produits de polymérisation. Sous son effet, l'aliment accuse une perte de qualité nutritionnelle ou organoleptique (rancissement, changement de couleur...). Pour limiter l'oxydation, l'industrie use d'antioxydants inhibant l'oxydation induite par l'oxygène moléculaire (Marc et *al.*, 2004).

Chipault (1962) définit un antioxydant alimentaire comme « une substance qui, en faible quantité, est capable de prévenir ou de fortement retarder l'oxydation du matériel facilement oxydable, notamment les graisses ». Une définition légèrement modifiée et couvrant tous les antioxydants a été proposée par (Halliwell et Gutteridge, 1989) selon laquelle un antioxydant est « une substance qui, présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat ». Ce sont des substances utilisées pour conserver la nourriture en retardant la détérioration, la rancidité ou la décoloration due à l'oxydation (Shahidi et Naczk, 2006).

Les antioxydants présents dans les aliments sont une catégorie hétérogène de molécules (Tuberoso et *al.*, 2013). Les principales classes de composés avec activité antioxydante sont: les vitamines (vitamine C et vitamine E), les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) et les polyphénols (Mircea et *al.*, 2015).

II.2.2. Antioxydants naturels

II.2.1.1 Composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, omniprésents dans tous les organes végétaux et sont, donc, une partie intégrante de l'alimentation humaine. Ils sont synthétisés par les voies shikimate, polyacétate et mévalonate ou des voies mixtes. Leur intérêt a augmenté en raison de leurs capacités antioxydantes (Ahmed et *al.*, 2015).

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (Mouritsen, 2015). Les acides phénoliques (Figure 2) qui peuvent être divisés en deux catégories selon leur structure: dérivés de l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique. Ces composés consistent en un cycle benzénique lié à un groupe carboxylique (acides benzoïques) ou à un acide propénoïque (acides cinnamiques), qui présentent un potentiel antioxydant (Sova, 2012).

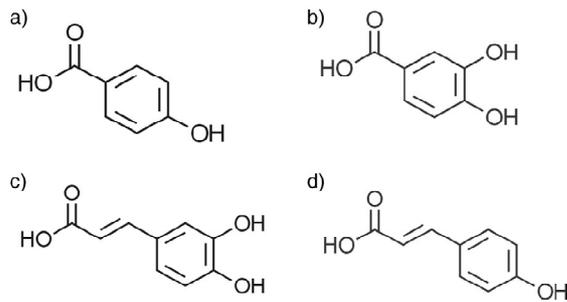


Figure 2: Structures des acides phénoliques: a—acide *p*-hydroxybenzoïque, b—3, 4-acide dihydroxybenzoïque, c—acide caféique, d—acide *p*-coumaric (Oroian et Escriche , 2015).

Les flavonoïdes dont beaucoup sont des pigments végétaux, abondants dans la nature (Majer *et al.*, 2014), peuvent être divisés en plusieurs sous-classes, les flavanols, les anthocyanidines et les isoflavones (Spencer *et al.*, 2008). La structure générale des flavonoïdes comprend un squelette C₁₅ (C₆-C₃-C₆) (Andersen et Jordheim, 2010), dont deux cycles (A et B) liés par un hétérocycle contenant un oxygène (C) (Figure 3).

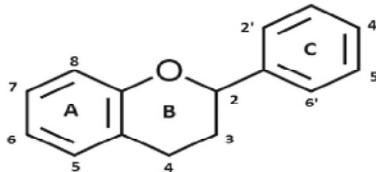


Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes (Majer *et al.*, 2014).

Les tanins sont des polyphénols ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3 000 qui, en plus des propriétés classiques des phénols, ont une aptitude à transformer les peaux fraîches en cuir imputrescible. Il convient donc de définir, en plus, les tanins par leur réaction au cours des traitements des peaux. Cette réaction vient de leur aptitude à se combiner aux alcaloïdes, à la gélatine et aux autres protéines ainsi qu'à des polymères divers tels que les celluloses et pectines (Quideau *et al.*, 1996; Haslam, 1994 ; Quideau, *et al.*, 2010).

Les tanins peuvent se diviser en deux classes :

- Les pyrogalliques (ou hydrolysables) ;
- Les catéchiques (ou condensés non hydrolysables).
- Les tanins hydrolysables; ce terme se réfère à leur capacité à être hydrolysés et à libérer soit de l'acide gallique pour les gallotanins soit de l'acide ellagique pour les ellagitanins (Quideau *et al.*, 1996; Haslam, 1994 ; Quideau, *et al.*, 2010). Ces

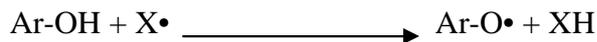
substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) (Nagata et *al.*, 1992).

- Les tanins catéchiques : l'action des acides dilués, au lieu de conduire à des produits plus simples, donnent au contraire des composés encore plus condensés. Freudenberg a démontré que ces tanins seraient des polymères de flavanol 3 (catéchine), et des flavanediols 3,4 (leucoanthocyanidines) (Pradeep et *al.*, 2015).

Le caractère réducteur des composés phénoliques et leur affinité pour les protéines et les ions métalliques; présentent ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides; en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires), que physiologique (stress oxydant) (Pradeep et *al.*, 2015).

Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes:

- Le piégeage direct des ERO ;



- L'inhibition des enzymes génératrices d'ERO;
- La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO ;



- L'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes : les polyphénols peuvent exercer un effet antioxydant indirect, en protégeant les enzymes endogènes dans le corps humain (Pradeep et *al.*, 2015).

II.2.1.2 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une grande famille qui regroupe plus de 600 molécules (Figure 4). Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertit en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A. Leur fonction dans l'organisme leur est propre et est indépendante de cette conversion (Pastre, 2005).

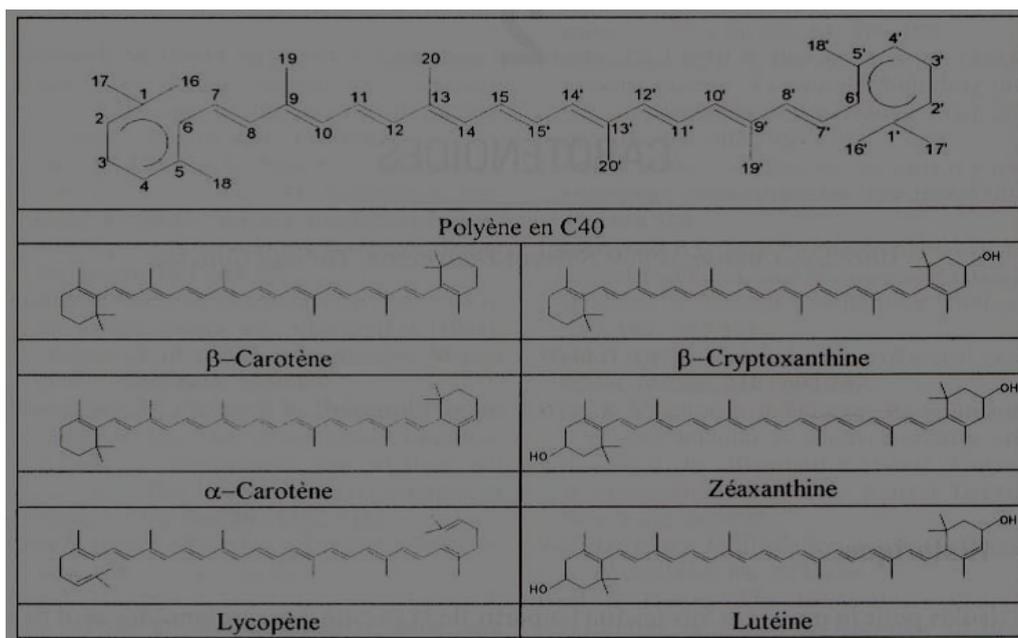
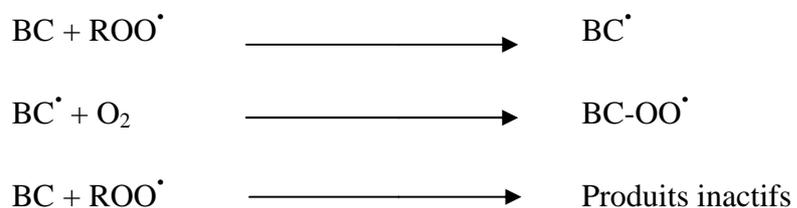


Figure 4. Structure des principaux caroténoïdes d'après Le Moel (1998).

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes, ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes (Le Moel, 1998).



Partie pratique

Matériel & méthodes

III. Matériel (annexe I) et méthodes

III.1. Caractérisation de *Spirulina platensis*

Les analyses ont été effectuées au sein du laboratoire Biochimie, Biophysique, Biomathématique et Scientométrie (3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Abderrahmane Mira/Béjaia.

III .1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est une cyanobactérie appelée « *Spirulina platensis* » qui a été fournie sous forme séchée par D^r Chader Samira, chercheuse au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (C.N.R.D.P.A) de Bousmail/ Tipaza. La souche de Spiruline est d'origine de la région de Tamenrasset; cultivée initialement dans la même région par M. Hiri. La culture de la biomasse de cette souche se fait au niveau de l'Université Kasdi Merbahde Ouargla par M. Seggai dans des bassins de culture artisanale sous le sol et couvert d'une bâche en plastique, contenant un milieu de culture Zarrouk et sous agitation à température ambiante (25°C et 40°C) dans une serre (Figure 5A-B). La micro-algue est séchée à l'air libre, à l'ombre, et mise sous forme de poudre, puis stockée à l'obscurité à température ambiante jusqu'à utilisation (Figure 5 C-E).

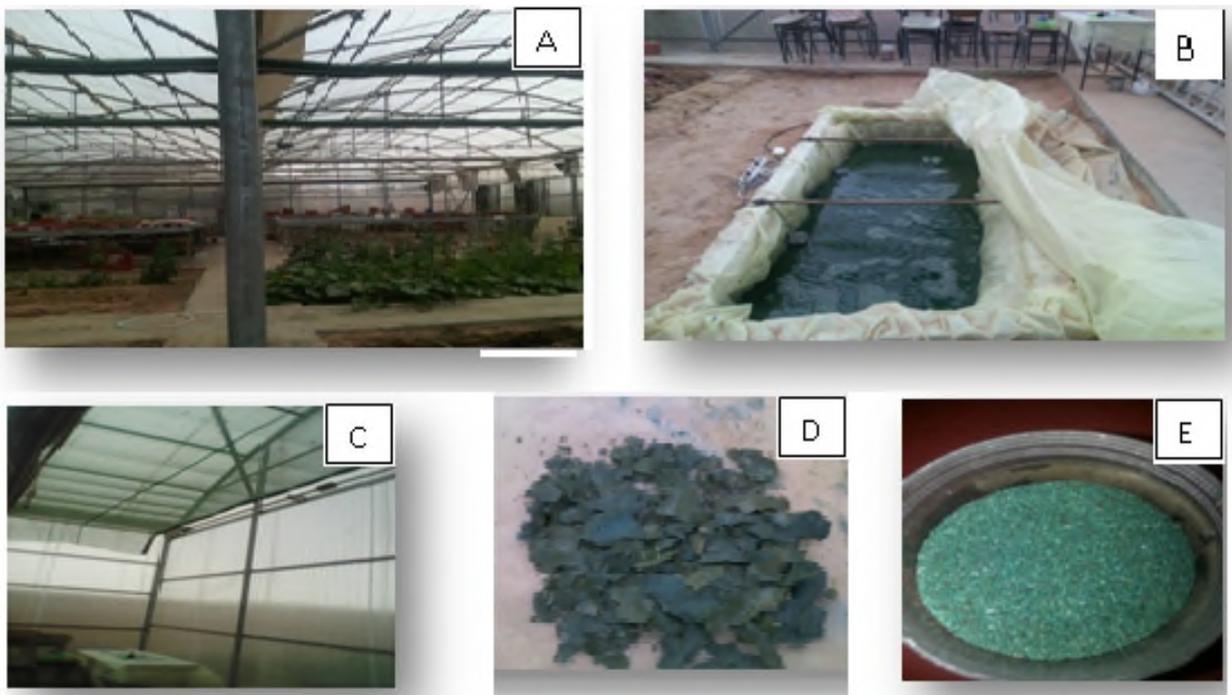


Figure 5 : Photographies de serre (A) et de bassin de culture avec système d'agitation (B) et de formes séchées (C- D) et broyée (E) de *Spirulina platensis*.

III.2.Extraction des principes actifs

III. 2 .1 .Procédés d'extraction

La technique d'extraction adoptée est la macération alcoolique (éthanol 50%, v/v).Le protocole suivi est celui élaboré par (Sroka, 2006) avec quelques modifications, il consiste à mettre 20g de *Spirulina platensis* sous forme séchée dans 200mL de solvant, et le mélange est laissée sur plaque agitatrice à 1000 tours/min pendant 24h à 50°C. Après par filtration avec du papier filtre standard, le filtrat obtenu est soumis à l'évaporation à sec dans une étuve ventilée à 40°C, puis lyophilisé et conservé à 4°C pour une éventuelle utilisation.

Le rendement d'extraction de l'extrait est calculé suivant la formule ci-après:

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = [(m_1 - m_0) / m \times 100]$$

m_0 : masse du cristalliseur vide en (g) ;

m_1 : masse du cristalliseur avec la prise d'essai après évaporation en (g);

m : masse de la prise d'essai en (g).

III.2.2. Dosage des composés phénoliques

III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (Singleton et Rossi, 1965). Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses (Boizot et Charpentier, 2006). Le principe de cette méthode se base sur le fait que le réactif de Folin –Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué d'hétérocycles; un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) (Ribéreau-Gayon, 1968).

La réduction des hétérocycles induit à la formation d'un complexe molybdène (Mo_8O_{23})-tungstène (W_8O_{23}) stable de couleur bleu qui absorbe fortement à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm. La coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique (Benarous, 2006).

La teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait a été déterminé par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Dorman et al., 2003). Dans trois tubes à essai contenant 1,2mL d'eau distillée, nous avons introduit 20 μ L de l'extrait auquel ont ensuite été ajouté 100 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange a été agité pendant une minute, puis 300 μ L d'une solution de Na_2CO_3 à 20% ont été ajouté. Le

volume est ensuite complétée avec l'eau distillée jusqu'à de 2mL. Après 2heures d'incubation dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 760nm par rapport à un blanc.

La concentration en composés phénoliques totaux a été exprimé en équivalent milligramme d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg Eq AG /g de matière sèche) en se référant à la courbe d'étalonnage (annexe II.1).

III.2. 2. 2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, formant un complexe jaunâtre en présence de chlorure d'aluminium par chélation des métaux (fer et aluminium) en perdant deux électrons, qui sont dans ce cas donneurs d'électrons (Ribéreau- Gayon, 1968).

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode rapportée par Brahmi et *al.* (2012) ; un volume de 1mL d'une solution de AlCl₃ à 2% a été mélangé à un volume égal d'extrait. Après 15mn d'incubation à l'obscurité, la lecture des absorbances a été réalisée à 430nm par rapport à un blanc préparé sans extrait.

La teneur en flavonoïdes est exprimé en équivalent milligramme de quercétine par gramme de matière sèche (mg EqQ /g de matière sèche) en se référant à la courbe d'étalonnage (annexe II.2).

III.2. 2. 2. Dosage des tanins

Le principe de cette méthode repose sur l'aptitude des tanins à précipiter les protéines sous forme de complexes insolubles protéine-tanin. Les complexes formés seront par la suite dissout à l'aide d'une solution contenant le dodécyl sulfate de sodium et le triéthanolamine (SDS/TEA) (Ribereau-Gayon, 1968 ; Hagerman et Butler, 1978).

Le chlorure ferrique réagit avec les tannins pour former des chélates de couleur violette (Ribereau-Gayon, 1968 ; Hagerman et Butler, 1978).

Un volume de 0,5 ml de l'extrait a été ajouté à 1ml d'une solution de BSA à 1mg/ml, la solution est agitée puis incubée à 4°C pendant 24h. Après une centrifugation à 14000tour/min durant 15min est réalisée. Le culot est ensuite dissout dans 2ml de SDS/TEA et additionné de 0,5ml de FeCl₃, suivit d'une agitation. L'absorbance est mesurée à 510nm après incubation de 15 min.

Les résultats sont exprimés en équivalent milligramme d'acide tannique par gramme de matière sèche en utilisant une courbe d'étalonnage (annexe II.3).

III.2.2.3. Dosage des caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes est réalisée selon la méthode de Sass-Kiss *et al.*, (2005) en mettant 0,5 g de Spiruline séchée dans 10mL d'un mélange de solvants à savoir : hexane, acétone et éthanol (2, 1, 1 : V/V/V). Après agitation pendant 30min l'absorbance de surnageant est mesurée à 450nm.

Les résultats sont exprimés en mg/g de matière sèche en utilisant une courbe d'étalonnage réalisée avec β -carotène (annexe II.4).

III.2.3. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyles phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) (Rice-Evans *et al.*, 1995; Bartosz, 2003).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Tabart *et al.*, 2009 ; Gaulejac *et al.*, 1999; Liet *et al.*, 2008).

III.2.3.1. Activité Scavenger du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $^\bullet$)

Le radical DPPH $^\bullet$ possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH $^\bullet$ reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire; en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), l'atome H est transféré sur un radical libre DPPH $^\bullet$, alors transformé en une molécule stable DPPH-H (non radicalaire). En effet, la présence des radicaux DPPH $^\bullet$ donne une coloration pourpre foncée à la solution et qui absorbe fortement à 517 nm (Figure 6). Au cours de la réaction, la colorimétrie de la solution change sous l'effet d'un agent antioxydant qui entraîne la décoloration de la solution; ceci provoque une

diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

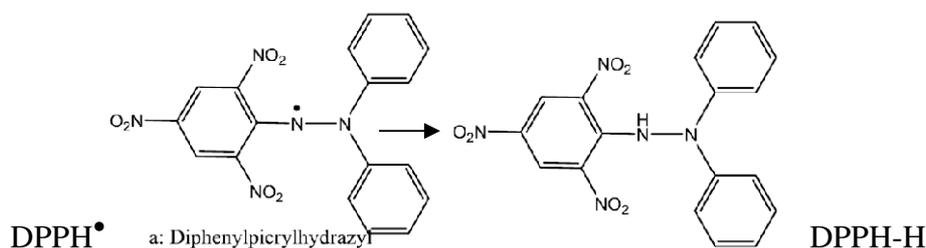


Figure 6 : Mécanisme d'action de DPPH (Blois, 1958).

L'effet scavenger est déterminé en utilisant la méthode proposée par Blois (1958). Nous avons rajouté 150 μL de la solution DPPH (10^{-3}M) à une série de dilutions d'un extrait de lyophilisat. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant une heure à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 517nm.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par les échantillons a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{contrôle}} - \text{Absorbance}_{\text{échantillon}}}{\text{Absorbance}_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Les résultats ont été exprimé en IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$), en utilisant une courbe d'étalonnage (annexe III.1).

III.2.3.2. Capacité antioxydant totale (TAC)

L'évaluation de la capacité antioxydant totale (TAC) par la méthode phosphomolybdène (PMRC) des extraits éthanoliques de *Spirulina platensis* ont été évalués selon la méthode décrite par Prieto et al. (1999). Cette technique est basée sur la réduction du molybdène Mo(VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo(V) MoO^{2+} par l'extrait. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte.

Un volume de 200 μL de différentes concentrations de l'extrait a été additionné à 2 mL de réactif de molybdate (acide sulfurique à 0,6 M, phosphate de sodium à 28 mM et molybdate d'ammonium à 4 mM). Le mélange a été incubé au bain marie à 95°C /90min. Après refroidissement l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre un blanc exempt d'extrait. Les résultats ont été exprimés en IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$), en utilisant une courbe d'étalonnage (annexe III.2).

III.2.4. Formulation des margarines

La formulation des margarines a été réalisée à l'échelle de laboratoire, au niveau de Laboratoire de Recherche et Développement (LRD) du complexe agro-alimentaire SPA « Cévital » de Béjaïa comme suit :

- **Préparation de la phase grasse**

Dans un seau en acier inoxydable, un mélange de trois huiles végétales (huile de tournesol, huile de palme et huile équivalent de soja hydrogénée) est préparé. Ensuite, quelques gouttes d'acide lactique ainsi que d'émulsifiant « monodiglycéride » ont été rajoutés et la préparation est agitée.

- **Préparation de la phase aqueuse**

Des extraits de Spiruline lyophilisée ont été préparés au préalable à 50, 100 et 150 ppm. Chaque concentration a été rajoutée dans un bécher correspondant, contenant de l'eau déminéralisée, puis additionner de lait reconstitué écrémé, de sel et de sorbate de potassium. La phase aqueuse a été ensuite ajoutée à la phase grasse, sous agitation mécanique à une température égale à 39°C.

- **Cristallisation**

Le mélange des deux phases a été mis dans un grand récipient contenant de la glace, afin de refroidir la margarine formulée, tout en malaxant manuellement avec une spatule jusqu'à l'obtention d'une margarine homogène.

- **Conditionnement**

La margarine préparée a été versée dans une barquette de 500g correspondant chacune aux extraits de Spiruline (50, 100 et 150ppm), qui ont été fermées hermétiquement puis mises au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

III.4 .Caractérisation de la margarine élaborée

III.4 .1. Analyses et contrôle de qualité des margarines

Les margarines élaborées ont fait l'objet d'un ensemble d'analyses physico-chimiques au niveau de laboratoire margarinerie de Cévitall et au niveau de laboratoire de Contrôle de Qualité « Qualilab » (pour le test de Shaal) afin d'apprécier leur qualité.

▪ Préparation de l'échantillon

Afin d'effectuer certaines analyses physico-chimiques, l'échantillon a été préparé comme suit :

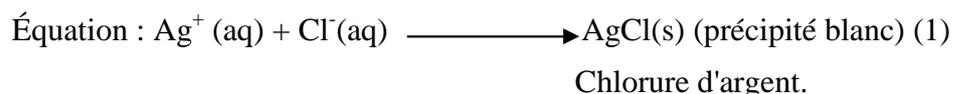
Une quantité de margarine incorporée de Spiruline a été mise dans un bécher, qui sera incubé à 70°C jusqu'à apparition de deux phases distinctes (phase grasse et phase aqueuse). La phase grasse est ensuite filtrée avec un papier filtre additionné de sulfate de sodium anhydre, le filtrat obtenu est recueilli dans un autre bécher, qui sera destiné aux tests de point de fusion, de dosage de taux de solide, de test d'indice de peroxyde, de test de Shaal et la mesure pH sera effectuée dans la phase aqueuse.

III.4.1.1.Détermination du pH de la phase aqueuse (NE. 1. 2.430 /1989)

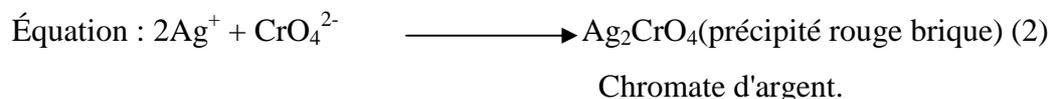
Le pH donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité du milieu, il est déterminé à partir de la quantité d'ions d'hydrogènes libres (H^+) contenue dans le corps gras (Audigié *et al.*, 1984). Le pH -mètre a été étalonné par de l'eau distillée à pH = 7. Les électrodes ont été introduites dans la phase aqueuse de la margarine incorporée, lorsque la lecture devient constante, lire et noter la valeur du pH indiquée.

III.4.1.2.Dosage de sel (NE. 1. 2.429/ 1989)

La méthode de Mohr consiste à doser la teneur en chlorure de sodium (NaCl) contenue dans la margarine formulée. C'est un dosage par précipitation en milieu neutre d'ions de chlorure Cl^- à l'aide d'une solution d'ions Ag^+ de nitrate d'argent. L'indicateur de fin de réaction est une solution de chromate de potassium. En présence d'ions Ag^+ en excès, il se forme un précipité rouge brique de chromate d'argent comme le montre la réaction :



Repérage de l'équivalence :



Un volume de 100ml d'eau distillée chauffée à 100°C a été ajouté à 5 g de margarine contenue dans un Erlenmeyer, le mélange a été ensuite laissé refroidir.

Quelques gouttes de chromate de potassium (indicateur coloré) ont été ajoutées et le titrage a été effectué avec une solution de AgNO₃ à 0,1N jusqu'à apparition d'un virage de la solution à une couleur rouge brique, puis le volume de la chute de burette a été noté.

La teneur en sel (NaCl) de l'extrait est calculée suivant la formule ci-après:

$$TS (\%) = \frac{N \times V \times m_{Eq.g} NaCl}{m \times 1000} \times 100$$

TS: teneur en sel exprimée en % ;

N : normalité de AgNO₃ (0,1N) ;

V : volume de la chute de burette (mL);

m_{Eq. gNaCl}: milli équivalent gramme de NaCl(58,5) ;

m : masse de la prise d'essai (g).

III.4.1.3. Test de point de fusion (NE 1.2.91 /89)

Le point de fusion est la température à laquelle une matière grasse solidifiée dans un tube capillaire se ramollit jusqu'au point où elle remonte dans le tube. Il est basé sur le passage de la matière grasse de l'état solide à l'état liquide sous l'effet de la chaleur, à une certaine température (maximum 37°C).

Après avoir fait fondre une quantité de margarine élaborée dans un bécher, et une fois la phase grasse filtrée; elle subit une montée par capillarité dans deux tubes capillaires en verre sur une hauteur d'environ 1- 2cm. Les deux tubes ont été maintenus fixés avec une pince en bois, puis refroidis au congélateur pendant quelques minutes. La pince est ensuite suspendue aux bords d'un bécher, de façon que les deux tubes capillaires contenant la margarine solidifiée sous l'effet de la congélation soient immergés dans de l'eau osmosée chauffée progressivement dans un bain marie.

La margarine liquéfiée commence à remonter dans le tube capillaire, et la température affichée sur le thermomètre a été observée attentivement et notée. Elle correspond au point de fusion de la margarine exprimée en (°C).

III.4.1.4. Mesure de la teneur en eau (ISO 662)

C'est la perte en masse subite par l'échantillon après chauffage à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ exprimée en pourcentage de masse. Il consiste à provoquer le départ d'eau par chauffage d'une quantité connue de corps gras jusqu'à élimination complète de l'eau M.E. (2017).

Une masse de 2g de margarine à analyser a été pesée dans un bécher, qui a été préalablement séché et refroidi dans un dessiccateur puis pesé (m_0). Le bécher a été mis dans l'étuve pendant une heure à 103°C .

Après refroidissement dans un dessiccateur, le bécher a été pesé (m_2) et la teneur en humidité est calculée selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{(m_0 + m_1) - m_2}{m_1} \times 100$$

H (%) : pourcentage en humidité ;

m_0 :masse du Becher vide ;

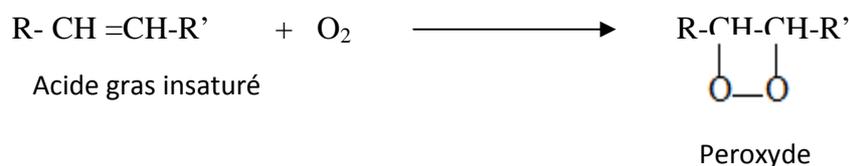
m_1 :masse de la prise d'essai avant chauffage ;

m_2 :masse du Becher vide et de la prise d'essai après chauffage.

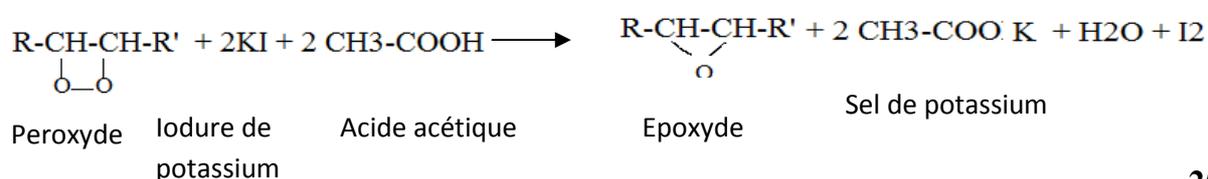
III.4.1.5.Dosage de l'indice de peroxyde (NA. 274/ 1990)

L'indice de peroxyde représente la quantité des substances de l'échantillon exprimée en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de corps gras qui oxydent l'iodure de potassium dans les conditions de travail décrites (Binti, 2006).

La prise d'essai dans un mélange acide acétique et chloroforme est traitée par une solution d'iodure de potassium. L'iodure libéré est titré avec une solution de thiosulphate de sodium (Pardo et *al.*,2007).La réaction d'oxydation est donnée comme suit Frais Ruiz et *al.* (1999):



Réaction d'iodure de potassium en milieu acide:



et margarine témoin, qui ont été incubés à l'étuve à 30°C pendant un mois au niveau de laboratoire de contrôle de qualité « Qualilab »/Béjaia.

Cette méthode est basée sur le test de peroxyde; et a été effectuée une fois par semaine pendant un mois sur des prélèvements de margarines incorporées de spiruline à des concentrations de 50, 100 et 150 ppm ainsi, que sur une margarine de référence (témoin) « Fleurial 500 g » additionnée de tocophérol lors de la fabrication conditionnée en barquette de 500 g, fabriquée le 28 Mars 2017.

III.2. Analyse physique et spectroscopique

III.2.1. Détermination du taux de solide par RMN (teneur en corps gras solides)

La détermination de la teneur en corps gras solides est effectuée à l'aide d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN) pulsée basse résolution, de type (minispecmq 20, Germany).

La teneur en solide d'une phase grasse constitue un élément important pour la connaissance des propriétés rhéologiques d'une graisse. Basée sur la mesure, par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à basse résolution et à onde pulsée, de la teneur en composés liquides contenant de l'hydrogène. Méthode rapide et non destructrice, la RMN nécessite de connaître la nature de la matière grasse, car l'appareil doit être étalonné avec un corps gras identique à celui que l'on veut doser. Elle ne peut s'appliquer à des composés contenant des corps gras inconnus présents dans les graines oléagineuses, préalablement séchées à 103 ± 2 °C (Ollé, 2002).

Le principe de cette méthode consiste à tempérer l'échantillon dans un état stable à une température spécifique et ensuite chauffé et stabilisé à la température de mesure. Les températures de mesure sont : 0,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C. Après équilibrage électromagnétique dans le champ magnétique statique du spectromètre RMN et l'application d'une impulsion de radiofréquence à 90°, le signal de décroissance de magnétisation des protons dans la phase liquide uniquement est mesuré et les corps gras solides sont calculés en référence à un échantillon étalon constitué entièrement de corps gras liquides.

La méthode indirecte dite aussi standard consiste à faire introduire la phase grasse de la margarine dans des tubes remplis à hauteur de 3cm puis incubés respectivement pendant 15 min à 100°C, 5 min à 60°C, 60 min à 0°C, 30 min à 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C en faisant

la lecture à chaque température. Les résultats ont été donnés par le logiciel de l'appareil en pourcentage de solides (%).

Résultats et discussion

L'une des tendances les plus importantes actuellement, est l'incorporation d'ingrédients naturels dans les aliments, telle que la Spiruline « *Spirulina platensis* ».

La spiruline est par ailleurs reconnue comme l'aliment le plus nutritif ; elle a été présentée comme le meilleur aliment pour l'avenir « best food for the future » lors de la conférence des Nations Unies sur l'Alimentation en 1974. Pour l'UNESCO c'est : « l'aliment idéal et le plus complet de demain » et pour la FDA « l'une des meilleures sources de protéines ». De plus, si l'alimentation n'est pas suffisante la prise de compléments alimentaires riches en antioxydants tels que la spiruline qui contient de nombreux systèmes antioxydants (enzymes : SOD, phycocyanine, acide γ -linoléique, β -carotène et vitamine E, etc.) peut être bénéfique. Un kilogramme de spiruline contient autant d'antioxydants qu'une tonne de fruits ! En effet, il existe de nombreuses études confirmant le rôle antioxydant de la spiruline (Manet, 2016).

Dans cette optique, et afin de recueillir des informations sur cette micro-algue, différentes techniques et méthodes analytiques ont été réalisées sur le plan pratique, pour une éventuelle quantification de composés antioxydants de la spiruline, et identification de ses effets antioxydants. Une caractérisation d'une margarine incorporée de Spiruline, et l'étude de l'efficacité de cette dernière comme agent antioxydant naturel a fait également l'objet de ce modeste travail.

IV .Extraction et dosages des composés phénoliques

Le tableau VI résume le rendement en (%) et les teneurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes, tanins exprimées en mg/g d'extrait frais, d'extrait sec et de matière sèche, enregistré pour l'extrait éthanolique (50%) de *Spirulina platensis*.

Tableau VI : Rendement d'extraction et teneurs en composés phénoliques de l'extrait éthanolique de *Spirulina platensis*.

	Extrait	Extrait sec	Matière sèche
Teneur en composés phénoliques totaux (mg Eq AG/g)	27,5± 1,2	12,1± 0,5	2,4±0,1
Teneur en flavonoïdes (mg Eq Quercétine/g)	11,5 ± 0,7	5,0± 0,3	1,0± 0,1
Teneur en tanins (mg Eq AT/g)	14,3± 1,8	6,3± 0,8	1,3± 0,1
Rendement d'extraction (%)	14,5		

IV.1. Rendement d'extraction par macération alcoolique

L'objectif de ce présent travail, n'est pas de procéder à l'optimisation du solvant d'extraction. Cependant, il est à signaler que pour sa non toxicité comparativement au méthanol et pour une éventuelle utilisation dans le domaine agroalimentaire, l'éthanol est préféré. En outre, les acides phénoliques très polaires (acides benzoïques et cinnamiques) ne peuvent pas être extraits complètement avec des solvants organiques, l'eau contribue à la création d'un milieu modérément polaire qui assure l'extraction des composés phénoliques (Lapornic et *al.*, 2005). Ainsi notre choix s'est porté sur l'utilisation d'éthanol 50% pour l'extraction des composés phénoliques à partir de Spiruline.

Le résultat de rendement d'extraction par macération obtenu dans ce travail, en utilisant l'éthanol 50%, comme solvant est de 14,5%. Il est nettement supérieur aux résultats enregistrés par Shalaby et *al.*, (2013) qui ont obtenu des pourcentages de rendement des différents extraits de *S.platensis* qui varient selon la nature des solvants utilisés et leur concentration ; eau 100% (4,2 %), méthanol 100 % (7,3%), méthanol 50% (2,5%).

Cependant notre résultat est très proche de celui révélé par Bensehaila (2016) (13,65%), et se trouve dans la gamme des valeurs données par Hanaa et *al.* (2009) (10,14 à 16,35%) pour *Spirulina maxima*, ces auteurs ont adopté le même solvant d'extraction dans leurs études. Hettal et *al.* (2014) ont également déterminé une valeur similaire (14,68%) même en utilisant la macération à froid dans du méthanol 70%, suivi de fractionnement successif dans de l'eau distillée jusqu'à épuisement. Toutefois, Bensehaila (2016) a révélé un rendement nettement supérieur avec le méthanol comme solvant (40,05%).

IV.2. Teneurs en antioxydants

IV.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Les composés phénoliques ont été largement étudiés pour leurs propriétés antioxydantes non seulement dans les fruits et légumes, mais aussi dans les cyanobactéries (Colla et *al.*, 2007). La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est très utilisée dans les laboratoires, et donne des résultats fiables et reproductibles. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et permet de traiter un nombre important d'échantillons en utilisant des quantités faibles d'extraits végétaux. Néanmoins, elle n'est pas spécifique des polyphénols; le Folin réagit avec les acides aminés (tyrosine et

tryptophane) des protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites (Boizot et Charpentier, 2006).

La teneur obtenue dans cette étude (2,4 mg Eq AG/g MS) est similaire à celles trouvées par Shalaby et *al.*, (2013) pour les extraits aqueux (1,7 mg Eq AG/g MS) et méthanolique (2,8 mg Eq AG/g MS) en utilisant l'HPLC.

Elle est aussi comparable à celles trouvées par Colla (2006) (1,25 mg Eq AG/g) et Bensehaila (2016) (1,83 mg Eq AG/g). Collado et *al.*, (2006) ont également constaté que le contenu en composés phénoliques totaux de *Spiruline* varie entre 2,4 et 5,0 mg Eq AG/g. De même, Ismaïel et *al.*, (2016) ont trouvé une teneur de 2,7 mg Eq AG/g à pH 11 mais en utilisant d'autres gammes de pH, cet auteur a trouvé des concentrations nettement élevées (11,9 et 12,1 mg mg Eq AG/g MS) qui coïncident avec celles déterminées par Bolanho et *al.* (2014) (12,2 mg/g). Par contre Hettal et *al.* (2014) ont trouvé (8,6 mg Eq AG/g), Machu (2015) ont déterminée une teneur plus élevée (43,2 mg Eq AG/g), en utilisant l'extraction par eau distillée (80°C pendant 10 min dans un bain marie avec agitation constante). Selon Shalaby (2013), la détermination des composés phénoliques dans trois extraits de *S. platensis* a révélé que le méthanol absolu a enregistré le pourcentage le plus élevé (1,23%) qui est suivi de ceux obtenus avec le méthanol aqueux (0,89%) et de l'extrait aqueux (0,55%).

D'après Abeer (2015), ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs; y compris le standard utilisé (acide gallique). Selon Nathalie et *al.*, (2006), il est préférable de choisir le polyphénol témoin en fonction de la composition de l'extrait à analyser, car l'intensité de la réaction varie en fonction du nombre de groupements hydroxyles (-OH) portés par les noyaux benzéniques des molécules.

En outre, Colla et *al.* (2006) ont démontré que la température est importante pour la production de biomasse, de protéines, de lipides et de composés phénoliques par *S. platensis*. Une température de 35°C a un effet négatif sur la production de biomasse, mais un effet positif sur la production de protéines, lipides et composés phénoliques. En effet, il a été constaté, qu'à cette température; il y avait une augmentation significative de la quantité de composés phénoliques synthétisés par les cellules (4,99 mg/g). Ainsi, la teneur en composés phénoliques dépend de la biomasse, d'ailleurs Abeer (2015) a montré une teneur considérable en composés phénoliques totaux variant entre 26,75 et 40,45 mg/g pour *Spirulina platensis*. La teneur (40,45 mg /g) est notée dans la biomasse de 1,5 g/100 mL.

Des teneurs plus élevées et plus importantes ont été enregistrées par Aouir *et al.* (2017), qui ont fait une comparaison entre différentes souches de *Spirulina* de différents pays; Algérie, Chad et USA, où ils ont montré que *S. platensis* sous forme fraîche Hiri-Tamenrasset (HTAM) a révélé une teneur en polyphénols totaux de 67,52 mg Eq AG/g de poids sec suivie par Spiruline sous forme sèche; Hawaïien, *Spirulina pacifica* (HSP) (48,93 mg Eq AG/g), Spiruline sous forme sèche Hiri-Tamenrasset (HTAM) (45,22 mg Eq AG/g), Spiruline sous forme séchée Dihé Chad Lack Chad Spiral (19,61 mg Eq AG/g) et Spiruline fraîche M2 Université des Sciences et Technologie (Ouargla, Algérie) (39,33 mg Eq AG/g). La teneur révélée par Benahmed *et al.* (2012) se retrouve dans la gamme donnée par ces auteurs dont la valeur est de 51,32 mg Eq AG/g.

IV.2.2. Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe très importante de composés phénoliques. Shalaby *et al.* (2012) ont révélé la présence de flavonoïdes dans les extraits méthanolique à 100 et 50%, mais ont marqué leur absence dans l'extrait aqueux *Spirulina platensis* en utilisant HPLC.

La quantité en flavonoïdes trouvée dans ce présent travail (1,0 mg EQ/g MS), est inférieure à celle trouvée par Hettal *et al.* (2014) (2,9 mg/g), qui a effectué une extraction par macération à froid dans du méthanol 70% et qui est compris dans la gamme de concentration donnée par Hanaa *et al.* (2009) (1,32 à 5,12 mg/g) pour *Spirulina maxima*. Toutefois, ces valeurs varient suivant une gamme de concentrations en nitrate de sodium (NaNO_3) ainsi que en phénylalanine, utilisés comme compléments en milieu de culture Zarrouk à pH 10,5 et à une température de 28 ± 2 °C.

Selon Hanaa *et al.*, (2009), l'ajout de phénylalanine au milieu de culture améliore la production de composés phénoliques totaux et y compris les flavonoïdes. Les quantités les plus élevées en composés phénoliques (16,96 mg / g M.S) et en flavonoïdes (5,12 mg /g MS) ont été obtenues en milieu de culture contenant 100 mg/L de phénylalanine, et 3,77 g/ L de NaNO_3 (niveau le plus élevé). Ces résultats ont révélé que les niveaux en composés phénoliques et en flavonoïdes ont augmenté de façon marquée par l'augmentation de la concentration en NaNO_3 combinée avec la phénylalanine en milieu de culture. Par exemple, les quantités en flavonoïdes produites par *S. maxima* cultivée dans des milieux à des concentrations respectivement de 2,5 ; 3,12 et 3,77 g/L de NaNO_3 combinées avec 100 mg/L

de phénylalanine étaient de 1,94 ; 3,31 et 5,12 mg/g MS; cela indique clairement que la phénylalanine stimule la production des composés phénoliques et des flavonoïdes.

IV.2.3. Teneur en tanins

Pour la détection des tanins, une teneur de 1,3 mg Eq AT/g a été déterminée dans ce présent travail. Hettal et al. (2014) ont trouvé par contre une valeur un peu plus élevée qui est de 2,02 mg /g). Cependant, Sudha et al. (2011) et Shalaby et al. (2013) ont noté l'absence de tanins dans leurs travaux; en utilisant les extractions avec de l'eau et du méthanol 50% mais l'extrait méthanolique renferme ce type de composés phénoliques.

IV.2.4. Détermination de la teneur en caroténoïdes

En raison de la diversité du matériel biologique dans lequel se trouvent les caroténoïdes, aucune technique d'extraction standard ne peut être esquissée (Gross, 1991). Les méthodes généralement utilisées pour le dosage des caroténoïdes extraits d'un milieu naturel sont basées sur la spectrophotométrie d'absorption. Ces méthodes peuvent être relativement précises mais nécessitent alors une préparation relativement longue de l'échantillon à analyser (Khachik, 2009). Par conséquent, l'extraction doit se faire aussi rapidement que possible pour éviter la dégradation oxydante ou enzymatique des caroténoïdes qui se trouvent dans l'échantillon (Gross, 1991).

En général, le choix du solvant organique à utiliser pour l'extraction dépend de la nature du matériau à extraire et les propriétés de solubilité des principaux caroténoïdes. Étant donné que les caroténoïdes sont liposolubles, ils sont extraits avec des solvants organiques (Gross, 1991). Il est souhaitable pour les échantillons d'aliments qui contiennent une quantité assez importante d'eau, d'utiliser un solvant organique qui est miscible avec l'eau, afin d'optimiser la libération des caroténoïdes de la matrice et empêcher la formation d'émulsions (Khachik, 2009).

Tableau VII : Teneurs en caroténoïdes de *Spirulina platensis*

	Extrait	Extrait sec	Matière sèche
Teneur en caroténoïdes (mg Eq β-carotène/g)	8,7 \pm 1,4	3,8 \pm 0,6	0,8 \pm 0,1

La teneur en caroténoïdes obtenue dans ce présent travail (0,8 mg β -carotène/g MS) (Tableau VII) n'est pas comprise dans la gamme rapporté par Vidalo (2008), dont les valeurs s'échelonnent entre 300 et 400 mg β -carotène /100 g pour la spiruline d'origine Chinoise. Par contre, elle est supérieure aux valeurs rapportées par le même auteur qui sont comprises entre 30-40 mg /100 g pour la spiruline d'USA. D'autres auteurs ont donné des teneurs différentes ; tels que Ismaïel et *al.* (2016) qui ont déterminé une concentration de 2,4 mg β -carotène/g MS en caroténoïdes à pH 8,5, Pierlovisi (2007) et Jourdan (2011) qui ont enregistré des valeurs identiques (3,7 mg β -carotène/g (dont la concentration en β -carotène = 1,4 mg/g)). Toutefois, la teneur la plus élevée en caroténoïdes (5,04 mg /g) a été déterminée par Gutiérrez-Salmeán (2015).

D'après Gutiérrez-Salmeán (2015) la Spiruline est une bonne source en caroténoïdes et notamment en β -carotène, contenant environ 700-1700 mg/kg. Toutefois, à cause des autres pigments souvent présents dans les échantillons analysés et extraits en même temps que les caroténoïdes, l'analyse est peu précise sur l'extrait cétonique brut, les chlorophylles en particulier sont souvent gênantes. Une saponification et différents modes d'extraction sont alors nécessaires pour purifier la solution; ce qui amène inévitablement une perte de caroténoïdes donc une erreur dans le dosage (Merlin et *al.*, 1985) .

IV.3. Détermination de l'activité antioxydante

Les bio-antioxydants ont attiré beaucoup d'attention dans l'objectif de substituer les substances de synthèses. Ainsi, les plus demandés sont maintenant les substances antioxydantes d'origine végétale (Pokorny, 2007). Les microalgues et les cyanobactéries sont également des sources importantes de substances antioxydantes naturelles (Herrero et *al.*, 2005; Plaza et *al.*, 2008; Rodriguez-Garcia et *al.*, 2008; Hua-Bin Li et *al.*, 2007; Santoyo et *al.*, 2006). Leur large utilisation est liée à leur teneur élevée en composés phénoliques, qui protègent les lipides de la peroxydation oxydative Pokorny et *al.*, (2007).

Différentes méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de la biomasse ou de diverses extractions de cyanobactéries (Herrero et *al.*, 2005; Hirata et *al.*, 2000; Lin-Chun Mao et *al.*, 2006 ; Magalhães et *al.*, 2008) ainsi que de nombreux composés naturels dans les aliments ou les systèmes biologiques (Shalaby et Shanab, 2013). Les résultats obtenus dépendent en général de la pertinence de la méthode appliquée pour la détermination de l'activité antioxydante, et aussi des méthodes d'extraction utilisées (Herrero et *al.*, 2005; Hirata et *al.*, 2000; Lin-Chun Mao et *al.*, 2006 ; Magalhães et *al.*, 2008).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Kevers et *al.*, 2009; Saint-Cricq et *al.*, 1999; Hua Li et *al.*, 2008).

Dans ce présent travail, l'activité antioxydante a été déterminée par deux méthodes complémentaires; l'activité scavenger du radical DPPH[•] et le test au phosphomolybdate.

IV .3 .1. Activité scavenger du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•])

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour évaluer l'activité scavenger des composés contenant des groupements SH-, NH- et OH- (Salah et *al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. En outre, la méthode est simple, précise, peu coûteuse (Brand-Williams, 1995), et reproductible (Arnao, 2000).

Le test est largement utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits hydrophiles d'échantillons riches en composés phénoliques tels que le thé vert, les jus de fruits, les pépins et pulpes de raisins (Yi-Zhong et *al.*, 2006 ; Hatzidimitriou et *al.*, 2007).

Le DPPH[•] est un radical libre stable qui a une absorption maximale à 515 nm, il perd cette absorption lorsqu'il est réduit par les antioxydants (Fukumoto et *al.*, 2000). La couleur pourpre de la solution de DPPH fraîchement préparée vire au jaune lorsqu'un composé antioxydant est présent dans la solution d'essai, et qui a réduit ce radical; la molécule antioxydante lui fournit un atome d'hydrogène ou lui donne un électron. En effet, dans cette étude, la solution de DPPH a changé de couleur lorsque les extraits de *S. platensis* ont été ajoutés (Sudha et *al.*, 2011).

Le résultat de ce présent travail a révélé que l'extrait éthanolique de *S. platensis* a enregistré une valeur d'IC₅₀ de 1823 µg/mL, ce qui reflète une activité antioxydante modérée comparativement aux résultats trouvée dans la littérature (Shalaby et Shanab, 2013; Bryant, 1979; Miranda, 1998; Shalaby, 2010), mais qui s'avère plus importante comparativement à celle trouvée par Sudha et *al.* (2011) dont l'IC₅₀ est de 14443 µg/mL.

Selon Bryant (1979), Miranda (1998) et Shalaby (2010) l'extrait aqueux de *S.platensis* a enregistré une activité antiradicalaire importante qui peut être due principalement à sa richesse en phycobiliprotéines (8,23 mg/g) qui sont de puissants antioxydants. En outre, Bondet et *al.*, (1997) ont montré que la plupart des antioxydants phénoliques réagissent lentement avec le DPPH, atteignant un état stable en 1 à 6 h ou plus. Ils suggèrent que l'activité antioxydante utilisant le DPPH devrait être évaluée au fil du temps. En outre, les interférences de couleur de DPPH[•] avec les échantillons contenant des anthocyanes conduisent à une sous-estimation de l'activité antioxydante (Arnao, 2000). D'autre part, d'après Brand-Williams (1995) les réactions antioxydantes avec les radicaux libres sont ralenties dans les milieux alcooliques (Brand-Williams, 1995).

Aussi, Shalaby et *al.* (2010) ont démontré que les extraits polaires (éthanol et l'eau) ont montré des activités antioxydantes plus élevées que les extraits non polaires; qui ont été doublées avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. L'extrait d'algues éthanolique (100 µg/mL à 0,08 M de NaCl a présenté l'activité antioxydante la plus élevée (85,0 %). L'activité antioxydante avec DPPH (85%) et ABTS (89%) tel que rapporté par Shalaby et *al.* (2013) a corrélé avec des pigments de phycobiline et des composés phénoliques.

En outre, la Spiruline contient un ensemble de pigments tels que les carotènes, et phytopigments de xanthophylle, qui, avec la phycocyanine, semblent être liés à son activité antioxydante (Piero et *al.*, 1998). De plus, sachant que *Spirulina platensis* possède un pH acide, il est à noter, que le DPPH est sensible à ce pH (Ou et *al.*, 2002) ; ce qui peut affecter les résultats obtenus.

Le test au DPPH[•] n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH[•] et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH[•] à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'antioxydant.

La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Des effets synergiques mais aussi antagonistes ont été observés dans des solutions modèles qui contiennent plusieurs composés fonctionnels à activité anti-radicalaire. Néanmoins, ces observations sont basées sur une simple estimation des activités des composés (Saykova, 2009).

IV.3.2. Test au phosphomolybdate

Dans le test au phosphomolybdate, le résultat d'IC₅₀ enregistré est de 315,75 ±93,25 µg/mL. Nous avons constaté que les absorbances sont proportionnelles aux concentrations utilisées (annexe III.2). Cette allure est également observée par Cepoi et *al.* (2009) en déterminant l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique à 55% de *S. platensis* par la méthode au phosphomolybdate. Cependant, une éventuelle comparaison n'est pas possible du fait que ces auteurs ont exprimé leurs résultats en mg d'acide ascorbique/g de substance active.

Le résultat trouvé dans ce présent travail dans le test au phosphomolybdate paraît relativement modérée, ceci peut être expliqué par la concentration d'éthanol utilisé pour l'extraction. Selon Cepoi et *al.* (2009), l'éthanol facilite l'extraction à la fois des composants hydrosolubles et lipidiques de la biomasse de *S. platensis*. Toutefois, l'activité antioxydante totale (AAT) varie suivant sa concentration. Ils ont noté que la biomasse de la Spiruline contient une quantité considérable de pigments tels que les caroténoïdes et les tocophérols, qui sont mieux extraits par des concentrations plus élevées. L'AAT des extraits de *Spirulina platensis* augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration en éthanol. D'ailleurs, cette activité est deux fois plus importante en utilisant l'éthanol 70% que celui à 10% comme solvant d'extraction.

En comparant les résultats de ce travail à ceux trouvés dans les publications, il s'avère, qu'ils peuvent être différents d'un auteur à un autre, selon les protocoles et conditions expérimentales, le solvant utilisé, sa concentration, son pH, la nature du standard utilisé, la méthode d'expression des résultats, les conditions du travail, la nature de l'échantillon étudié (à l'état frais ou sous forme sèche,...), les conditions de culture de *Spirulina platensis*, la nature du milieu de culture utilisé (exp milieu Zarrouk), la composition et la concentration du milieu de culture (NaNO₃, phénylalanine, ...), le pH, la température, la pression, la teneur en CO₂, l'intensité lumineuse (photosynthèse), les saisons, la situation géographique, les conditions climatiques et environnementaux (métaux lourds, ionisation, ...), etc.

V. Caractérisation des margarines formulées

V.1. Analyses physico-chimiques

Des analyses physico-chimiques sont nécessaires afin de caractériser les margarines. Pour cela, nous avons procédé à différents tests de caractérisation de la margarine témoin « Fleurial 500g » additionnée de α tocophérol à 100 ppm et de nos échantillons de margarines formulées additionnées de l'extrait de *Spirulina* à (50, 100, 150 ppm), les résultats sont présentés dans le tableau (VIII).

Tableau VIII : Résultats des analyses physico-chimiques des margarines incorporées de *Spirulina platensis*

Echantillon		Sp.50 ppm	Sp.100 ppm	Sp.150 ppm	Normes	
Analyse						
Teneur en eau (%)		15,30	14,98	15,5	Max 16	Iso 662
Ph		3,7	3,7	3,7	4-5,5	NE 1.2.430 /89
Point de fusion (°C)		37	37	37	33-37	NE 1.2.91 /89
Sel (%)		0,54	0,54	0,55	0,1-0,4	NE 1.2.429 /89
	T°C					
	5	35,7	36,2	35,8		
SFC (%)	10	30,6	30,9	30,6		Normes Confidentielles
	15	23,6	24,1	23,9		
	20	16,5	16,7	16,8		
	25	12	11,9	11,6		
	30	8,2	8,5	8,2		
	35	5,3	5,2	5,3		
	40	3,2	3,3	3,4		

Les caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées montrées dans le (tableau VIII), indiquent que la teneur en solide et en eau correspondent aux critères fixés en

amont de leur fabrication, critères de type de margarine à tartinée « Fleurial 500 g ». Les margarines élaborées sont plastiques et faciles à tartiner.

Le point de fusion moyen obtenu est de 37°C, correspond à celui choisi pour la recette, de manière à ce que la margarine soit fondante dans la bouche mais aussi plastique à température ambiante pour supporter le travail mécanique lors de la tartinabilité.

Selon les résultats obtenus, ils s'avèrent qu'ils sont conformes aux normes; toutefois, nous remarquons une légère baisse de pH qui est de 3,7, qui peut être due au pH acide de la Spiruline. Il y a lieu de remarquer aussi, qu'il y a une légère augmentation en sel dans la margarine élaborée (0,54-0,55%), et cela peut s'expliquer par la richesse de la Spiruline en chlorure de sodium qui est de 37,1g /Kg (Rakotozandiny et al., 2000).

La bonne conservation de la Spiruline séchée, est favorisée par son taux d'humidité faible, son pH acide et sa teneur élevée en NaCl; ce qui lui permet d'être conservé pendant une année (Rakotozandiny et al., 2000). En somme, ces résultats sont directement liés aux caractères intrinsèques de cette biomasse biologique, qui, toutefois pourra jouer un rôle important dans la stabilité microbiologique de la margarine élaborée.

V.2.Analyse physique et spectrophotomique

V.2.1.Test de Shaal

La stabilité oxydative de la margarine est évaluée par le test de Schaal (méthode à l'étuve) (Anwar *et al.*, 2006). Ce test rend compte de l'altération des corps gras par oxydation, inconvénient majeur touchant essentiellement les acides gras insaturés (AGI) (Karleskind, 1992).

La variation de l'indice de peroxyde en fonction de la durée de stockage (un mois) obtenue par le test de Schaal à l'étuve à 30°C, est illustrée par la figure 8.

D'après les courbes obtenues, à T= 0 semaine, l'indice de peroxyde de la margarine témoin « Fleurial 500 g » est de 0,29 meq O₂/kg de corps gras, une teneur similaire à celles des margarines incorporées de Spiruline à 50 , 100 et 150 ppm, qui sont respectivement de 0,29, 0,33 et 0,39 meq O₂/kg. Aucune différence significative entre les 4 échantillons n'est constatée, ce qui reflète une bonne stabilité oxydative des échantillons.

A T= 1 semaine, l'indice de peroxyde indique une légère augmentation à 0,83 meq O₂/kg de corps gras pour la margarine témoin « Fleurial 500 g », qui peut être du à un début d'oxydation primaire. Cette valeur est légèrement élevée comparée à celles des margarines incorporées de Spiruline à 50, 100 et 150 ppm, ces dernières sont très rapprochées et sont respectivement de 0,42, 0,48 et 0,42 meq O₂/kg; cela indique une certaine stabilité des margarines élaborées. D'après Nadeem et *al.* (2015), l'inhibition de processus d'auto-oxydation peut être attribuée à différentes classes de composés phénoliques.

A T= 2 semaines, on observe une montée importante et rapide de la courbe, ce qui se traduit par une augmentation de l'indice de peroxyde, qui peut s'expliquer par une oxydation primaire au cours de laquelle il y a formation des diènes conjugués, qui se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical des acides gras polyinsaturés.

Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires de l'oxydation des lipides sans odeur spécifique. La valeur de l'indice de peroxyde de la margarine témoin a presque doublée comparée à celles des margarines incorporées de Spiruline à différentes concentrations, qui à leur tour, commencent aussi à augmenter en parallèle et qui sont similaires (1,21, 1,30 et 1,40 meq O₂/kg).

A T= 3 semaines, l'indice de peroxyde a atteint son seuil limite d'altération (2,25 meq O₂/kg) pour la margarine témoin, une valeur qui est nettement supérieure comparée à celles des margarines incorporées de Spiruline à 50, 100 et 150 ppm, des valeurs qui se rapprochent et qui sont respectivement de 1,33, 1,52 et 1,52 meq O₂/kg, ce qui signifie que la peroxydation primaire est relativement constante et continue très lentement.

A T = 4 semaines ; une diminution de la teneur de l'indice de peroxyde a été observée (1,86 meq O₂/kg) pour la margarine témoin, cela peut s'expliquer par l'apparition d'une peroxydation secondaire qui se traduit par une décomposition des peroxydes sous l'effet de la température en aldéhydes, cétones, acides et alcools (Nadeem et *al.*, 2015), induisant à une margarine d'une odeur désagréable.

Malgré la réduction de cette valeur, elle reste légèrement élevée comparée à celles des margarines incorporées de Spiruline à différentes concentrations, qui sont toujours presque similaires et qui sont respectivement de 1,35 ; 1,36 et 1,55 meq O₂/kg. Cependant, elles sont relativement constantes au cours de chaque semaine, et qui continuent à augmenter lentement de façon constante, ce qui permet la prolongation de la phase primaire.

En somme, il est à signaler que les valeurs de l'indice de peroxyde des trois margarines incorporées sont à chaque fois similaires, durant chaque semaine tout au long de la durée (un mois) d'incubation à 30°C; ce qui signifie que l'indice de peroxyde est presque le même quelque soit la concentration (50, 100 et 150 ppm), cela a permis de démontrer qu'il est largement suffisant d'utiliser seulement une concentration à 50 ppm pour assurer une activité antioxydante et protéger ainsi la margarine contre l'oxydation lipidique. D'après ces résultats, on a pu déterminer que la Spiruline utilisée comme agent antioxydant naturel donne de meilleurs résultats à une plus faible concentration (50 ppm) en Spiruline, comparé à un agent antioxydant de synthèse « α tocophérol à 100 ppm ».

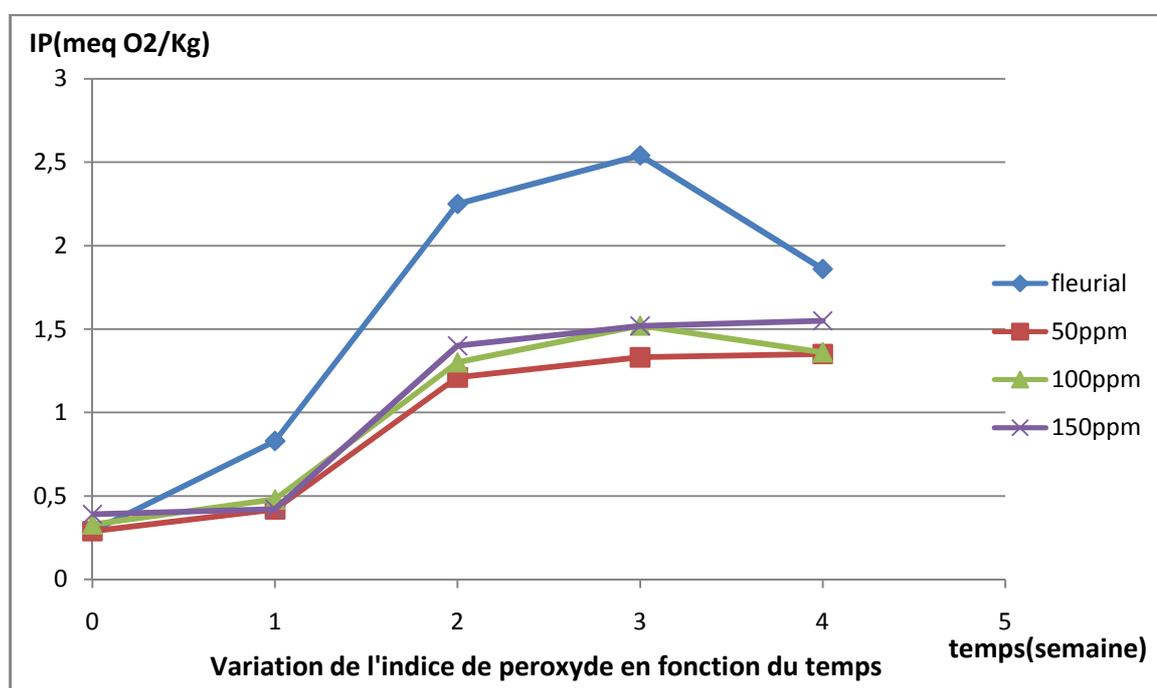


Figure 7 : Courbes représentant la variation de l'indice de peroxyde en fonction du temps (test de Shaal).

Conclusion

Ce travail est basé sur l'étude de l'efficacité en tant qu'antioxydant naturel de l'extrait de Spiruline incorporé dans la margarine. L'essai de la formulation des margarines de table additionnées de l'extrait de *Spirulina platensis* a été expérimenté en vue de substituer l'antioxydant de synthèse (α -tocophérol) utilisé par le complexe agroalimentaire Cévital de Béjaia. Les indices de caractérisation des margarines élaborées (point de fusion, teneur en eau, teneur en solides, pH et teneur en sel) s'avèrent conformes à la recette préétablie.

L'incorporation de l'extrait aux margarines formulées est précédée d'une extraction hydroalcoolique (éthanol 50%), de dosage de différents antioxydants et de l'évaluation de l'activité antioxydante. Un rendement d'extraction intéressant a été trouvé avec un pourcentage de 14,5. Le test au radical DPPH[•] et le test au phosphomolybdate ont montré une activité antioxydante relativement modérée, toute fois, il ne faudra pas sous-estimé son effet antioxydant, vu que divers tests de dosage ont déterminé la présence de substances antioxydantes telles que les composés phénoliques totaux ($2,4 \pm 0,1$ mg équivalent d'acide gallique/ g MS), les flavonoïdes ($1,1 \pm 0,1$ mg équivalent quercetine / g MS), les tanins ($1,3 \pm 0,1$ mg équivalent d'acide tannique/ g MS) et les caroténoïdes ($0,8 \pm 0,1$ mg équivalent de β -carotène / g MS) confirmant ainsi son rôle important en tant qu'une bonne source d'antioxydants. Cependant, les résultats de l'évaluation de la stabilité oxydative déterminés par le test de Shaal a indiqué que les margarines élaborées sont plus résistantes vis-à-vis de l'oxydation forcée que celle à l' α -tocohérol d'où son efficacité antioxydante.

L'incorporation de l'extrait de *S.platensis* a permis de déterminer son effet contre l'oxydation lipidique, cela nous a permis de la classer comme un additif naturel de substitution très intéressante, par sa richesse en substances bioactives, de ce fait, elle constitue un agent antioxydant naturel qui donne de meilleurs résultats à une plus faible concentration (50 ppm) que l'agent antioxydant de synthèse « α -tocophérol » à 100 ppm rajouté à la margarine témoin lors de sa fabrication; cela prouve son efficacité contre la détérioration de la matière grasse, et lui permet ainsi d'assurer une bonne stabilité oxydative de la margarine. Les critères cités précédemment, peuvent lui valoir une bonne valeur ajoutée puisqu'elle peut substituer non seulement α -tocophérol, mais aussi, le pigment par sa richesse en β -carotène, en sel, en acide lactique et en sorbate de potassium.

Perspectives :

- ✓ Isolement et purification de la phycocyanine qui est un puissant antioxydant;
- ✓ Réaliser le test de la peroxydation lipidique, le test de blanchiment des caroténoïdes *in vitro* et prévoir des essais *in vivo*;
- ✓ Réaliser des tests d'identification par HPLC ;
- ✓ Evaluer le potentiel antimicrobien des extraits de Spiruline;
- ✓ Extraction, purification et exploitation des substances d'intérêts dans différentes applications agroalimentaire, pharmaceutique, thérapeutique et cosmétique,...); tels que les pigments (chlorophylle a, β -carotène, phycocyanine), les exopolysaccharides (EPS), les oligoéléments, les vitamines en particulier B₁₂, les acides aminés, les acides gras essentiels (ω 6, ω 3), protéines, lipides et polysaccharides, etc;
- ✓ Enrichissement d'autres produits alimentaires afin d'augmenter leur stabilité oxydative, valeur énergétique, nutritionnelle, organoleptique et hygiénique, tels que les huiles;
- ✓ Élaboration de nouveaux produits diététique et à caractère probiotique (margarine diététique, etc.);
- ✓ Isoler et purifier les substances d'intérêt et leur valorisation à des fins scientifiques, cliniques et thérapeutiques afin de remédier aux problèmes de déséquilibre alimentaire, malnutrition et carences pour prévenir et pallier aux problèmes de cholestérol, d'anémie, de diabète, des maladies cardiovasculaires... ;
- ✓ Son introduction dans les programmes écologiques, concernant la dépollution des Oueds comme Oued Soummam et le port de Béjaïa, ainsi que l'assainissement des déchets rejetés par les industriels et même ménagères.

Références bibliographiques

Références bibliographiques



- ✚ **Arnao M B. (2000).** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 419-421.
- ✚ **Ambrosi Ma, Reinhr Co, Bertolin Te, et al. (2008).** Propriétés de santé De Spirulina spp. *Rev Cienc Farma Basica Apl*; 29: 109-17.
- ✚ **Audigie Cl, Dupont G. et Zouszain F. (1984).** Principes des méthodes d'analyse biochimiques. Tome 1. Ed. Doin. PP : 136-155.
- ✚ **Anonyme (2013).** Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. Vol. 42(5), September 2013, pp. 556-564 <https://www.researchgate.net/publication/287536387>.
- ✚ **Anonyme (2017).** Manuel d'entreprise (Cévitel).
- ✚ **Anonyme (2016).** Manuel de culture artisanale de spiruline j.p. jourdan p.1. (révision 21 octobre 2016).
- ✚ **Achat Sabiha (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec les ions métalliques. Thèse doctorat en sciences filière : biologie option : sciences alimentaires faculté des sciences de la nature et de la vie.
- ✚ **Anonyme. (1990).** Arrêté du 19 novembre 1990 relatif à l'emploi de divers additifs dans des corps gras alimentaires. journal officiel français.
- ✚ **Anonyme. (1988).** l'article 1er du décret n° 88-1205 du 30 décembre 1988.
- ✚ **Anwar F, Jamil A, Iqbal M. (2006).** Microwave roasting effects on the physiochemical composition and oxidative stability of sunflower seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 777-784.
- ✚ **Audrey Manet. (2016).** La spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'usage. *Sciences pharmaceutiques*. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01346709> .Submitted on 19 Jul 2016.



- ✚ **Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluates antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28:25–30.
- ✚ **Becker Ew. (1994).** *Microalgas: biotechnologie et microbiologie*; La presse de l'Universite de Cambridge:Cambridge, Royaume-Uni.
- ✚ **Belay A, Kato T, Ota Y. (1997).** Spirulina (Arthospira): potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology* 18, 303–311.
- ✚ **Blois M S. (1958).** Antioxidant determination by the use of stable free radicals. *Nature*. 26,1199–1200.
- ✚ **Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- ✚ **Bondet V, Brand-Williams W, Berset C (1997).** Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 30, 609-615.
- ✚ **Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25-30.
- ✚ **Bolanho B C M B, Egea A L M, Jacome I, Campos J C M, Carvalho De et Danesi E D G. (2014).** Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. *J. Food Nutr.Res.*, 53: 171-179.
- ✚ **Benarous K. (2006).** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase. Thèse Ingénieur d'état en génie biologique. Université Amar Telidji Laghouat, Algérie.
- ✚ **Bensehaila Sarra. (2016).** Etude des antidiabétiques associatif. Thèse *doctorat lmd en sciences des aliments* faculté des sciences département de biologie sciences alimentaire et nutrition mémoire. Université hassiba ben bouali chlef.p67.
- ✚ **Brien O R.D. (2009).** *Fats and oils: formulating and processing for applications*. ed: crc press, crc press, taylor & francis group, boca raton london new York, 744p.



- ✚ **Chipault JR. (1962).** Autoxidation and antioxidants. Antioxidants for food use. In Lundberg WO. (eds), New York : Wiley, p.477-542.
- ✚ **Chikhouné Anis. (2011).** Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires Option : Technologies Alimentaires. Texture I.N.A.T.A.A. Constantine.
- ✚ **Chu Wl, Lin Yw, Radhakrishnan Ak, et al., (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complement Altern Med*; 10: 53-60.
- ✚ **Charpy L, Langlade M J, Alliod R. (2008).** La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique. Institut de Recherche pour le Développement. Marseille. Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. 49 p.
- ✚ **Chamorro G, Salazar M, Favila Martinez E, Madrigal E, et al. (1996).** Toxicité subchronique étudiée chez des souris nourries de *Spirulina maxima*. *Pharmacologie y toxicologie del alga spirulina. Journal ethnopharmacol* 1998;62: 235-241.
- ✚ **Cheftel J-C, et Cheftel H. (1977).** Les principaux systèmes biochimiques alimentaires- comportement au cours des traitements. In « Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments ». Tec et Doc-Lavoisier, Paris, ISBN : 2-85206-827-3. 254-264.
- ✚ **Collado, Jalonen M C L, Meriluoto J, et Salminen S. (2006).** Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: *In vitro* adhesion to human intestinal mucus. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 15: 570-575.
- ✚ **Chaveron H. (1999).** Molécules toxiques. Molécules formées au cours des réactions d'oxydation. In : Chaveron H, ed. *Introduction à la toxicologie nutritionnelle*. Londres : Tec Et Doc, p.175–83.
- ✚ **Cooper-Driver G. A. (1998).** Role of Phenolics in Plant Evolution. *Phytochemistry*, 49, 1165-1174.
- ✚ **Colla L M, Furlong E B et Costa J A V. (2007).** Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v 50: p.161-167.

- ✚ **Colla L M, Reinehr C O, Reichert C, Vieira Costa J A. (2007).** Production of biomass and nutraceutical compounds by *spirulina platensis* under diverent temperature and nitrogen regimes. Science direct *laboratory of biochemical engineering, department of chemistry, federal university foundation of rio grande (furg)*, bioresource technology 98 p.1489-1493.
- ✚ **Chapman et Hall (1996).**Goldberg, aliments de design, pharmafood, nutraceuticals londres, j.c. dillon, a.p. phuc, j.p. dubacq, world rev. nutr. régime.1995, 77, 32-46.
- ✚ **Christophe Hug & Denis Von Der Weid (2011).** La spiruline dans la lutte contre la malnutrition.
- ✚ **Cepoi Doaj Liliana, Rudi Ludmila, Miscu Vera, Cojocari Angela, Chiriac Tatiana, Sadovnic Daniela (2009).** Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Institute of Microbiology and Biotechnology of Academy of Sciences of Moldova, Chişinău, Moldova* Corresponding author: *Liliana Cepoi, Institute of Microbiology and Biotehnology*, p. 43-44.



- ✚ **De Gaulejac Saint-Cricq, Provost N, Vivas N. (1999).** Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 425-431. 14.
- ✚ **Dillon J C, Phuc A P, Dubacq J P. (1995).** World Rev. Nutr. Régime., 77, 32-46.



- ✚ **El-Baky Hh, El Baz Fk, El-Baroty GS (2008).** Characterization of nutraceuticalcompounds in blue green alga *Spirulina*. *J Med Plants Res*; 2(10): 292-300.

✚ **Estrada J E, Besc Os P, Villar Del Fresno A M. (2001).** Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56, 497–500.



✚ **Fukumoto L R, Mazza G (2000).** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3597-3604.

✚ **Faur L (1992).** Manuel des corps gras. Ed : Tec et Doc Lavoisier, 938-944.

✚ **François R. (1974).** Margarine. In « Les industries des corps gras ». Tec et Doc-Lavoisier, Paris, 290-291.

✚ **Faur L. (1992).** Transformation des corps gras à des fins alimentaires. In « Manuel des corps gras ». Tec et Doc-Lavoisier, Paris.2 : 938-984. ISBN : 2-85206-662-9.

✚ **Fraiz Ruiz L, Garcia- Ortiez Rodriguez A, Hermonos Fernandez M, Liavero Del Pozo P, Ruano Ayso T, Et Uceda Ojeda M. (1999).** Analista de laboratory de almazara. Comunidad europea. 2eme Ed. pp: 61- 88.

✚ **FEREIDOON SHAHIDI a, YING ZHONG b a. (2 0 1 5).** Measurement of antioxidant activity. Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NL A1B 3X9, Canada b *Corbion, Lenexa, KS 66215, USA* . *Journal of functional foods*:18, P. 757–781.

✚ **Falquet J et Hurni Antenna J.P et al., (2006).** Spiruline aspects nutritionnels technologies novembre 2006, p7.

✚ **Fox R D. (1999).** Spiruline technique, pratique et promesse''. *edisud*, aix-en-provence, p246.



✚ **Girardin C et Schwitzgebel V. (2007).** Diabete de type 2 en pediatrie : diagnostic et prise en charge''. *Rev Med Suisse.*, 3: 1001 - 1006.

- ✚ **Geitler L. (1932).** Cyanophyceae. In : Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz''. Leipzig Germany: Ed. 2. Volume:14: 673-1196,
- ✚ **Groupes Salah N, Miller N J, Paganga G, Tijburg L, Olwell G P, Rice-Evans C A. (1995).** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339-346.
- ✚ **Gross J. (1991).** Pigments in Vegetables Chlorophylls and Carotenoids. *Springer Science +Business Media* New York, 351p.
- ✚ **Gabriela Gutierrez-Salmeán¹, Luis Fabila-Castillo et German Chamorro-Cevallos (2015).** Nutritional and toxicological aspects of *spirulina (arthrospira)*. *laboratorio de investigación integral cardiometabólica. sección de estudios de posgrado e investigación. escuela superior de medicina, instituto politécnico nacional, méxico d.f. departamento de farmacia. escuela nacional de ciencias biológicas, instituto politécnico nacional, méxico d.f. méxico.* 32(1): p34-40.
- ✚ **Gabriela Gutiérrez-Salmeán, Luis Fabila-Castillo Et Germán Chamorro-Cevallos. (2015).** Nutritional and toxicological aspects of *spirulina (arthrospira)* coden nuhoeq s.v.r. 318, P37.
- ✚ **Guillaume Cogne, Bernd Lehmann, Claude-Gilles Dussap, Jean-Bernard Gros. (2002).** uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *spirulina platensis (arthrospira platensis pcc 8005)* under photoautotrophic conditions: culture medium optimization, université' blaise pascal.



- ✚ **Hwang Jh, Lee T, Jeng Kc, et al (2011).** Spirulina prevents memory dysfunction, reduces oxidative stress damage and augments antioxidant activity in senescence-accelerated mice. *J Nutr Vitaminol* ; 57: 186-91.
- ✚ **Hasler CM. (1996).** Les aliments fonctionnels: la perspective occidentale. *NutrRev*; 54 (11): S6-10.

- ✚ **Herrero, M., Martin-Alvarez P.J., Senórans, F.J., Cifuentes, A., Ibañez, E., (2005):** Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, 93: 417–423.
- ✚ **Hua-Bin Li, Ka-Wing Cheng, Chi-Chun Wong, King-Wai Fan, Feng Chen, Yue Jiang, (2007):** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771–776.
- ✚ **Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M., (2000).** Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12: 435-439.
- ✚ **Harborne J B et Williams, C A. (2000).** Advances in Flavonoid Reseach since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- ✚ **Haslam E, et Cai Y. (1994).** Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep.*, 11, 41-66.
- ✚ **Hatzidimitriou Ef, Nenadis N, Tsimidou M Z. (2007).** Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105, 1504-1511.
- ✚ **Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang. (2008).** Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), 67-73.
- ✚ **Halliwell B et Gutteridge JMC. (1989).** Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford : Oxford University Press.
- ✚ **Hamrouni-Sellami I, Rahali F Z, Rebey I B, Bourgou S, Limam F, Et Marzouk B. (2013).** Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L. plants as affected by different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 806–817.
- ✚ **Hanaa H, Abd El-Baky, Farouk K, El Baz1 Et Gamal S. (2009).** Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* to ward hepatotoxicity model El-Baroty21Plant Biochemistry. Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt. Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 3(4). p. 133-139. <http://www.academicjournals.org/ajpp>

- ✚ **Helene Cruchot (2008).** spirulina platensis et ses constituants, intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. université henri poincaré - nancy 1.faculte de pharmacie. p : 5 ; 175.
- ✚ **Himed L et Barkat M. (2012).** Elaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de citrus limon. Laboratoire de biotechnologie et qualité des aliments (bioqual), département de biotechnologie alimentaire, inataa, université constantine 1, Constantine, p67.



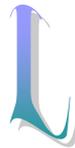
- ✚ **Ibrahim N A, Aboke C, Benarou A., Dolez M, Guillet K, Jamet E, Moreau A, Moutouvirin A. (2007).** Structured triacylglycerol of palm-based margarine fatf by enzymatic interestérification. biocentrum-dtu technical university of Denmark, 105p



- ✚ **Jean-Paul Jourdan. (1999).** Cultivez votre spiruline revue, Antenna Technology, p .125.
- ✚ **Jean Louis Vidalo. (2008).** Spiruline l'algue bleue de santé et de prévention, Editions du Dauphin, 3 eme édition mise à jour, Spiruline H.T.P.A (à haute teneur en principes actifs) (Institut Hippocampe –Genève), p. 75-76-77.
- ✚ **Jean Graille Coordonnateur. (2003).** Lipides et corps gras alimentaires.Collection sciences & techniques agroalimentaires. Edition TEC & DOC. Lavoisier P. 52-53.
- ✚ **Jean Marie Razafindrajaona, Jean De Neupomucene, Rakotozandriny,Raphael Rakotozandrindrainy, Jose Narcisse Randria, Kotonirina Daniel Ramampihrika.(2008).** Etude de la valeur nutritionnelle de la Spiruline de Madagascar(Spirulina Platensis Var.Toliara).
- ✚ **Jean-Louis Vidalo. (2008).** spiruline l'algue bleue de santé et de prévention. P23.



- ✚ **Kay R A. (1991).** Microalgues comme nourriture et supplément. *Crit. Rev. Food Sci.*, 30, p. 555-573. *Spirulina platensis*.
- ✚ **Khachik F. (2009).** Analysis of Carotenoids in Nutritional Studies. *In: Britton G. et Liaaen-Jensen S. Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health. Birkhäuser Verlag*, pp: 07-43.
- ✚ **Kosar In M, Dorman M J D, Bachmayer O, K H C Baser And Hiltuten R. (2003).** Method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of lamiacea plants, *chemistry of natural compounds*, v 39, 2 p.161 –166.



- ✚ **Le Moel G, Saverot-Dauvergne A, Gousson T. (1998).** *Le statut vitaminique*. France : Editions Médicales Internationales, p. 550.
- ✚ **Legard E. (2005).** Force: entrainement & musculation''. *Editions Amphora*, 194p. France.
- ✚ **Lavoisier et Jean Graille Coordonnateur (2003).** Lipides et corps gras alimentaires. Collection sciences & techniques agroalimentaires. Edition TEC & DOC. P 52.
- ✚ **Lapornic B, Prosek M, Wondra A G, Liyana-Pathirana, Shahidi, et al., (2005).** Comparaison of extracts prepared from plant by products using different solvents and extraction time. *Journal of food Engineering*. 71: 214-222.
- ✚ **Ludmila Machu , Ladislava Misurcova , Jarmila Vavra Ambrozova, Jana Orsavova, Jiri Mlcek, Jiri Sochor Et Tunde Jurikova. (2015).** Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. Department of Food Analysis and Chemistry, Faculty of Technology, P112. www.mdpi.com/journal/molecules.
- ✚ **Lauron F. (2008).** « Les lipides ». Chapitre 3 pp : 25. [www.lpasteur.org/spip.php article 673](http://www.lpasteur.org/spip.php?article=673).

- ✚ **Lin-Chun Mao, Xin Pan, Fei Que, Xue-Hua Fang, (2006).** Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222: 236-241.
- 
- ✚ **Majer, P, Neugart S, Krumbein A, Schreiner M, Et Hideg É. (2014).** Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environmental and Experimental Botany*, 100, p. 1–9.
- ✚ **Merdan Ngattai-Lam. (2009).** Etude des projets d'investissement en Afrique Centrale : 24 études de cas''. *Editions L'Harmattan*, 267p. Paris.
- ✚ **Muhling M, Harris N., Belay A. And Whitton Ba. (2003).** "Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*". *Journal of Phycology*. 39: 360-367.
- ✚ **Michel Julien. (2012).** Classification et influences des polyphénols du bois de chêne sur la qualité sensorielle des vins , (Application du procédé Oakscan®).
- ✚ **Mohammedi Z, Et Atik F. (2011).** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter. J. Pharma. Bio. Sci.* Vol. 2. pp. 609-615.
- ✚ **Mircea Oroian A, Isabel Escriche B A, Suceava, Romania B. (2015).** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Faculty of Food Engineering, Stefan cel Mare University of Institute of Food Engineering for Development (IUIAD), *Food Research International* V,74 P.10–36.
- ✚ **Merlin J C, Noel P, Lafaoe-Szidlowski N, Petit-Cossi G, Wallart F. (1985).** Dosage des caroténoïdes de la macrofaune benthique par spectrométrie raman de résonance - comparaison avec les dosages par spectrométrie d'absorption visible. La baie de seine (grèce manche) - université de caen, 24-26 avril, ifremer. actes de colloques n. 4 1986, pages 397 à 402.
- ✚ **Mostafa Mahmoud Sami Ismaïla B, Yassin Mahmoud El-Ayouty, Michele Piercey-Normorea. (2016).** Environmental microbiology role of pH on antioxidants production by *spirulina (arthrospira) platensis*. *Department of biological sciences, faculty of science, university of manitoba, winnipeg, manitoba, canada b botany*

department, faculty of science, zagazig university, zagazig, egypta. Brazilian journal of microbiology, vol: 47 p.298–304.

✚ **Mona Hetta, Rehab Mahmoud, Waled El-Senousy, Mohamed Ibrahim, Gamila El-Taweel, Gamila Ali. (2014).** Antiviral and antimicrobial activities of spirulina platensis. world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences sjif impact factor 2.786 volume 3, issue 6, 31-39.

✚ **Mouritsen G. (2015).** Algues marines, p 38.

✚ **Miguel Herrero A, Pedro J. Marti´N-A´ Lvarez A, F. Javier Sen´Ora´Ns B, Alejandro Cifuentes A, Elena Iba´N´Ez A (2004).** Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from spirulina platensis microalga, food chemistry 93 (2005) 417–423.

✚ **Marc F, Davin A, Deglene Benbrahim L, Ferrand C, Baccaunaud M Et Fritsch P (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food Med Sci (Paris20 : 458–463. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004204458>.

✚ **Magalhães L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, José L.F.C., (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta, 613: 1-19.



✚ **Nathalie Boizot, et Jean-Paul Charpentier. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, noel@orleans.inra.fr ; charpentier@orleans.inra.fr.

- ✚ **Nathalie Boizot, et Jean-Paul Charpentier. (2011).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'Inra Cultivez votre spiruline », manuel de culture artisanale, p.104.



- ✚ **Oleivira E G, Rosa G S, Moraes M A, Pinto L A A. (2009).** Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*'. *Braz. J. Chem. Eng.*, 26, 1: 189 – 197.
- ✚ **Olle M. (2002).** Analyse des corps gras. Dans : Techniques de l'ingénieur, traité de Génie des procédés. P 3 325 – 2.
- ✚ **Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer E K. (2002).** Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3122-3128.
- ✚ **Oroian M, Escriche I. (2015).** Food Research International 74 10–36.



- ✚ **Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analyt Biochem* 269:337-341.
- ✚ **Pardo J E, Cuesta M A Et Alavarruiz A. (2007).** Evaluation of potential and real quality of virgin olive from the designation of origin « Aceite Camp de Montiel » (Ciudad Real, Spain). *Food chemistry* 100. pp: 977-984.
- ✚ **Poirier M Et Ranga P. (2008).** Le beurre et la margarine : rapport de rhéologie. école supérieure de microbiologie et sécurité alimentaire de brest (esmisab), université de Bretagne occidentale.
- ✚ **Pierlovisi C. (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).

- ✚ **Pradeep P. M, Et Sreerama, Y. N. (2015).** Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. *Food Chemistry*, 169, 455–463.
- ✚ **Penchev P I (2010).** *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.* Thèse l'obtention du doctorat de l'université de toulouse.
- ✚ **Popovici Cristina, Saykova I Ionka, Tylkowski Bartek. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Université technique de Moldova, Kisinew, Moldavie Université de technologie chimique et de métallurgie, Sofia, Bulgarie; Université de technologie chimique *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
- ✚ **Pokorny, J., (2007):** Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109: 629-642.
- ✚ **Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., (2008):** In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19: 31-39.



- ✚ **Quideau S, Feldman K S. (1996).** Ellagitannin chemistry. *Chem. Rev.*, 96, 475-503.
- ✚ **Quideau S, Jourdes M, Lefeuvre D, Pardon P, Saucie C, Teissedre P L Glories, Ellagitannins Y. (2010).** An underestimated class of bioactive plant polyphenols: chemical reactivity of C-glucosidic ellagitannins in relation to wine chemistry and biological activity. Eds. Blackwell Publishing Ltd: Singapore; Vol. 2, pp 81-137.



- ✚ **Ribereau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris, p. 254.

- ✚ **Rice-evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383., 7.

- ✚ **Rohani Binti M. Z. (2006).** Process design in degumming and bleaching of palm oil. Center of lipids engineering and applied research. P: 9-45.

- ✚ **Rodriguez-Garcia, I., Guil-Guerrero, J.L., (2008):** Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*, 108: 1023-1026.



- ✚ **Shahidi F. Et Naczk M. (2006).** Phenolics in Food and Nutraceuticals. *Taylor & Francis e-Library CRC Press LLC*, Florida, 566p.

- ✚ **Sova M. (2012).** Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), p.749–767.

- ✚ **Sripad G, Prakash V, Et Narasinga Rao M S. (1982).** Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *J. Biosci.* Vol. 4.p. 145-152.

- ✚ **Spencer J. P, Abd El Mohsen M. M, Minihane A. M, Et Mathers J. C. (2008).** Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 1, p.12–22.

- ✚ **Stevenson D. E, Et Hurst, R. D. (2007).** Polyphenolic phytochemicals—Just antioxidants or much more? *Cellular & Molecular Life Sciences*, 64, 2900–2916.

- ✚ **Sroka. (2006).** The screening analysis of antiradical activity of some plant extracts.

- ✚ **Singleton VI, Rossi Ja. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16, p.144-158.

- ✚ **Shalaby E A, et Shanab S M M, Singh V. (2010).** Salt stress enhancement of antioxidant and antiviral efficiency of *spirulina platensis*. *Journal of medicinal plants research* vol. 4(24), p. 2622-2632. <http://www.academicjournals.org/jmpr>.

- ✚ **Shalaby et Shanab Sanaa M M. (2011).** Comparison of dpph and abts assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *spirulina platensis*

emad a. biochemistry department, faculty of agriculture, cairo university, giza, egypt.12613 p562.

- ✚ **Sguera S. (2008).** interets nutritionnels et activites therapeutiques *spirulina platensis* et ses constituants .thèse de docteur en pharmacie universite henri poincare - nancy 1, p.179.
- ✚ **Sudha Ss, Karthic R, J. Rengaramanujam et Athulya (2011).** Antimicrobial activity of spirulina platensis and aphanothece sp. on selected clinical bacterial isolates and its antioxidant activity. p93.
- ✚ **Saunders W (1966).** Cultural ecology of nuclear mesomercica, in john a.graham ed.ancient mesomerica : selected reading, peek publications.
- ✚ **Santoyo, S., Herrero, M., Señorans, F.H., Cifuentes, A., Ibañez, E., Jaime, L., (2006):** Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 224: 75–81.



- ✚ **Tremolieres J, Serville Y, Jacquot R, Et Dupin H. (1970).** Lipides. In « Manuel d'alimentation humaine ; les bases de l'alimentation ». ESF.1.pp ;: 147-148, 152. ISBN: 2-7101-0067-3.
- ✚ **Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommes J. (2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226-1233, 13.



- ✚ **Velderrain-Rodriguez G R, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala J F, Chen C O, Robles-Sanchez M, Et Al. (2014).** Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food & Function*, 5(2), 189–197.
- ✚ **Vautrin D. (2006).** Programme anti-âge: Un guide pratique pour tous ceux qui veulent rester jeunes''. Alpen Editions s.a.m. Italie. P 87.
- ✚ **Vonshak A. (1997).** *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology. Cellbiology and biotechnology.* Taylor & Francis Ltd.



- ✚ **Wolff Jp. (1968).** Manuel d'analyse des corps gras, Paris: Azoulay.



- ✚ **Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Et Harold Corke. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872-2888..., 27.



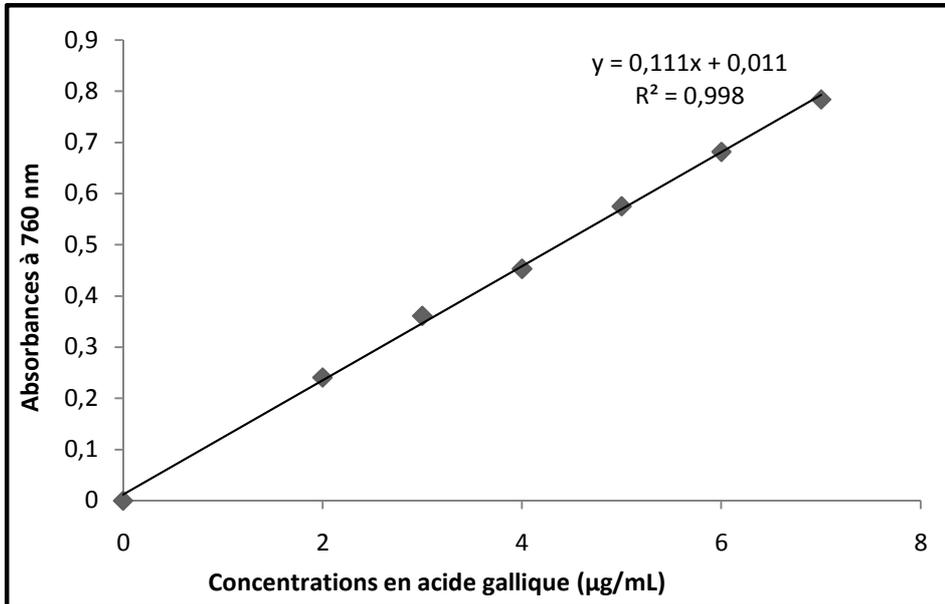
Annexes

Annexe I : Matériel et réactifs

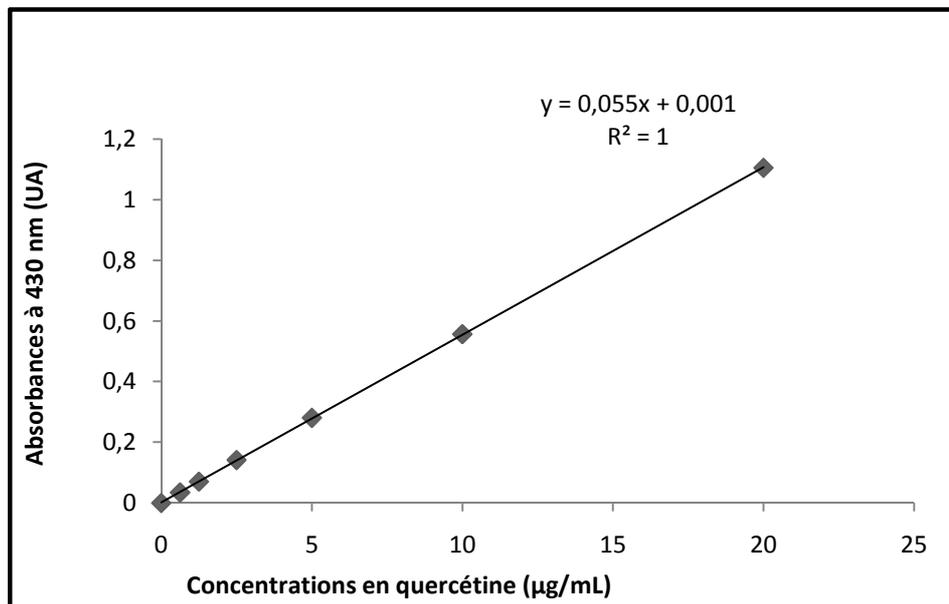
Verrerie	Appareillages	Réactifs et produits chimiques	Autres
Verrerie nécessaire pour analyses physico-chimiques	Agitateur électrique VELP SCIENTIFICA Agitateur mécanique Bain marie (Ika-Heizbad HB-250) Broyeur électrique Balance électrique RADWAG, WPS Vortex TECHTNICA-EV102 Centrifugeuse HETTICH UNIVERSAL 2S Lyophilisateur Etuve ventilée (40°C) Etuves (BINDER et MEMMER) Hote pH-mètre HANNA instrument Spectrophotomètre UV-VIS.SHIMADZU Plaque agitatrice Plaque chauffante (HB 500) Réfrigérateur-congélateur RMN (minispec mq 20, Germany)	Acétone Acide acétique (Sigma Aldrich) Acide lactique BSA Chloroforme (Biochem) Chlorure de sodium NaCl (Prolabo) Chromate de potassium (K ₂ CrO ₄) (indicateur coloré) DPPH Emulsifiant « monodiglycéride » Ethanol (Biochem chemopharma) Empois d'amidon (Sigma Aldrich) Ferrocyane de potassium 1 % (Biochem chemopharma) Hexane Iodure de potassium (KI) (Sigma Aldrich) Monocarbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) (chemminova) Nitrate d'argent (AgNO ₃) à 0,1N Ovalbumine (Biochem chemopharma) Réactif de Folin Ciocalteu (Prolabo) Réactif de molybdate Standards composés phénoliques et caroténoïdes : Acide gallique Acide tannique Quercétine β-carotène Sodium Dodecyl Sulfate de (SDS) (Prolabo) Protéine sérum albumine bovine (BSA) (Biochem chemopharma) Sorbate de potassium Sulfate de sodium anhydre (Na ₂ SO ₄) Tampon acétate pH=4,9 Tampon phosphate pH = 6,6 Thiosulfate de sodium (Na ₂ S ₂ O ₃) à 0,01N (Biochem) Trichlorure d'acétate TCA 10 % (Biochem chemopharma) Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃) (Prolabo) Trichlorure ferrique FeCl ₃ (Prolabo) Tri-éthanolamine (TEA) (Prolabo)	Papier filtre Papier Aluminium Micropipettes Seau en Inox Thermomètre Eau distillée Eau déminéralisée Lait écrémé en poudre Huile de tournesol Huile de palme Huile équivalent de soja hydrogénée Spatule Pince en bois Barquettes en plastique (500 g)

Annexe II : Courbes d'étalonnage

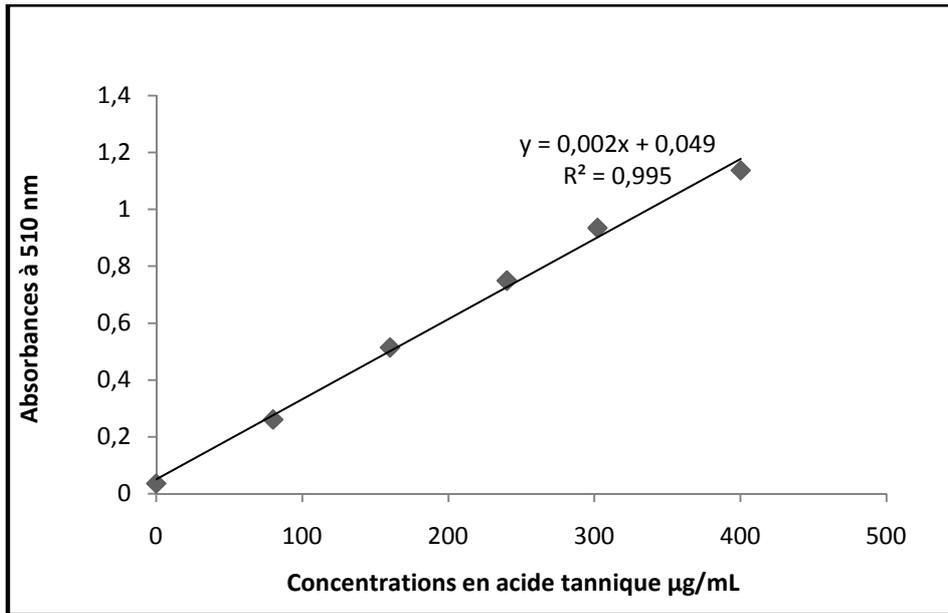
Annexe II.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux



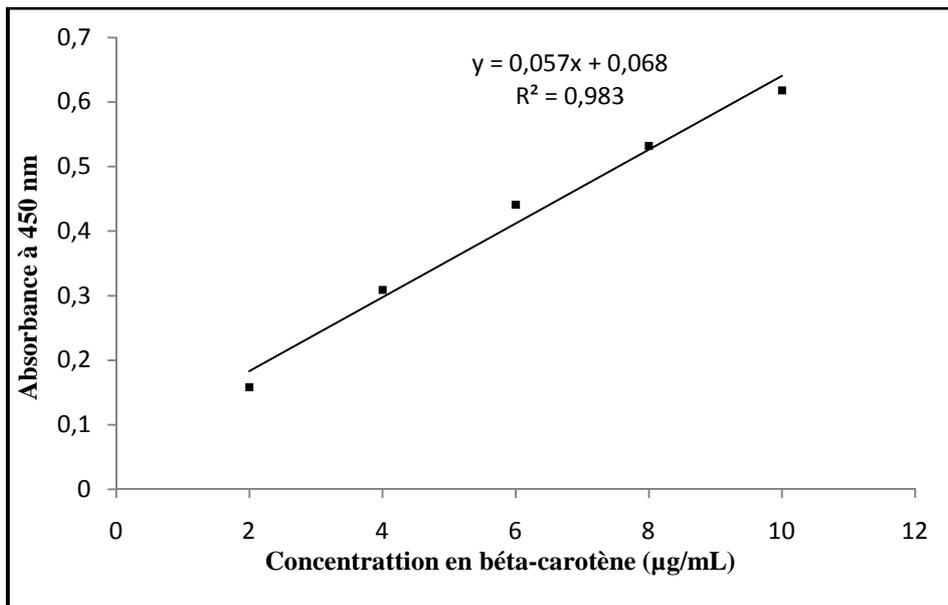
Annexe II.2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes



Annexe II.3 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins

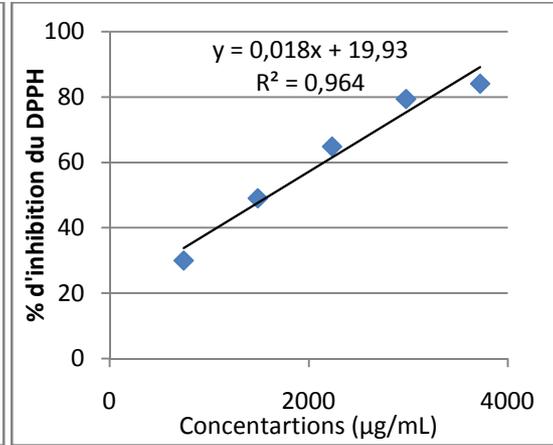
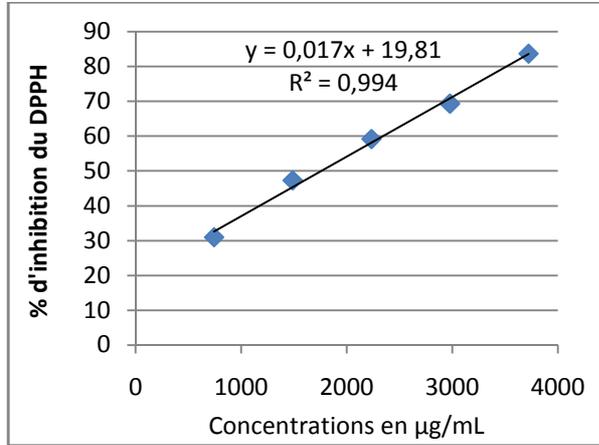


Annexe II.4 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des caroténoïdes

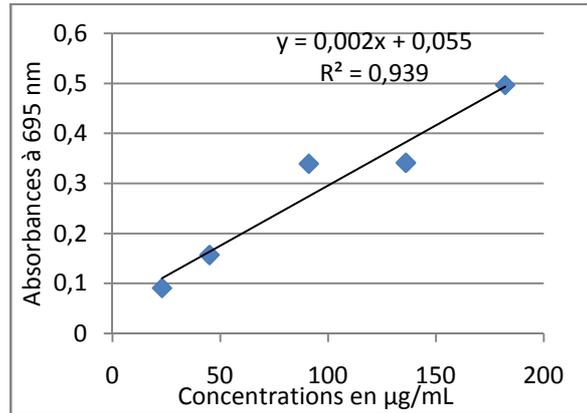
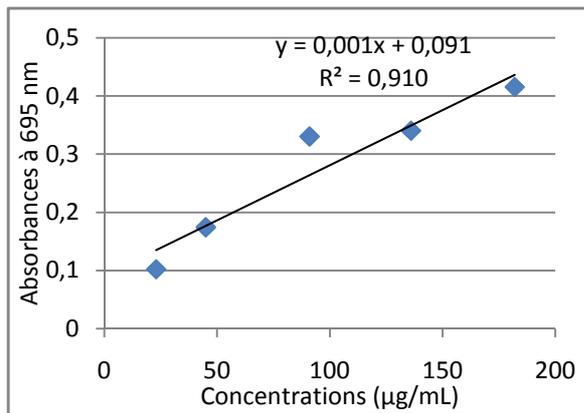


Annexe III : Courbes utilisées pour le calcul d'IC₅₀ dans les tests antioxydants

Annexe III.1 : Courbes utilisées pour le calcul d'IC₅₀ pour l'activité scavenger du radical DPPH par l'extrait *Spirulina platensis*



Annexe III.2 : Courbes utilisées pour le calcul d'IC₅₀ pour le test au phosphomolybdate



Annexe IV : Indice de peroxyde des margarines élaborées et de la margarine témoin

Date et heure à 30°C	Nature de l'échantillon	Indice de peroxyde meq O₂ / kg	Norme
09/05/2017 à 16h : 00	Témoin « Fleurial 500 g » à 100 ppm	0,29	10Max
	Margarine incorporée de Spiruline à 50 ppm	0,29	
	Margarine incorporée de Spiruline à 100 ppm	0,33	
	Margarine incorporée de Spiruline à 150 ppm	0,39	
16/05/2017 à 16h : 00	Témoin « Fleurial 500 g » à 100 ppm	0,83	
	Margarine incorporée de Spiruline à 50 ppm	0,42	
	Margarine incorporée de Spiruline à 100 ppm	0,48	
	Margarine incorporée de Spiruline à 150 ppm	0,42	
23/05/2017 à 16h : 00	Témoin « Fleurial 500 g » à 100 ppm	2,25	
	Margarine incorporée de Spiruline à 50 ppm	1,21	
	Margarine incorporée de Spiruline à 100 ppm	1,30	
	Margarine incorporée de Spiruline à 150 ppm	1,40	
30/05/2017 à 16h : 00	Témoin « Fleurial 500 g » à 100 ppm	2,54	
	Margarine incorporée de Spiruline à 50 ppm	1,33	
	Margarine incorporée de Spiruline à 100 ppm	1,52	
	Margarine incorporée de Spiruline à 150 ppm	1,52	
06/06/2017 à 16h : 00	Témoin « Fleurial 500 g » à 100 ppm	1,86	
	Margarine incorporée de Spiruline à 50 ppm	1,35	
	Margarine incorporée de Spiruline à 100 ppm	1,36	
	Margarine incorporée de Spiruline à 150 ppm	1,55	

Résumé – Ce travail s’est concentré sur l’essai de formulation des margarines de table incorporées d’extrait de *Spirulina platensis* à différentes concentrations (50, 100 et 150 ppm), qui a été expérimentée, en vue de l’exploiter et de substituer un additif synthétique « l’ α tocophérol à 100 ppm » ajouté aux margarines de table « Fleurial 500 g ». Cette cyanobactérie a été extraite par macération hydro-éthanolique (50%, v/v) suivit d’une lyophilisation donnant un rendement intéressant (14,5%). Cet extrait a révélé une activité antioxydante relativement modérée en utilisant deux tests complémentaires; le test au DPPH* qui a enregistré une valeur d’IC₅₀ de 1823,22± 47,34 μ g/mL et le test au phosphomolybdate dont l’IC₅₀ est de 315,75 ±93,25 μ g/mL. Toutefois, le test de Shaal utilisé comme un test d’évaluation de la stabilité oxydative a permis de montrer l’efficacité de cet extrait contre l’oxydation (peroxydation lipidique). Les résultats obtenus, ont montré que les margarines incorporées d’extrait de Spiruline à une plus faible concentration (50 ppm) étaient plus résistantes que la margarine témoin « Fleurial 500 g » additionnée de α -tocophérol à 100 ppm. En outre, les caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées (point de fusion, teneur en solide, teneur en eau) s’avèrent être conformes à la recette préétablie et aux normes en vigueur. Néanmoins, une légère baisse de pH, et une légère augmentation de la teneur en sel ont été décelées, les reliant directement aux caractères intrinsèques de la Spiruline. L’activité antioxydante est en rapport directe avec la présence des composés phénoliques totaux (2,4±0,1mg équivalent acide gallique/g de matière sèche), de tanins (1,3± 0,1 mg équivalent acide tannique/g de matière sèche), de flavonoïdes (1,1± 0,1 mg équivalent quercétine/g de matière sèche) et de caroténoïdes (0,8±0,1 mg équivalent β -carotène/g de matière sèche), ces substances antioxydantes ont été quantifiées par des méthodes colorimétriques.

Mots clés : *Spirulina platensis* / macération hydro-éthanolique / antioxydants / activité antioxydante/ margarine.

Abstract

This study was focused on the formulation of table margarines incorporated with *Spirulina platensis* extract at different concentrations (50, 100 and 150 ppm), which has been tested, in order to exploit it and to substitute a synthetic additive " α -tocophérol at 100 ppm " added to "Fleurial" table margarines. This cyanobacterium was extracted by hydro-ethanolic maceration (50%, v/v), followed by freeze-drying giving an interesting yield (14.5%). This extract revealed a relatively moderate antioxidant activity, using two complementary tests; The DPPH* test which recorded an IC₅₀ value of 1823.22 ± 47.34 μ g/mL and the phosphomolybdate test with an IC₅₀ of 315.75 ± 93.25 μ g /mL. However, the Shaal test used as an oxidative stability evaluation test showed the efficacy of this extract against oxidation (lipid peroxidation). The results obtained showed that the incorporated margarines by *Spirulina* extract at a lower concentration (50 ppm) were more resistant than the control margarine "Fleurial 500 g" that contained α -tocopherol at 100 ppm. In addition, the physicochemical characteristics of the margarines produced (melting point, solid content, water content) prove to be in conformity with the pre-established recipe and the standards in rigors. However, a slight decrease in pH and a slight increase in salt content were detected, linking them directly to the intrinsic characteristics of *Spirulina*. The antioxidant activity is directly related to the presence of total phenolic compounds (2.4 ± 0.1 mg gallic acid equivalent/g dry matter), tannins (1.3 ± 0.1 mg tannic acid equivalent/g dry matter), flavonoids (1.1 ± 0.1 mg quercetin equivalent/g dry matter) and carotenoids (0.8 ± 0.1 mg β -caroten equivalent/g dry matter), these antioxidants were quantified by colorimetric methods.

Key words: *Spirulina platensis* / hydro-ethanolic maceration / antioxidants / antioxidant activity / margarine.