



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République algérienne démocratique et populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة حسيبة بن بوعلي - الشلف -

Université Hassiba Ben Bouali Chlef

كلية العلوم

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Filière Sciences alimentaire et Nutrition Humain

# Thèse

*En vue de l'obtention du diplôme Doctorat LMD en Option :*  
**Sciences des Aliments**

*Thème:*

**Étude de l'effet antimicrobien et  
antidiabétique des probiotiques en  
association avec de la spiruline**

*Présenté par :*

Melle **BENSEHAILA Sarra**

Devant le jury :

Président : Mr. DILMI BOURAS Abdelkader Professeur à UHB, Chlef

Promotrice : Mme. BOUTEKRAÏT Lynda Professeur à Université Blida 1

Co-promotrice : Mme DOUMANDJI Amel Maître conférences A à Université Blida 1

Examinatrice : Mme ALLEM Rachida Professeur à UHB, Chlef

Examineur : Mr. BADIS Abdelmalek Professeur à Université Blida 1

Examineur : Mr. BITAM Arezki Professeur à ENSA El-Harrach

**Année universitaire : 2015/2016**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents, en témoignage de leurs sacrifices et de leurs  
encouragements dans les moments difficiles ;*

*A mes sœurs Asma, Aya et Khouloud et mes frères Abdelhamid et  
Abderraouf*

*A mon mari*

*A toute la famille*

*Sarra*

## ***Remerciements***

*Ce travail a été réalisé au niveau de Laboratoire Central de l'Intendance (LCI) El-Harrach Alger, SAIDAL Media et Laboratoire d'analyse Chettia –Chlef.*

*J'adresse mes remerciement les plus sincères à mon Dieu, tout Puissant de m'avoir donné le courage et la volonté pour mener à terme mon travail*

*Je remercie Pr. BOUTEKRABT Lynda ma directrice de thèse à l'université Blida 1, pour la confiance qu'elle a eu en moi et pour tout les conseils, encouragement et son aide au cours de mon parcours. Merci pour vos conseils et votre disponibilité tout au long de mes expériences.*

*Je remercie Dr. DOUMANDJI Amel, ma co-directrice de thèse à l'université Blida 1, pour son aide, ses conseils, son soutien moral. Merci pour vos conseils. Merci pour tous les efforts que vous avez fait pour moi. Merci pour vos encouragements.*

*Je tiens à remercier :*

*Monsieur le Pr. DILMI BOURAS A. pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de présider le jury d'évaluation et d'examiner cette thèse, vos remarques ne feront que pour perfectionner ce travail. Merci Monsieur pour la qualité des enseignements que vous m'avez assuré le long de mon cursus universitaire et vos encouragements.*

*Madame le Pr. ALLEM R. pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de faire partie du jury pour examiner de cette thèse. Merci Mme pour votre soutien moral et pour vos encouragements dans les moments difficiles.*

*Monsieur BADIS A., Professeur à l'Université de Blida 1 pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner mon manuscrit.*

*Monsieur le Pr. BITAM A. Professeur à l'ENSA El-Harrach pour avoir accepté de participer au jugement de cette thèse.*

*Je remercie infiniment Professeur PELUSO Ilaria chercheur dans "the Council for Agricultural Research and Agricultural Economy Analysis Rome, Latium, Italy", pour le soutien moral et son encouragement et ses conseils dans la rédaction des articles, et ces corrections qu'elle m'a fait.*

*Je remercie Monsieur MANAFIKHI, Université Sapienza de Rome. Italie.*

*Le Colonel DJBAIRIA, le directeur de Laboratoire Central de l'Intendance El-Harrach qui m'a donné l'accès au laboratoire.*

*A Toute l'équipe de Laboratoire Centrale de l'Intendance El-Harrach : Comandant*

*Hamouda, Kapitaine Lydia, Samira, Souad, Naim.*

*Le responsable de la bibliothèque URD*

*A Madame ABADA la Directrice du laboratoire SAIDAL Media*

*A Monsieur CHAABANE le chef de service d'HPLC*

*A Toute l'équipe de laboratoire d'analyse CHETTIA –Chlef*

*Je remercie toute ma famille pour le soutien moral et de l'encouragement chaleureux, en particulier mon grand père baba Hassene, ma grand-mère Yema Saliha, ma tante Safia, mon oncle Hamdane.*

*Un remerciement spécial à ma mère qu'elle était toujours avec moi avec ses Doua, son soutien moral, encouragement dans tous les moments de ma vie.*

*Mon père, merci beaucoup pour tout ce que vous avez fait pour moi, enfin j'ai réalisé votre rêve.*

*Je remercie ma sœur Asma pour son soutien moral, et son encouragement.*

*Je remercie mon mari Ali pour la confiance qu'il a eu en moi, pour tous les conseils qui m'a donné.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont été avec moi durant la période de ma thèse.*

*Sarra*

## Résumé

La présente étude porte sur l'évaluation de la valeur alimentaire et de l'effet antidiabétique d'une cyanobactérie *Spirulina platensis* provenant du sud Algérien, associée ou non à un probiotique.

Les analyses physico-chimiques effectuées sur la spiruline nous ont permis de déduire qu'elle possède un bon apport calorique, soit de 369,28 kcal. Cet apport a pour origine essentiellement les teneurs élevées en protéines 60,32 %, en sucres totaux 17,63 %, en lipides 7,28 %. Le test au DPPH nous a permis de lui conférer une forte activité antioxydante.

Du fait que la spiruline possède des qualités nutritionnelles complètes, incluant une forte activité anti radicalaire, nous avons pensé à l'utiliser comme un moyen de lutte contre l'effet diabétogène de l'alloxane chez les animaux qui se traduit par la destruction des cellules pancréatiques notamment les cellules  $\beta$  en provoquent une hyperglycémie grave appelée diabète expérimental.

Dans une première phase, nous avons investi le rôle des bifidobactéries à rééquilibrer la composition de la flore intestinale, et le rôle primordiale de la spiruline a piéger les radicaux libres libérés dans l'état de stress oxydatif induit par le déséquilibre provoqué par une hyperglycémie.

Puis, nous avons examiné l'activité antidiabétique et préventive d'une pré-culture bifide et de la spiruline, contre les agressions diabétogènes de l'alloxane. Nous avons évalué l'effet de 1, 5 et 10mg/mL de spiruline seul puis combinée avec une bifidobactérie *in vivo* sur des rats Wistar.

Sur la base de l'ensemble des résultats que nous avons obtenu, il semblerait que l'association de la spiruline à raison de 10mg/mL à une bifidobactérie présente une vertu thérapeutique antidiabétique et un fort potentiel antioxydant.

**Mots clés :** *Spirulina platensis*, *Bifidobacterium breve*, activité antioxydante, diabète, rats.

## ***Abstract***

Neutraceuticals and a functional foods-based diet have been suggested as a novel dietary approach for management of type 2 diabetes and its complications. In this context, both *Spirulina platensis* and *Bifidobacterium breve* could have beneficial effects.

The physico- chemical analysis deduce that *Spirulina* has a good caloric intake , or 369.28 kcal , this contribution originates mainly high protein content is of 60.32 % , total sugar , the order of 17.63 % and 7.28 % fat . The DPPH test allows us to forward a strong antioxidant activity.

We aimed to investigate the effect of the association between the *Spirulina platensis* and *Bifidobacterium breve* on glucose level in diabetic rats. *Spirulina platensis* was characterized for macronutrients and minerals. *Spirulina platensis* and/or *Bifidobacterium breve* were administered after the induction of diabetes with alloxan in rats. We confirmed that *Spirulina platensis* is characterized by a high nutritional quality. Both *Bifidobacterium breve* and *Spirulina platensis* decreased glucose levels in diabetic rats.

We observed a synergistic effect of *Bifidobacterium breve* –*Spirulina platensis* on in glucose control in diabetic rats. Despite more studies are needed in order to investigate the mechanisms that account the synergistic effect, our results suggest that the association of *Bifidobacterium breve* –*Spirulina platensis* could be a promising functional food for diabetic patients.

**Keywords:** *Spirulina platensis*, *Bifidobactérium breve*, antioxidant activity, diabete, rats.

## ملخص

تشمل الدراسة على تقييم القيمة الغذائية للسيرولينا و تقييم تأثير الثنائية السبيرولينا و بيفيدوبكتريوم (*Spirulina* – *Bifidobacterium*) على مرض السكري في فئران مصابة بهذا المرض.

قمنا بأجراء تحاليل كيميائية و فيزيوكيميائية على السبيرولين المستعملة و ذلك لمعرفة قيمتها الغذائية .

قمنا أيضا بدراسة تأثير الرابطة بين الثنائية السبيرولين و البيفيدوبكتريوم (*S. platensis* – *Bf. breve*) في جردان مصابة بداء السكري بعد تحريض السكري مع ألوكسان في الفئران و ذلك لمعرفة تأثيرها على تعديل السكري في الفئران المستعملة.

أكدت لنا النتائج أن السبيرولينا (*Spirulina platensis*) أنها تتميز بجودة غذائية عالية, من خلال التحاليل الفيزيائية والكيميائية التي أجريناها على السبيرولينا (*Spirulina platensis*) حيث وجدنا أنها تحتوي على سعرات حرارية جيدة ما يعادل 369.28 كيلو كالوري ، هذه المساهمة تأتي بنسبة عالية من البروتين هو أساسا (60.32 %) ، ومجموع السكر (17.63 %) و (7.28 %) من الدهون ,

وتحصلنا من خلال النتائج أن الثنائية سبيرولينا و بيفيدوبكتريوم (*Spirulina* و *Bifidobacterium breve*) اخفضت مستويات السكر في الفئران المصابة بداء السكري و لاحظنا تأثير متناغم من *Spirulina* – *Bifidobacterium breve* , *platensis* السيطرة على الجلوكوز والقياسات البيوكيميائية ,

### مفتاح البحث :

*Spirulina platensis*، *Bifidobacterium breve* ، النشاط المضادة للأكسدة ، مرض السكري ، الاكسدة ، الفئران .

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Morphologies typiques de la spiruline (Charpy et <i>al.</i> , 2008).....	11
<b>Figure 2:</b> Cycle biologique de la Spiruline (Charpy et <i>al.</i> , 2008).....	12
<b>Figure 3 :</b> Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi et <i>al.</i> , 002)...	58
<b>Figure 4 :</b> <i>Spirulina platensis</i> de Tamenrasset .....	61
<b>Figure 5 :</b> Solution de bicarbonate 0,2% chauffée pendant 10 à 20 minutes à 50-60°C.....	62
<b>Figure 6:</b> Solution de spiruline après chauffage et homogénéisation.....	62
<b>Figure 7 :</b> Les étapes de l'estérification de la spiruline.....	68
<b>Figure 8:</b> Protocole de l'extraction des composés phénoliques (Lann et <i>al.</i> , 2012) .....	71
<b>Figure 9 :</b> Aspect microscopique d'une colonie de la souche bifide <i>Bf1</i> (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25)....	87
<b>Figure 10 :</b> Aspect microscopique d'une colonie de la souche bifide <i>Bf8</i> (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25)....	87
<b>Figure 11 :</b> Aspect microscopique d'une colonie de la souche bifide <i>Bf11</i> (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25)..	88
<b>Figure 12 :</b> Aspect macroscopique des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	92
<b>Figure 13 :</b> Aspect macroscopique des colonies d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	93
<b>Figure 14 :</b> Aspect macroscopiques des colonies <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 sur gélose nutritif.....	94
<b>Figure 15:</b> Aspect macroscopiques des colonies de <i>Salmonella ssp.</i> .....	95
<b>Figure 16 :</b> Image microscopique de <i>Spirulina platensis</i> (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25).....	97
<b>Figure 17 :</b> Evolution du pH et de la biomasse de <i>Spirulina platensis</i> dans le milieu Hiri.....	99
<b>Figure 18 :</b> Evolution du poids sec, et de phycocyanine de la souche de <i>Spirulina platensis</i> et en fonction du temps.....	100
<b>Figure 19 :</b> Profil des acides gras de <i>Spirulina platensis</i> .....	104
<b>Figure 20 :</b> Rendement des extraits de la spiruline.....	111
<b>Figure 21 :</b> Détermination de la teneur des polyphénols par mg AG/g d'extrait sec.....	112
<b>Figure 22 :</b> Activités antioxydantes des différents extraits de <i>Spirulina platensis</i> avec la	



vitamine C et le BHT selon la méthode de DPPH.....	113
<b>Figure 23</b> : Profils des polyphénols de l'extrait 1 à 254 nm.....	115
<b>Figure 24</b> : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus par différents extraits de <i>Spirulina platensis</i> .....	117
<b>Figure 25</b> : Evolution de la biomasse de la souche <i>Bifidobacterium breve</i> dans les quatre cultures réalisées.....	120
<b>Figure 26</b> : Evolution du pH de la souche <i>Bifidobacterium breve</i> dans les quatre cultures.....	122
<b>Figure 27</b> : Evolution d'acidité en degré dornic de la souche <i>Bifidobacterium breve</i> dans les quatre cultures .....	123
<b>Figure 28</b> : Effet inhibiteur des cultures vis-à-vis de <i>Salmonella ssp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 et <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	124

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Sites géographique où pousse naturellement la spiruline (Fox, 1999).....	08
<b>Tableau 2 :</b> Distribution des différentes espèces de <i>Bifidobacterium</i> dans le tractus digestif de l'homme en fonction de l'âge (Ballongne, 1993).....	37
<b>Tableau 3 :</b> Espèces de bifidobactéries d'origine humaine.....	37
<b>Tableau 4 :</b> Espèces de bifidobactéries d'origine animale.....	38
<b>Tableau 5 :</b> Espèces de bifidobactéries d'origine environnementale.....	38
<b>Tableau 6 :</b> Les deux types de protections antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants (Pastre, 2005).....	43
<b>Tableau 7 :</b> Composition de la phase mobile pour l'étude des polyphénols par HPLC en fonction du temps. ....	74
<b>Tableau 8 :</b> Dilutions préparées à partir des extraits de la spiruline .....	76
<b>Tableau 9 :</b> Caractères macroscopiques des colonies purifiées de <i>Bifidobacterium</i> .....	86
<b>Tableau 10 :</b> Résultats d'identification des caractères biochimiques des souches bifides... ..	88
<b>Tableau 11 :</b> Identification des espèces du genre <i>Bifidobacterium</i> selon Mitsuoka, 1969, Mitsuoka 1984 et Biavati et <i>al.</i> , 1992, .....	89
<b>Tableau 12 :</b> Classification des souches de <i>Bifidobacterium</i> selon leur vitesse d'acidification et leur effet inhibiteur vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	89
<b>Tableau 13 :</b> Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries pathogènes testées.....	95
<b>Tableau 14 :</b> Identification biochimiques de souches isolées par la galeries API 20E.....	96
<b>Tableau 15 :</b> Résultats des analyses physico-chimiques de la spiruline.....	100
<b>Tableau 16 :</b> Composition en acides gras de <i>Spirulina platensis</i> .....	105
<b>Tableau 17 :</b> Composition minérale de la poudre de la spiruline (mg/g). ....	108
<b>Tableau 18 :</b> Teneur en phytonutriments de <i>Spirulina platensis</i> .....	109
<b>Tableau 19 :</b> Détermination des polyphénols pour chaque Extrait de la spiruline.....	116
<b>Tableau 20 :</b> Détermination de la CMI pour chaque Extrait de la spiruline (mm).....	118

<b>Tableau 21</b> : Résultats des analyses microbiologiques de la spiruline.....	119
<b>Tableau 22</b> : Effet de différentes doses de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Bifidobacterium breve</i> sur les niveaux de glucose (g/L) chez les rats diabétiques.....	127
<b>Tableau 23</b> : L'évolution de la glycémie chez les rats étudiés (g/L).....	129
<b>Tableau 24</b> : Les résultats des paramètres biochimiques chez les rats diabétiques et témoins.....	130

## *Liste d'abréviation*

**AAF** : aérobies anaérobies facultatives  
**ADH** : Arginine dihydrolase  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AGE**: advanced glycation end-products  
**AGE-RAGE** : le récepteur de l'AGE.  
**AGPI** : acides gras polyinsaturés  
**AOCS**: American Oil Chemist's Society  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ATP** : adénosine-5'-triphosphate  
**ATCC** : American Type Culture Collection  
**Bf.** : *Bifidobacterium*  
**BF3** : boron trifluoride  
**BHT** : butyle hydroxytoluène  
**Ca** : calcium  
**CaCO<sub>3</sub>** : carbonate de calcium  
**Ca-Sp** : spirulane-calcique  
**CAT** : la catalase  
**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice  
**CO** : oxyde de carbone  
**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone  
**COX-2** : cyclooxygénase-2  
**CPG** : chromatographie en phase gazeuse  
**DID** : diabète insulino-dépendant  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**DNID** : Diabète non insulino-dépendant  
**DPPH** : 2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**E. coli** : *Escherichia Coli* ATCC 25922,  
**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène  
**FAO** : Food and Agriculture Organization  
**Fe**: fer  
□ : gamma  
**GAMT** : germes aérobies mésophiles totaux  
**gélose XLD** : Gélose xylose lysine désoxycholate  
**GLA** : acide gammalinoléique  
**GPX** : la glutathion peroxydase  
**H<sub>2</sub>O** : eau  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : le peroxyde d'hydrogène  
**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène  
**HCl** : chlorure d'hydrogène  
**HDL** : lipoprotéines de haute densité  
**HNE** : 4-Hydroxynonanal  
**HOCl** : acide hypochloreux  
**HPLC** : chromatographie en phase liquide à haute performance  
**Kcal** : kilocalories  
**KOH** : Hydroxyde de potassium  
**LDL** : lipoprotéines de petite densité  
**Milieu VRBL** : Milieu lactosé biliée au cristal violet et au rouge neutre  
**MKTTn** : Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine  
**MRSc**: man rogosa, sharpe cystéiné  
**Na** : sodium  
**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: sulfate de sodium  
**NaCl** : Le chlorure de sodium  
**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**Na-Sp** : le spirulane-sodique  
**NO** : oxyde nitreux  
**NO<sub>2</sub>** : dioxyde d'azote  
**O<sub>2</sub>**: Oxygène  
**OH\*** : le radical hydroxyle  
**OMS** : Organisation Mondiale de santé  
**ONOO<sup>-</sup>** : peroxydinitrite  
**ONPG** : ortho-nitro-phényl-galacto-pyranosie  
***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853  
**PCA** : Plate Count Agar  
**pH** : potentiel hydrogène  
**R** : radical  
**RM** : Rouge de méthyle  
**ROOH** : hydroperoxydes organiques  
**RVS** : Rappaport-Vassiliadis avec soja  
***S. aureus***: *Staphylococcus aureus* ATCC25923  
***S. platensis*** : *Spirulina platensis*  
**SOD** : la superoxyde dismutase  
**SQDG** : sulfoquinovosyldiacylglycerol  
**TC** : cholestérol total  
**TDA** : Urée-tryptophane  
**TG** : triglycérides  
**TSE** : tryptone sel eau  
**UFC** : unité formant colonie  
**VCAM-1** : vascular cell adhesion molecule-1  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine  
**VP** : Voges-Proskauer  
**VPI** : l' $\alpha$ -naphtol  
**VPII** : soude KOH  
**Whatman GF/C** : Whatman Glass microfiber filters  
**Zn** : Zinc  
 $\alpha$  : alpha  
 $\beta$  : bêta  
 $\omega$  : oméga

# Table des matières

Introduction .....	01
<b>Partie I : Partie bibliographique</b>	
Chapitre 01 : LA SPIRULINE	
1.1. Généralités.....	06
1.1.1. Définition.....	06
1.1.2. Historique.....	06
1.1.3. Distribution géographique dans le monde.....	07
1.1.4. Appellation.....	09
1.1.5. Taxonomie.....	09
1.1.6. Morphologie et caractères généraux.....	11
1.1.7. Cycle biologique.....	12
1.2. La composition de la spiruline.....	12
1.2.1. Les protéines et les acides aminés.....	12
1.2.2. Les lipides .....	13
1.2.2.1. Lipides totaux.....	13
1.2.2.2. Acides Gras.....	13
1.2.3. Les glucides.....	14
1.2.4. Acide nucléique.....	14
1.2.5. Les vitamines.....	15
1.2.6. Minéraux et oligo-éléments.....	15
1.2.7. Pigments.....	15
1.3. Culture de la spiruline.....	16
1.3.1. Biologie de la micro-algue.....	16
1.3.2. Bases techniques de la production.....	17
1.3.3. Le milieu de culture.....	18
1.3.4. Lumière et agitation.....	19

1.3.5. Optimisation du rendement.....	20
1.3.6. Suivi des cultures..... ;.....	20
1.4. L'importance de la spiruline pour la santé.....	22
1.5. La spiruline et le diabète.....	23
<b>Chapitre 02 : LES PROBIOTIQUES</b>	
2.1. Généralités sur le système digestif.....	25
2.1.1. Définition.....	25
2.1.2. L'intestin grêle.....	25
2.1.3. Le côlon.....	26
2.1.4. Le microbiote.....	27
2.1.4.1. Les fonctions métaboliques .....	28
2.1.4.2. Les fonctions trophiques.....	28
2.1.4. 3. Les fonctions de protection.....	28
2.2. Les probiotiques.....	29
2.2.1. Le genre <i>Bifidobacterium</i> .....	30
2.2.1.1 Historique.....	31
2.2.1.2. Taxonomie des bifidobactéries.....	32
2.2.1.3. Métabolisme.....	32
2.2.1.4. Les facteurs bifidigènes.....	34
2.2.1.5. Niche écologique des bifidobactéries.....	35
<b>Chapitre 03 : Le stress, les antioxydants et le diabète</b>	
3.1. Le stress oxydant.....	40
3.1.1. Les radicaux libres.....	40
3.1.1.1. La production des radicaux libres.....	41
3.1.1.2. Conséquences de la présence des radicaux libres .....	41
3.1.2. La défense de l'organisme contre les radicaux libres.....	42
3.2. Les antioxydants.....	42

3.2.1. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants.....	43
3.2.2. Les systèmes de défense antioxydant.....	44
3.2.2.1. Système enzymatique.....	44
3.2.2.2. Système non enzymatique.....	45
3.3. L'activité anti-oxydantes et la spiruline.....	47
3.4. L'activité anti-oxydante et les probiotiques.....	48
3.5. Stress oxydant et le diabète.....	48
3.5.1. Définition du Diabète.....	48
3.5.1.1. Le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1.....	49
3.5.1.2. Diabète non insulino-dépendant (DNID) .....	49
3.5.2. Les complications liées au diabète.....	50
3.5.3. Diabète et stress oxydatif.....	51
3.5.3.1. Glycation (glycosylation).....	51
3.5.3.2. Les AGE-RAGE.....	52
3.5.3.3. Augmentation de la voie de polyol.....	52
3.5.3.4. L'épuisement des anti-oxydant sérique et cellulaire.....	53
3.5.4. Les antioxydants et le Diabète.....	53
3.5.5. Diabète et la Nutrition.....	54

## **Partie II : Partie Expérimentale**

### **MATERIELS ET METHODES**

1.1. Les souches bifides autochtones isolées.....	57
1.1.1. Isolement des bifidobactéries .....	57
1.1.2. Purification des bifidobactéries .....	57
1.1.3. La conservation à courte terme.....	57
1.1.4. La conservation à long terme.....	57
1.1.5. Identification des bifidobacteries.....	58



1.1.6. Sélection des souches bifides selon leur aptitude technologique.....	58
1.1.7. Sélection des souches bifides selon leur effet inhibiteur.....	59
1.2. Les bactéries pathogènes.....	59
1.2.1. Les souches de référence.....	59
1.2.2. La souche autochtone isolée.....	60
1.2.3. Identification.....	60
1.3. <i>Spirulina platensis</i> .....	61
1.3.1. Culture de la spiruline.....	61
1.3.2. Les analyses physicochimiques de la spiruline.....	64
1.3.2.1. Détermination du potentiel d'hydrogène pH .....	64
1.3.2.2. Détermination de la teneur en humidité .....	64
1.3.2.3. Détermination de la teneur en protéine .....	65
1.3.2.4. Détermination du taux de cendres.....	66
1.3.2.5. Détermination de la teneur en éléments minéraux par spectroscopie d'absorption atomique.....	66
1.3.2.6. Détermination de la teneur en sucre soluble .....	66
1.3.2.7. Détermination de la teneur en lipides et la composition des acides gras .....	68
1.3.3. Détermination des pigments.....	69
1.3.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	71
1.3.5. Détermination de l'activité antioxydante de la spiruline.....	72
1.3.6. Détermination des polyphénols par chromatographie liquide à haute performance .....	73
1.3.7. L'activité antimicrobienne.....	75
1.3.8. Les analyses microbiologiques de la spiruline.....	77
1.4. Effet de la concentration de <i>Spirulina platensis</i> sur la croissance des <i>Bifidobacterium breve</i> .....	77
1.4.1. Mesure de la cinétique de la croissance .....	78
1.4.2. Evolution du pH.....	78

1.4.3. Dosage de l'acidité dornic.....	78
1.4.4. L'activité antimicrobienne.....	79
1.5. Essai <i>in vivo</i> sur l'effet antioxydant de <i>Spirulina platensis</i> en association avec <i>bifidobacterium breve</i> sur le diabète.....	79
1.5.1. Le modèle animal.....	79
1.5.2. Condition d'élevage.....	80
1.5.3. L'induction de diabète (Hyperglycémie permanente).....	80
1.5.4. Le traitement préventif du diabète alloxanique.....	80
1.5.5. Effet du lait infantile 1er âge (GUIGOZ I) enrichi par <i>Spirulina platensis</i> et <i>Bifidobacterium breve</i> .....	82
1.5.5.1. Détermination de la glycémie.....	83
1.5.5.2. Sacrifice et préparation des prélèvements.....	83
1.5.5.3. Analyse statistique et expression des résultats.....	83

## RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Identification des souches bifides isolées.....	85
2.1.1. Les bifidobactéries.....	85
2.1.2. Sélection des souches bifides selon leur aptitude technologique.....	90
2.2. Identification des bactéries pathogènes.....	92
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	92
2.2.2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	93
2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	93
2.2.4. <i>Salmonella</i> ssp.....	93
2.2.5. Identification biochimiques des bactéries pathogènes.....	95
2.3. Culture de <i>Spirulina platensis</i> .....	97
2.3.1. Réactivation de la souche algale.....	97
2.3.2. Purification de la spiruline.....	97
2.3.3. Observation microscopique de la spiruline.....	97
2.3.4. Estimation de la croissance de la spiruline.....	98

2.3.5. Les analyses physicochimiques de la spiruline.....	100
2.3.6. Détermination de la teneur en éléments minéraux par spectroscopie d'absorption atomique.....	108
2.3.7. Détermination des pigments.....	109
2.3.8. Extraction des composés phénoliques par les différents solvants.....	111
2.3.8.1. Détermination du rendement pour chaque extrait de la spiruline.....	111
2.3.8.2. Détermination des composées phénoliques selon la méthode de Folin- Ciocalteu.....	112
2.3.8.3. Détermination de l'activité antioxydante .....	113
2.3.8.4. Détermination des polyphénols par HPLC .....	114
2.3.8.5. Détermination de l'effet antimicrobien des extraits.....	117
2.3.9. Analyses microbiologiques de la spiruline.....	119
2.4. Effet de la concentration de <i>Spirulina platensis</i> sur la croissance des <i>Bifidobacterium breve</i> .....	120
2.4.1. Evolution de la biomasse de <i>Bifidobacterium breve</i> avec les différentes concentrations de <i>Spirulina platensis</i> .....	120
2.4.2. Evolution du pH de <i>Bifidobacterium breve</i> avec les différentes concentrations de <i>Spirulina platensis</i> .....	122
2.4.3. Evolution de l'acidité dornic de <i>Bifidobacterium breve</i> avec les différentes concentrations de <i>Spirulina platensis</i> .....	123
2.4.4. Détermination de l'effet antimicrobien de <i>Bifidobacterium breve</i> avec les différentes concentrations de <i>Spirulina platensis</i> .....	124
2.5. Essai <i>In vivo</i> sur l'effet antioxydant de <i>Spirulina platensis</i> en association avec <i>bifidobacterium breve</i> sur le diabète .....	126
2.5.1. Dosage de la glycémie .....	126
2.5.2. Effet du lait infantile 1 <sup>er</sup> âge (GUIGOZ I) enrichi par <i>Spirulina platensis</i> et <i>Bifidobacterium breve</i> .....	129
2.5.2.1. Evolution de la glycémie chez les rats diabétiques et témoins.....	129
2.5.2.2. Dosage des paramètres biochimiques chez les rats diabétiques et témoins.....	130
Conclusion .....	132
Références bibliographiques	
Annexe	

## Introduction

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants et bénéfiques à l'organisme, qui font partie de la flore intestinale.

Toutefois, il ne suffit pas d'apporter des probiotiques, encore faut-il leur fournir de l'énergie. C'est le rôle des prébiotiques : ils représentent une source sélective de nourriture pour les bactéries intestinales, et plus précisément pour les bonnes bactéries.

Les prébiotiques sont des sucres, comme la cellulose, le lactose, des galacto-oligosaccharides, et surtout l'inuline. Ils sont fermentables (digestibles) et résistants lors de leur passage dans l'estomac et l'intestin grêle, avant d'arriver dans le côlon, leur destination finale.

En ingérant des prébiotiques, on peut donc contrôler la population bactérienne, c'est-à-dire rééquilibrer la flore intestinale en favorisant la prolifération des bonnes bactéries au détriment des mauvaises bactéries. En modifiant la flore intestinale à l'aide des prébiotiques, on prévient le syndrome de l'intestin perméable. On peut ainsi, par exemple, améliorer l'absorption de calcium et donc la densité osseuse ou diminuer le taux de triglycérides. Mais aussi abaisser le risque de cancer du côlon, de diabète ou traiter la constipation. Comme prébiotique on peut proposer la spiruline.

La spiruline est une cyanobactérie utilisée traditionnellement depuis plusieurs centaines d'années par certaines populations et connue depuis les années soixante pour ses propriétés alimentaires en protéines. Par la suite ses teneurs en micro nutriments, en bêta-carotène (précurseur de la vitamine A), en fer, en vitamine B12, en acides gras ont intéressé les chercheurs et les industriels.

La spiruline consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique et connue par les scientifiques depuis plusieurs décennies pour sa richesse nutritionnelle, elle fait l'objet d'une redécouverte depuis quelques années. Riche en nutriments tel que protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux, elle est à l'étude ou déjà utilisée pour lutter contre la malnutrition. Compte tenu de ses caractéristiques, la culture de la spiruline pourrait être une solution pour améliorer la santé humaine, la nutrition notamment dans les pays du tiers-monde et également pour développer des cultures industrielles.

Cette cyanobactérie semble actuellement l'une des meilleurs solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité et, du fait, de grandes entreprises se sont lancées dans la culture de cet organisme à une échelle industrielle.

Au niveau des sociétés industrielles, les recherches et les tentatives en pharmacothérapie ont permis d'établir l'insulinothérapie pour lutter contre le diabète juvénile et le contrôle du régime alimentaire associé à la prise de molécules antidiabétiques (sulphonylurés, biguanide, methformine, ...) pour le traitement et la lutte contre le diabète type 2 (Marles, 1994 ; Dey lucey *et al.*, 2002).

Dans certaines sociétés traditionnelles non industrialisées (certains pays africains et latino-américains...), la prise en charge médicamenteuse de pathologies dites chroniques (tel le diabète) est en grande partie assurée par l'utilisation de plantes médicinales et alimentaires et des produits marins ( Sharma *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009).

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides entraînant une hyperglycémie. A l'origine, le terme "diabète" désignait diverses maladies caractérisées par une élimination importante d'urines, une déshydratation et une soif intense (Calop *et al.*, 2008).

Cette pathologie se distinguait par la saveur sucrée des urines et fut nommée diabète sucré (Rodier, 2001 ; Sharma, 2008). Elle est répandue dans le monde où on dénombre 5 à 7% de la population mondiale ( Weaber, 2007 ; Sharma *et al.*, 2008 ; Singh *et Kakkar*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2009).

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone (Rodier, 2001 ; Sharma *et al.*, 2008). Le diabète type 1, insulino-dépendant, est actuellement maîtrisé surtout après la synthèse de l'insuline recombinante (Johnson, 1983). Pour le diabète type 2, le champ de recherche est encore ouvert.

L'existence d'une pharmacopée traditionnelle antidiabétique destinée au traitement de la pathologie diabétique sévit et son existence est confirmée par les praticiens et les médecins qui la pratiquent (Sharma *et al.*, 2008 ; Singh, 2009)..

L'objectif de cette présente étude est de répondre à la problématique suivante :

L'association prob-spiruline peut elle effectivement représenter une forme de régulation de la glycémie ou est ce le cas avec chaque entité prise indépendamment ?

Les effets avérés sur le diabète, nous ont poussé à démontrer expérimentalement, les principes actifs de la combinaison envisagée et d'en comprendre les mécanismes d'action.

Notre stratégie expérimentale a comporté donc les axes suivants :

- Isolement et identification des souches appartenant au genre *Bifidobacterium*
- Analyses physico-chimique de la poudre de spiruline
- Analyses chimiques de la spiruline (détermination des polyphénols par chromatographie en phase liquide à haute performance "HPLC" )
- Un fractionnement des polyphénols par entraînement avec des solvants
- Evaluation du pouvoir antioxydant de la spiruline
- Une étude *in vivo* est entreprise pour justifier la dose de spiruline administrée, pour démontrer l'effet de la spiruline seule, l'effet des *Bifidobacterium* et de l'association.

Un modèle de rat diabétique a été conçu pour tester l'efficacité de ces préparations *in vivo*.

## Chapitre 01 : LA SPIRULINE

### 1.1. Généralités

#### 1.1.1. Définition

La spiruline définie comme un organisme microscopique bleu procaryote. La phycocyanine (pigment naturel bleu) qu'elle contient et qui prend une couleur verte avec la photosynthèse a des propriétés anti-inflammatoire qui sont actuellement à l'étude (Vautrin, 2006 ; Oleivira et *al.*, 2009). La spiruline est cultivée principalement pour ses propriétés nutritionnelles et/ou thérapeutiques. Elle est avant tout destinée à devenir complément alimentaire (Gaudez, 2007), Un des premiers êtres vivants à réaliser la photosynthèse, la spiruline a contribué à l'enrichissement en oxygène et était déjà consommée par les Aztèques et les Mayas (Challem, 1999 ; Dardoize, 2010).

La spiruline se présente sous la forme d'un filament, la longueur moyenne du filament est de 250 µm lorsqu'il a 7 spires et son diamètre est d'environ 10 µm (Cruchot, 2008).

#### 1.1.2. Historique

Les cyanobactéries, cyanobiontes ou encore cyanophycées selon les préférences, sont la famille d'algues bleues-vertes à laquelle appartient la spiruline, qui elle-même peut être indifféremment appelée *Arthrospira* sp. ou *Spirulina* sp..

La spiruline est une très ancienne forme de vie, dont l'apparition sur terre remonte à près de 3,5 milliards d'années (Perez, 1997).

Récoltée et consommée depuis des siècles par le peuple tchadien des Kanembous (Afrique) et par les anciens Aztèques (Mexique, vallée du Texcoco), elle apparaît pour la première fois dans la littérature sous la plume de Cortès, qui en ses mémoires de conquérant, rédigées vers 1521, nous explique qu'elle était consommée sous forme de galettes obtenues par séchage au grand soleil. Redécouverte au Tchad en 1930 par un pharmacien des troupes coloniales françaises, elle attira en 1959 l'attention de Brandilly, anthropologue et cinéaste, qui lui consacra un article aussitôt oublié qu'écrit, malgré son titre prophétique : « Depuis des lustres, une tribu africaine du Tchad exploite la nourriture de l'an 2000 ». La spiruline, si elle est l'une des premières formes de vie terrestre, n'en a pas moins suscité que tardivement l'intérêt des scientifiques occidentaux (Girardin-Andréani, 2011).

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).

La spiruline est l'une des grandes découvertes du vingtième siècle. On devrait plutôt parler de redécouverte puisque cette petite algue qui pousse à grande vitesse dans des bassins d'eau douce était déjà connue par les anciens Mayas qui en avaient fait l'élément fondamental de leur alimentation. L'histoire de la spiruline au vingtième siècle est liée à celle d'un personnage tout à fait fascinant, Christopher Hill. Cet Américain s'aperçut que la spiruline, cette petite algue dont personne ne s'occupait à l'époque offrait une solution extraordinaire aux problèmes nutritionnels de notre temps. Facile à « cultiver », puisqu'elle pousse toute seule dès qu'il y a un peu d'eau et de soleil, la spiruline représente l'un des aliments les plus fabuleux qui existent sur terre (Schaller et Razanamahay, 2002 ; König, 2007).

### **1.1.3. Distribution géographique dans le monde**

La spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (Castenholz et *al.*, 2001). Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud.

Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande) (Tableau 1). Cet organisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe.



**Tableau 1** : Sites géographique où pousse naturellement la spiruline (Fox, 1999)

Noms des pays	Localisation précises
<b>AFRIQUE</b>	
Algérie	Tamanrasset
Tchad	Région du Kanem : lacs latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Bodou
Djibouti	Lac Abber
Ethiopie	Lacs Aranguadi, Nakourou, Chiltu, Navasha
Congo	Mougounga
Tunisie	Lac Tunis, Chott el Jerid
<b>ASIE</b>	
Inde	Lacs Lonar et Nagpur, Lacs Twyn Ttaung
Thaïlande	Mares près de Lahore
Sri Lanka	Lac Beira
<b>AMERIQUE DU SUD</b>	
Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas Près de l'île d'Amantani dans le lac Titicaca
Mexique	Lac Texcoco ; lacs Cratère
Uruguay	Montevideo
Equateur	Lac Quiliotoa : cratère de 1 Km de diamètre
<b>AMERIQUE DU NORD</b>	
Californie	Oakland ; Del Mar Beach
Haïti	Lac Gonâve
République Dominicaine	Lac Enriquillo
<b>Europe</b>	
Hongrie	
France	Camargue

### 1.1.4. Appellation

Spiruline, *Spirulina* ou *Arthrospira*. 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 d’*Arthrospira*, et surtout non comestible. « *Arthrospira* » étant le nom scientifique (genre) d’un groupe de cyanobactéries auquel appartient notre spiruline alimentaire (Fox, 1999 ; Legeard, 2005).

La spiruline, avait différents appellations dont on peut citer (Fox, 1999) :

- La Potion magique : Mentionnée par Christophe Colomb ;
- Le Dihé : Par les Kanembous, tribu du Tchad (Donon, 1998);
- Le Tecuitlatl : Par les Aztèques

### 1.1.5. Taxonomie

La spiruline appartient à l’ordre des Nostocales (= Oscillatoriales), la famille des Oscillatoriaceae, le genre *Oscillatoria* et le sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira* (Charpy *et al.*, 2008).

La spiruline est classée selon Ripley Fox (1999) dans :

<b>Règne :</b>	Monera
<b>Groupe ou Sous Règne</b>	Procaryotes
<b>Embranchement</b>	Cyanophyta
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordre</b>	Nostocales (= Oscillatoriales)

Les Nostocales sont des cyanophycées filamenteuses, unisériées, ramifiées (fausses ramifications simples ou géminées) ou non ramifiées. Elles se multiplient le plus souvent par hormogonies pluricellulaires et parfois par akinètes.

---

<b>Famille</b>	Oscillatoriaceae
----------------	------------------

---

Les Oscillatoriaceae se caractérisent par : des trichomes cylindriques, unisériées, simples, qui sont atténués parfois à l'apex par une courbure ou par la présence d'une coiffe, mais jamais en poils articulés. Les trichomes sont nus ou pourvus d'une gaine. Il n'y a pas de ramification et pas d'hétérocyste.

---

<b>Genre</b>	<i>Oscillatoria</i>
--------------	---------------------

---

Les trichomes sont libres, solitaires et dépourvus de gaine. Ils sont droits ou flexueux et parfois tordus en une hélice régulière.

---

<b>Sous genre</b>	<i>Spirulina</i>
-------------------	------------------

---

Le sous genre *Spirulina* qui groupe les espèces à trichome régulièrement enroulé en hélice plus ou moins serrée, soit une trentaine d'espèces dans les eaux douces en général. Leur déplacement s'effectue en se vrillant dans l'eau à la façon d'une vis. Les spirulines sont abondantes dans les eaux salées et natronées sahéliennes, et une espèce *Spirulina platensis* forme des fleurs d'eau particulièrement denses ; dans certaines régions du Tchad (Kanem) (Durand et Lévêque, 1980). Cette micro algue change de forme en fonction des caractéristiques physiques et chimiques du milieu dans lequel on la trouve. Mais on remarque aussi que dans un même milieu on trouve des variétés des formes (Fox, 1999).

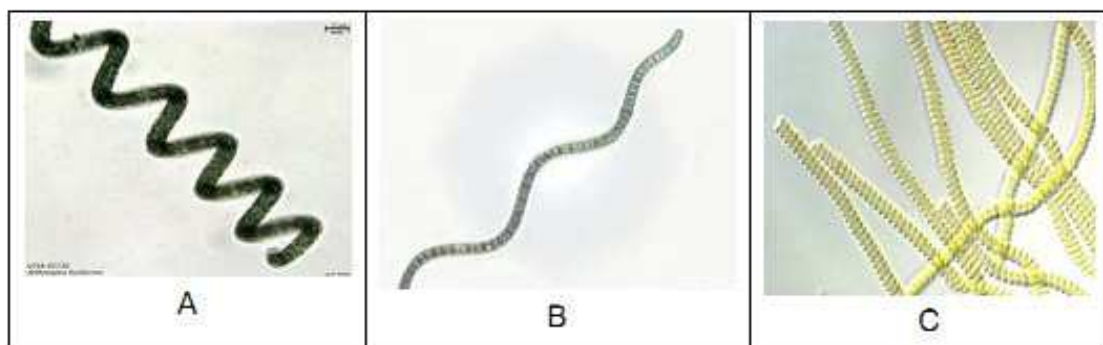
---

<b>Espèces (Merdan, 2009):</b>	- <i>Spirulina platensis</i> ;
	- <i>Spirulina geitleri</i> ou <i>maxima</i> ;
	- <i>Spirulina gusiformis</i> ou <i>Jeejibai</i> .

---

### 1.1.6. Morphologie et caractères généraux

La spiruline a une longueur moyenne de 250  $\mu\text{m}$  quand elle possède 7 spires. Elle est composée de filaments mobiles (de 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre) non ramifiés et enroulés en spirales, qui ressemble à un minuscule ressort à boudin, d'où le nom de «Spiruline». Cependant les spirulines présentent différentes formes. On trouve des 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).



A = Forme spiralée (*Arthrospira fusiformis*) ; B= Forme ondulée (*Spirulina maxima*) ; C = forme Spirale *Arthrospira platensis*

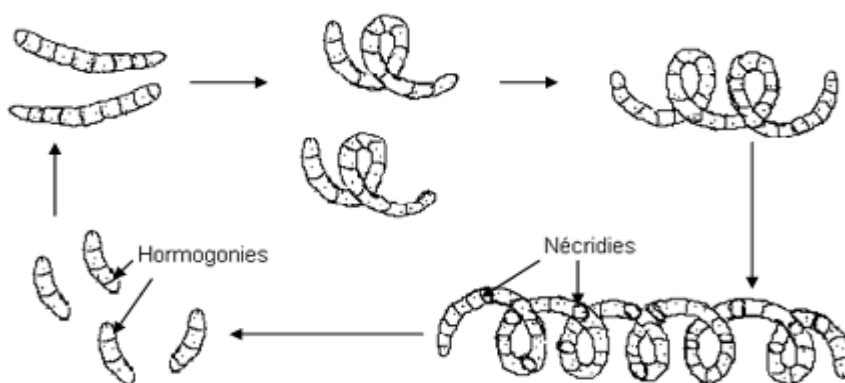
**Figure 1:** Morphologies typiques de la spiruline (Charpy *et al.*,2008)

Plus précisément, la spiruline est constituée de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament ou trichome. L'enroulement du trichome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au dessus de la spirale. Les facteurs environnementaux tels la température auraient cependant une influence sur l'orientation de l'hélice. Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis (Muhling *et al.*, 2003).

Le système pigmentaire de la spiruline est constitué de chlorophylle a; de pigments hydrosolubles, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleu (phycocyanine) ; de caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, cryptoxanthine) (Sakho et Crouzet, 2009).

### 1.1.7. Cycle biologique

Le filament de spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées nécriides. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies (Figure 2). Les hormogonies vont croître en longueur par division binaire (chacune des cellules va donner deux cellules par scissiparité) et prendre la forme typique hélicoïdale. En conditions expérimentales, le temps de génération (passage d'une génération à une autre) maximal de la spiruline est de l'ordre de 7 heures (König, 2007 ; Feng et Yue, 2013).



**Figure 2:** Cycle biologique de la spiruline (Charpy et *al.*, 2008)

### 1.2. La composition de la spiruline

La spiruline est source de protéines (60 à 70%) de son poids sec. Elle renferme également des hydrates de carbones (18 à 20%), des lipides (6 à 7%), et des vitamines A,C,H, ainsi que ceux du groupe B (Umesh, 2002 ; Batello *et al.*, 2006 ; Merdan, 2009).

La spiruline contient de l'acide gamma-linolénique (GLA), une substance aux propriétés anti-inflammatoires qui appartient à la famille des bons acides gras oméga-6 (Delpeuch *et al.*, 1976 ; Grosgeat, 2009).

#### 1.2.1. Les protéines et les acides aminés

La teneur en protéines de la spiruline est élevée. Elle représente 10 à 11% de la masse humide, soit 60 à 70% de sa matière sèche (Clément 1975a,b, Fox 1999). Ce pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%) (Peltier et Fort, 2009), de la poudre de lait (35%) et des céréales (14%) (Henrikson, 1994). La spiruline est très riche en matières azotées et en contient deux fois plus que le soja, trois fois plus que la viande ou le poisson.

Cette richesse est cependant à relativiser compte tenu de la faible quantité de spiruline utilisée en complément alimentaire (<10g par jour).

D'un point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels y figurent, ils représentent 47% du poids total des protéines (Bujard et *al.*, 1970). Parmi ces acides aminés essentiels, les plus faiblement représentés sont les acides aminés soufrés: méthionine et cystéine (Clément et *al.*, 1967 ; Bujard et *al.*, 1970), qui sont toutefois présents à plus de 80% de la valeur idéale définie par la FAO (sur la base de l'albumine d'oeuf et de la caséine). La lysine serait aussi légèrement sous représentée d'après certains auteurs (PAG, 1974), suffisante d'après d'autres (Clément et *al.*, 1967).

### **1.2.2. Les lipides**

#### **1.2.2.1. Lipides totaux**

Le pourcentage des lipides totaux est compris entre 6 et 13 % du poids sec en spiruline. Ces lipides totaux peuvent être séparés en une fraction saponifiable (83 %) et une fraction insaponifiable (17 %).

La fraction saponifiable est surtout composée de monogalactosyl diglycérides et de digalactosyl diglycérides (23 %), de sulfoquinovosyl diglycérade (5 %), et de phosphatidyl glycérol (25,9 %). Les triglycérides sont rares (0,3 %) et on détecte en outre 4,6 % de phospholipides indéfinis (Fox, 1999).

#### **1.2.2.2. Acides Gras**

Les acides gras se distinguent par la longueur de leur chaîne carbonée et leur degré d'insaturation.

Les acides gras essentiels sont des acides gras polyinsaturés classés en deux groupes (oméga-3 et oméga-6), selon la position de l'insaturation la plus proche du groupe méthyle terminal. Ceux du groupe oméga-3 jouent un rôle préventif sur les risques cardiovasculaires, tandis que les acides gras oméga-6 ont un rôle hypocholestérolémiant (Falquet, 2007).

Les besoins en acides gras essentiels correspondent à 1 à 2 % des calories journalières chez l'adulte et à 3 % de ces calories chez les enfants (Otten et *al.*, 2007).

### 1.2.3. Les glucides

Les glucides constituent globalement 15 à 25% de la matière sèche des spirulines (Quillet, 1975 ; Shekharam *et al.*, 1987 ; Falquet et Hurni, 2006.). Les glucides simples sont le glucose, le fructose et le saccharose. On a des polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol. Notons que les polysaccharides de la spiruline auraient des effets de stimulation des mécanismes de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ce qui pourrait expliquer un effet radio-protecteur .Ces polysaccharides auraient également des propriétés immunostimulantes et immuno- régulatrices (Morist *et al.*, 2001).

On retrouve également des glucosamines provenant de la paroi cellulaire des spirulines qui sont des bactéries Gram positives. Relativement fragiles, ces parois rendent le contenu cellulaire accessible aux enzymes de la digestion.

Il est aussi à noter qu'un autre glucide de la spiruline, le méso-inositol phosphate, est intéressant d'un point de vue nutritionnel car il est une excellente source de phosphore organique ainsi que d'inositol. Cette teneur en inositol est environ huit fois celle de la viande de boeuf et plusieurs centaines de fois celle des végétaux qui en sont les plus riches.

Les cyclitols sont présents en quantité importante et pourraient avoir un effet décalcifiant à une telle teneur, si les spirulines n'étaient pas si riches en calcium.

A noter également que les polysaccharides de la spiruline auraient des effets de stimulations des mécanismes de réparation de l'ADN (Pang, 1988) et des propriétés immunostimulantes et immunorégulatrices (Zhang, 1994)

### 1.2.4. Acide nucléique

La spiruline renferme 4,2 à 6% d'acides nucléiques totaux (30% ADN et 70% ARN) dans sa matière sèche (Santillan, 1974). La richesse en acides nucléiques d'un aliment peut induire à terme une production importante d'acide urique par dégradation biochimique des purines. L'ARN en produit deux fois plus que l'ADN. L'excès de cet acide peut entraîner à la longue des calculs rénaux et des crises de gouttes. Il est admis que la dose maximale d'acides nucléiques tolérables à long terme est de 4g/j pour un adulte. Il faudrait consommer 80 g de spiruline sèche pour atteindre cette dose (la quantité de spiruline usuellement consommée ne dépasse pas 10 g de matière sèche) (Charpy *et al.*, 2008).

### 1.2.5. Les vitamines

La spiruline contient une large gamme de vitamines (Girardin-Andréani, 2011) :

- **Bêta-carotène (provitamine A)** : jusqu'à 1700 mg par kg. Le bêta-carotène représente 80% des caroténoïdes de la spiruline. Celui-ci est particulièrement bio- disponible et son rôle dans la lutte contre les radicaux libres, la cécité par avitaminose A (symptôme de la tache de Bitot), certains types de cancers, le blocage de la transmission mère/enfant du VIH, n'est plus à démontrer.

- **Tocophérols (vitamine E)** : de 50 à 190 mg par kg, soit autant que le germe de blé. Les propriétés anti-oxydantes de la vitamine E renforcent l'effet anti-âge du bêta-carotène.

- **Vitamines du groupe B** : avec la levure de bière, la spiruline est une excellente source de ces vitamines aux multiples actions : rôle dans le métabolisme des glucides, lipides et protides, dans le métabolisme des hormones, dans la transmission de l'influx nerveux et le mécanisme de la respiration. Elles sont indispensables à la croissance, à la production d'énergie et au bon fonctionnement du système immunitaire. La vitamine B9 ou acide folique est anti-anémiant et anti-cancérigène, et stimule la croissance du système nerveux et de la moelle osseuse. La vitamine B1 ou thiamine est anti-stress.

- **Vitamine B12** : La spiruline est la seule source végétale connue de cette vitamine. Ce qui rend la spiruline particulièrement intéressante dans le cas de l'alimentation des personnes âgées dénutries, des anorexiques ou des végétariens stricts.

### 1.2.6. Minéraux et oligo-éléments

Calcium, magnésium, phosphore, fer, zinc, cuivre, chrome, manganèse, sodium, potassium. Les plus intéressants sont le fer, le magnésium, le calcium, le phosphore et le potassium. La présence de fer bio-disponible est à souligner, le fer présent dans les autres végétaux n'étant pas assimilable par l'homme. On doit noter également la présence de sélénium et de fluor, aux effets positifs certains (lutte contre les radicaux libres, prévention de la carie dentaire) (Girardin-Andréani, 2011).

### 1.2.7. Pigments

**La phycocyanine** est constituée d'une structure protéique reliée à un chromophore. C'est un pigment assez rare dans la nature qui absorbe la lumière dans une longueur de 61 à 650 nanomètres. Elle est représentée à environ à hauteur de 10 à 11% en moyenne dans la



spiruline. Appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses recherches sont en cours pour connaître toutes ses propriétés. Sa structure particulière lui confère des propriétés antioxydantes, antiradicalaires et détoxifiantes. La phycocyanine stimulerait également la production des globules rouges et des globules blancs (Chariemagne, 2008).

**La chlorophylle** est un pigment essentiel de la photosynthèse puisqu'elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique. Constituée d'un atome de magnésium en son centre, la chlorophylle est parfois comparée à l'hémoglobine qui possède quant à elle un atome de fer.

La spiruline en contient environ 1%, ce qui stimulerait les fonctions de presque tous les organes (Chariemagne, 2008).

**Les caroténoïdes** sont des pigments non azotés dont la coloration varie du jaune au rouge. La plupart des caroténoïdes sont des provitamines A indispensables aux hommes et aux animaux.

La spiruline en contient entre 20 et 25 fois plus que les carottes. Le bêta carotène représente 80% des caroténoïdes présents. Les caroténoïdes ont une action anti radicalaire. Ils participent également à la croissance et au développement de l'individu, ainsi qu'au maintien de la vision nocturne (Chariemagne, 2008).

### 1.3. Culture de la spiruline

#### 1.3.1. Biologie de la micro-algue

Les cyanobactéries, famille de microorganismes à laquelle on inclut la spiruline, sont des bactéries Gram négative, faisant le même type de photosynthèse que les végétaux supérieurs (Lindblad et *al.*, 1998). Elles colonisent des milieux très divers : eau douce, eau de mer, eau saumâtre, et même en écosystème terrestre. Plusieurs d'entre elles peuvent fixer l'azote atmosphérique : ce sont les espèces à hétérocyste qui pullulent dans les étangs piscicoles riches en phosphate. Certaines sont toxiques. D'autres, qui sont utilisées comme engrais, aliment, source d'énergie ou de produits chimiques présentent un intérêt économique véridique (Richmond, 1986 ; Watanabe et *al.*, 1995).

Comme les cyanobactéries se trouvent à la frontière du monde des végétaux et des bactéries, plusieurs définitions ont été attribuées à la spiruline. En référence, Richmond la décrit comme un microorganisme à filaments bleu-vert, mobiles,

composés de cellules cylindriques disposées en trichomes hélicoïdaux. Ces filaments tournent autour de leur axe ; la spiruline n'a pas d'hétérocyste, elle ne peut donc pas fixer l'azote libre. La forme hélicoïdale du trichome, observable uniquement en milieu liquide qui caractéristique du genre, mais les paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur) varient selon les espèces, et même chez une même espèce (Richmond, 1986 ; Fox, 1996).

L'espèce mexicaine *Spirulina maxima* se caractérise par des trichomes de 7 à 9µm de diamètre, de 70 à 80µm de long, légèrement effilés aux extrémités, formant une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60µm de diamètre. Les cellules constituant des trichomes mesurent 5 à 7µm de long et ne rétrécissent pas au niveau des articulations (Fox, 1999).

L'espèce du Tchad *Spirulina platensis* se compose de trichomes atteignant 350µm de long, de 5 à 11µm de diamètre, un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50µm, diminuant légèrement vers les extrémités (Fox, 1999).

### 1.3.2. Bases techniques de la production

L'environnement doit comprendre une zone de température convenant à la plante, de la lumière fournissant l'énergie pour la photosynthèse, et de l'eau ; avec en plus, en algoculture, un certain mouvement de l'eau pour assurer une répartition moyenne de la lumière et des éléments nutritifs. Un équilibre acido-basique et un pH favorables à la plante doit être maintenu, un rythme de récolte et d'ajout d'éléments nutritifs doit être établi et la culture doit se faire dans un système ou un bassin convenablement conçu (Jourdan, 1997 ; Jourdan, 2012).

Dans le cas de la spiruline, la croissance optimale est obtenue pour une température de 25°C à 40°C, avec une population dense, un ensoleillement généreux, un pH de 8,5 à 10,5 ; les éléments nutritifs essentiels doivent être en quantité suffisante (le manque d'un d'entre eux inhibe la croissance), l'eau doit être suffisamment agitée (Jourdan, 2007).

Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduit à la photolyse des micro-algues. Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donne la croissance optimale – tous les filaments reçoivent des charges de lumière fréquentes et sont ensuite rapidement protégés d'une exposition trop longue par les autres filaments. En lumière et agitation faibles, la croissance est lente, mais la pigmentation plus marquée,

c'est-à-dire que la couleur est d'un vert plus foncé et le bleu de la phycocyanine apparaît (Fox, 1999).

Le CO<sub>2</sub> étant moins soluble dans l'eau chaude que dans l'eau froide, l'élévation de la température réduit son taux, limitant la croissance. Une température trop basse réduit aussi la croissance. En absorbant le CO<sub>2</sub> par photosynthèse, les algues remontent le pH. Le pH optimum pour la croissance de la spiruline est entre 8,5 et 10,5 (Jourdan, 2012).

### 1.3.3. Le milieu de culture

Les spirulines poussent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable (toutefois sans excès de chlore à défaut de tuer les algues) ou au moins filtrée, le plus important étant l'élimination des algues étrangères. Une eau dure produira des boues minérales (plus ou moins abondantes selon la teneur en calcium, magnésium et fer), qui décantent rapidement et n'encombrent pas particulièrement la culture, à condition que l'ensemencement initial en spirulines soit assez concentré. La composition des milieux de culture peut varier énormément, selon la disponibilité des produits chimiques nécessaires à leur élaboration. Les limites de salinité et d'alcalinité permises sont généralement assez larges mais on se place souvent vers les minima, cela pour des raisons d'économie et de productivité, avec une salinité totale de 13g/L ; lorsque le carbone est apporté par le bicarbonate (Jourdan, 1997).

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>), mais ce dernier peut être remplacé en partie par de la soude caustique ou du carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) pour relever le pH initial du milieu de culture (par exemple 5g/L de bicarbonate et 1,6 g/L de soude donnent un pH de 10) ; le carbonate ou la soude peuvent même être la seule source d'alcalinité à condition de les transformer en bicarbonates par addition de CO<sub>2</sub> ou par exposition à l'air avant usage. La salinité complémentaire est apportée par les différents engrais et du chlorure de sodium. Le milieu de culture contenant des engrais va assurer la croissance des spirulines comme en agriculture habituelle: l'azote, le phosphore, le potassium sont les éléments classiques, mais le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau.

Une analyse de l'eau et du sel est utile pour calculer la dose de Mg, Ca et Fe à ajouter car un excès de ces éléments est nocif (perte de phosphore, floculation). L'eau, le sel et les engrais apportent généralement assez de micro-éléments (bore, zinc, cobalt, molybdène,

cuivre, etc.). Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite à respecter impérativement. C'est pourquoi on préfère souvent, au moins lors de la préparation du milieu de culture, utiliser un nitrate que l'on peut mettre à forte dose, constituant une réserve d'azote à long terme. Les spirulines consommeront d'abord l'ammoniac ou l'urée s'il y en a de disponibles. Une odeur persistante et forte indique qu'on a dépassé la limite en ammoniac et qu'il faut s'attendre à un mauvais état de la culture, passager ou irréversible selon la dose d'ammoniac présente (Jourdan, 1997).

### **1.3.4. Lumière et agitation**

Comme en diminuant l'éclairement on diminue aussi la photosynthèse totale, il faut si possible éviter la photolyse autrement. Deux conditions sont nécessaires. Ensemencer le bassin avec assez d'algues pour que la lumière ne puisse pas atteindre le fond du bassin. La vérification peut se faire avec un simple disque de Secchi. Agiter suffisamment la culture pour que les filaments individuels ne restent pas plus d'une demi-minute à la surface en plein soleil, mais plongent et remontent fréquemment.

Les roues à aubes constituent les systèmes d'agitation les plus utilisés; le but est de remuer l'eau et non de créer un dénivellement comme on le croit généralement (Fox, 1999).

L'emploi de longues roues à aubes flottantes est tout à fait possible dans de grands bassins peu profonds, car plus le bassin est grand, plus il est difficile de maintenir une roue à aubes conventionnelle. Au-delà de 4 à 5 m de longueur, il faut un palier intermédiaire qui sera dans le courant. Avec un bassin garni d'un film plastique, c'est difficile à réaliser en gardant l'étanchéité. La solution des longues roues est moins chère et demande moins d'énergie. Théoriquement, la photosynthèse la plus rapide serait obtenue avec une cadence des cycles ombre – lumière de mille par seconde ou plus. Pour le moment, ce n'est possible qu'en laboratoire. On peut tout de même obtenir une alternance de lumière et d'ombre toutes les quelques secondes, en mettant des déflecteurs dans le courant d'eau pour induire des turbulences; ainsi, on peut tripler facilement la production de biomasse – environ 30 g d'algue sèche par m<sup>2</sup> et par jour – par rapport à celle d'un bassin simplement agité par une roue à aubes (Fox, 1999).

### 1.3.5. Optimisation du rendement

La turbulence induite ramène le risque de photolyse pratiquement à rien. Après le couple de paramètres lumière/agitation, reste la température. Comme tout être photosynthétique, la spiruline perd de la biomasse sous forme de CO<sub>2</sub> pendant la respiration. Cette perte est plus grande si l'eau est plus chaude.

Si la température nocturne est basse, il y a peu de perte de la biomasse produite pendant le jour. Le mieux serait une nuit froide et un réchauffement immédiat de l'eau au lever du soleil pour avoir une photosynthèse maximale pendant le jour, en tenant compte que la spiruline présente une croissance optimale à 35°C. Comme elle possède des pigments aptes à absorber l'énergie de tout le spectre visible, la photosynthèse est là à son maximum. Si on crée une turbulence à l'aide de déflecteurs creux, dans lesquels circule de l'eau chaude au lever du soleil, la photosynthèse démarre tout de suite à plein quand il faudrait environ 3 heures pour que l'eau soit suffisamment chauffée par le soleil seul. Avec ces améliorations, la production d'un bassin enrichi en CO<sub>2</sub> et agité par des roues à aubes peut être considérablement améliorée. 10 g d'algue sèche par jour et par m<sup>2</sup> est un chiffre fréquent chez les producteurs commerciaux. Comme signalé précédemment, les déflecteurs peuvent tripler cette production. Si la culture est chauffée au lever du soleil, elle produit pendant un temps allongé de 30%. En ajoutant la moindre perte pendant la nuit, on peut compter sur environ 40g d'algue sèche/m<sup>2</sup>/j (Fox, 1999).

### 1.3.6. Suivi des cultures

Selon Fox, 1999 le diagnostic des couleurs fournit généralement une bonne appréciation de l'état de la culture :

Une couleur pâlie indique souvent un manque d'azote fixé et/ou de CO<sub>2</sub> et aussi, que du magnésium est nécessaire. Si l'examen au microscope ne montre qu'une couleur pâlie, il faut vérifier le pH. Une couleur pâlie, surtout manquant de pigment bleu (phycocyanine), avec un pH en dessous de 10,5, indique le manque d'azote fixé. Si la couleur pâle est due à des cellules « vides », la culture a probablement été stressée, soit par un changement brusque de pH, soit surtout par une brusque modification de la pression osmotique dans les cellules. S'il y a de l'écume, cela peut indiquer qu'en essayant d'équilibrer la pression dans les cellules avec celle du milieu brusquement plus chargé, la cellule a concentré son cytoplasme en expulsant les molécules plus légères. Dans ce

cas, il faut ramener la salinité totale à son niveau d'origine. Bien des algues mourront si le choc osmotique a été sévère. D'autres survivront et redémarreront la culture à la nouvelle salinité. Le problème est d'éliminer les cellules mortes et les polysaccharides gélatineux libérés dans l'eau. Les masses gélatineuses piègent les filaments d'algues vivants, et finalement les entraînent au fond, où ils meurent faute de lumière et d'accès aux éléments nutritifs.

Une agitation renforcée de la culture aide à maintenir à flot les polysaccharides et aide aussi les filaments à ne pas être pris dans les amas de polysaccharides, où les algues mourront. Les bactéries consommeront les polysaccharides, seront à leur tour consommées par les protozoaires. Ceux-ci mourront quand ils auront dévoré les bactéries au point de dépenser plus d'énergie à les poursuivre qu'ils n'en tirent de leur absorption. Alors le milieu sera reminéralisé et prêt pour les algues.

Si, sous forte lumière, la culture est jaune ou vert-olive, il y a photolyse, ou destruction de la chlorophylle. Dans les conditions les plus sévères : forte intensité lumineuse, sursaturation en oxygène et faible température, on peut perdre la culture en quelques heures. Une agitation renforcée peut réduire la concentration en oxygène et si possible la culture doit être ombragée. Quand la lumière est très intense, il faudra aussi une température élevée (38°C), une population dense et une forte agitation (turbulence) de la culture. Ces conditions favorisent la meilleure productivité. Une couleur jaunâtre avec écume peut signifier que les parois des cellules sont rompues, en expulsant des polysaccharides dans l'eau. Là aussi, il faut ombrager. Pour de petits bassins, on peut employer du filet plastique noir comme dans les serres horticoles, ou du tissu, ou des feuilles de palmier. On peut aussi abaisser le pH en jouant sur le CO<sub>2</sub> ou le bicarbonate et ajouter de l'azote fixé et du potassium. Si la culture est jaunâtre sur un fond d'eau grisâtre ou laiteux, les algues souffrent d'un défaut de carbone et peut-être d'azote, et de plus il y a beaucoup de bactéries.

Quand il n'y a plus de polysaccharides pour les bactéries, elles meurent. S'il n'y a pas de couleur, les algues sont piégées dans des amas de polysaccharides et entraînées au fond ou prises dans des cristaux de carbonate de calcium ou de phosphate. Ou peut-être ont-elles été dévorées par des prédateurs : larves de moustiques, larves d'*Ephydra* (mouche des marais salés), protozoaires tels l'amibe et les rotifères. Il n'y a rien d'autre à faire que de nettoyer le bassin et recommencer. Moins de filaments peut être le signe d'une récolte

trop poussée : le poids journalier de la récolte doit être constant ou en augmentation.

Une culture de microorganismes en plein air est facilement envahie par d'autres microorganismes apportés soit par l'air, soit par l'eau; Organismes fixés sur des poussières amenées par le vent, insectes, mains et pieds du personnel, excréments d'insectes ou d'oiseaux etc. L'algoculteur doit toujours garder un œil sur les contaminants que sont les bactéries, les autres micro-algues, les protozoaires et les larves d'insectes. D'où la nécessité d'avoir un petit laboratoire de contrôle.

### **1.4. L'importance de la spiruline pour la santé**

La spiruline est une algue microscopique qui permet de lutter contre la malnutrition (Auzias et Labourdette, 2009 ; Leclerc et Floc'h, 2010).

La spiruline peut aider à diminuer l'excès de cholestérol et à améliorer la santé. La spiruline est un concentré de nutriments essentiels comme les protéines et les vitamines B. seulement trois grammes par jour assurent la quantité suffisante en vitamine B12 et elle en contient deux fois plus que la viande. C'est pourquoi la spiruline est considérée comme la source la plus abondante de cette vitamine. Ce supplément alimentaire joue également un rôle dans la prévention de nombreuses maladies. Sa teneur en calcium, en potassium, en sodium, en phosphore et en fer est élevée. Ses effets contre l'anémie ont été démontrés grâce à sa haute teneur en fer. Le calcium et le potassium sont importants pour la formation des os, le sodium et potassium aident à maintenir l'équilibre acide-base (Grosgeat, 2009).

Les effets de la spiruline sur les maladies diabétiques et hépatiques ainsi que sur l'acné sont intéressants. Elle a un effet préventif contre le cancer grâce à sa haute teneur en antioxydants comme le phycocyanine. Une série d'études a été publiée décrivant les propriétés anti-inflammatoires de la phycocyanine, le pigment bleu de la spiruline, qui bien dosé, est l'élément clé de son action thérapeutique. Ce pigment inhibe une enzyme, la cyclooxygénase-2 (COX-2), fortement impliquée dans le processus inflammatoire. Les inhibiteurs synthétiques de cette enzyme sont aujourd'hui reconnus pour leur action en particulier dans le traitement de l'arthrite, sans les effets secondaires habituels des anti-inflammatoires synthétiques.

C'est un puissant détoxifiant du foie et des reins qui favorise la réduction du cholestérol. La spiruline est également riche en acides gras essentiels et recèle de la provitamine A (betacarotène) et de la vitamine B12. Ce serait le complément alimentaire

capable de rééquilibrer un régime peu varié. La spiruline est utilisée dans les régimes amincissants pour sa teneur élevée en phénylalanine (cet acide aminé est un réducteur normal d'appétit) (Grosogeat, 2009).

### **1.5. La spiruline et le diabète**

Il a été prouvé que la spiruline agit sur ce type de diabète en réduisant le taux sanguin de sucre et de cholestérol. L'ingestion quotidienne de spiruline est recommandée pour le contrôle du taux glyco-lipidique chez les diabétiques (Mani *et al.*, 1996). La fraction soluble dans l'eau de la spiruline a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum. La prise de 5g par jour a mis en évidence une amélioration et un meilleur contrôle du diabète (Hayashi, 1996).

La spiruline fait partie de la famille des super aliments. Elle aide à conserver une bonne santé en général et améliore la glycémie en particulier. Une petite étude indienne a montré que la simple prise de 2 g par jour pendant 2 mois permettait de mieux contrôler la glycémie grâce à sa richesse en antioxydants (Le-Bail, 2014).



## Chapitre 02 : LES PROBIOTIQUES

### 2.1. Généralités sur le système digestif

#### 2.1.1. Définition

Le système digestif est composé successivement de la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jejunum et iléon), le caecum, le côlon ou gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis se termine par le rectum et l'orifice anal.

La physiologie du tube digestif est constituée de 5 tuniques concentriques situées respectivement de la lumière vers l'intérieur de l'organisme.

La muqueuse, qui comporte un épithélium de revêtement ainsi qu'un tissu conjonctif sous-jacent : le chorion ou *lamina propria*, qui lui-même contient des tissus lymphoïdes diffus ainsi que des follicules lymphoïdes. La *muscularis mucosae*, la sous-muqueuse, la musculaire externe comprenant la partie circulaire interne et longitudinale externe ainsi que la tunique externe constituée par un tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins (André *et al.*, 2002).

La paroi du tube digestif comporte de nombreuses cellules immunitaires. Les plasmocytes et les lymphocytes T intra-épithéliaux sont principalement détectés au sein de l'épithélium. Les lymphocytes B et des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines A sont essentiellement répartis dans des follicules lymphoïdes au sein du tissu conjonctif du chorion de la muqueuse et de la sous muqueuse (Watterlot, 2010).

#### 2.1.2. L'intestin grêle

L'intestin grêle mesure 4 à 7 m chez l'homme. Les parois sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m<sup>2</sup> en moyenne. Les sécrétions intestinales permettent de maintenir un pH neutre ou légèrement basique au alentour de 8. L'intestin grêle est le siège de phénomènes d'absorption mais joue également un rôle dans les phénomènes de sécrétion et participe à la réponse immunitaire. Il comprend le duodénum (0,25 m), le jejunum (2,5 m) et l'iléon (3,5 m).

La muqueuse de l'intestin grêle comprend un étage composé de villosités ainsi qu'un étage composé de glandes de Lieberkühn (ou cryptes) (Rollan, 1997; André *et al.*, 2002).

Les villosités s'étendent vers la lumière et sont tapissées par l'épithélium prismatique simple constitué de plusieurs types cellulaires dont les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules neuroendocrines et au niveau de l'iléon, appartenant au système immunologique.

**Les entérocytes** sont les principales cellules de l'épithélium et sont plus spécifiquement responsables de la fonction d'absorption des nutriments.

**Les cellules caliciformes** sont des cellules à mucus qui permettent de protéger l'intestin de l'agression des sucs gastriques mais qui jouent également un rôle dans la protection vis-à-vis des bactéries de la lumière.

**Les cellules neuroendocrines** sont responsables de la sécrétion hormonale.

**Les cellules M**, (microfold cells) situées au niveau des plaques de Peyer (amas constitués de 20 à 40 lymphoïdes situés principalement dans la partie terminale de l'iléon, dans le chorion et dans la sous-muqueuse), jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire.

**Les cryptes** ou glandes de Lieberkühn sont composées de cellules immatures en prolifération donnant naissance à cinq types cellulaires : des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules « intermédiaires », des cellules neuroendocrines et au fond des cryptes les cellules de Paneth. Ces dernières, sont des cellules sécrétrices de lysozymes et de défensines qu'elles déversent dans la lumière des cryptes contribuant ainsi à l'effet barrière de la muqueuse intestinale (Watterlot, 2010).

### 2.1.3. Le côlon

De calibre plus large que l'intestin grêle, le gros intestin mesure environ 1,5 m de long, il comprend le côlon ascendant, transversal et descendant. Le pH est compris entre 4,7 et 7,5 respectivement dans sa partie proximale et distale. A la différence de la muqueuse de l'intestin grêle, le côlon ne comporte pas de villosités mais un épithélium plan (ou épithélium de surface), d'autre part, les cellules de Paneth y sont absentes. L'épithélium est constitué de colonocytes, cellules responsables de l'absorption de l'eau et des électrolytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Le chorion lui, est riche en tissu lymphoïde (Watterlot, 2010).

### 2.1.4. Le microbiote

L'écosystème est défini comme étant l'ensemble des structures relationnelles qui lient les êtres vivants entre eux et à leur environnement inorganique (Ellenberg 1973).

L'écosystème microbien digestif est composé du microbiote, de l'hôte et des aliments; il est responsable de l'homéostasie et participe au maintien de la santé de l'hôte.

Le microbiote comporte  $10^{14}$  micro-organismes vivant en symbiose avec l'hôte soit plus de 100 fois le nombre de cellules de l'organisme humain (Gill *et al.*, 2006). *In utero*, le tube digestif est stérile, les premières colonisations se font principalement par la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère lors de la naissance, ainsi que par l'environnement extérieur (O'Hara et Shanahan, 2006). Sa composition va par la suite évoluer en fonction de l'environnement et de l'alimentation de l'hôte, pour se stabiliser vers les deux ans de l'individu. Chaque homme possède donc son propre microbiote, reflet de son environnement. Chez l'individu sain, le microbiote, une fois stabilisé, ne subira que des changements ponctuels, conséquence de la prise d'antibiotiques ou d'un changement d'alimentation.

Très complexe et diversifié, le microbiote est composé d'environ 1000 espèces différentes réparties selon trois *phyla* majoritaires, le *phylum* des Firmicutes représentant 79% du microbiote, constitué principalement de bactéries à Gram positif à bas GC. La plus grande majorité des espèces des Firmicutes appartient à la classe des Clostridii parmi lesquels on retrouve les groupes *Clostridium coccoïdes* et *Clostridium. Leptum*. Moins de 5% des autres espèces du *phylum* Firmicutes appartiennent aux classes Mollicutes et Bacillii.

Les deux autres *phyla* majoritaires sont *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* qui représentent respectivement 17% et 3% de l'écosystème intestinal. Enfin, les autres *phyla* rencontrés sont principalement ceux des *Proteobacteria* et *Verrumicrobia* qui ne représentent que quelques pourcents des bactéries totales (Lay *et al.*, 2005; Tap *et al.*, 2009).

Parmi les espèces rencontrées au sein du tube digestif, 99% sont anaérobies. La concentration et la diversité bactérienne augmentent parallèlement avec l'augmentation du pH. La composition varie en fonction de la teneur en oxygène qui diminue le long du tube digestif, ainsi, l'estomac est constitué d'environ  $10^4$  unités formants colonies (UFC)/g de contenu, le duodénum et le jéjunum sont constitués de  $10^4$  à  $10^7$  UFC/g, la majeure partie étant des bactéries aérobies anaérobies facultatives (AAF) telles que des lactobacilles, des

streptocoques ou encore des entérobactéries. Dans l'iléon, la proportion augmente de  $10^5$  à  $10^7$  UFC/g, principalement constitué de bactéries AAF et anaérobies telles que *Bacteroides*, enfin le côlon contient  $10^9$  à  $10^{11}$  UFC/g de contenu principalement anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* (Butel et Collignon, 2004). On peut distinguer :

- Le **microbiote endogène** ou **autochtone**, qui colonise principalement le côlon et qui est capable de se multiplier *in vivo*,
- Le **microbiote en transit** ou **allochtone**, qui provient principalement de l'alimentation et persiste peu de temps au sein du tube digestif.

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions essentielles pour le maintien de la santé de l'hôte. Les principales fonctions du microbiote peuvent être définies selon 3 catégories:

### 2.1.4.1. Les fonctions métaboliques :

Le microbiote réalise la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et produit ainsi des acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate, de l'énergie et des vitamines essentielles au développement de l'hôte (Wong *et al.*, 2006; Macfarlane et Macfarlane, 2007).

### 2.1.4.2. Les fonctions trophiques

Le microbiote participe au développement de l'angiogénèse de l'intestin *via* les cellules de Paneth, et aide ainsi au développement du système immunitaire (Stappenbeck *et al.*, 2002; Macpherson et Harris, 2004).

### 2.1.4.3. Les fonctions de protection

Le microbiote permet d'augmenter l'effet barrière de la muqueuse intestinale en colonisant les sites de fixation à la muqueuse du tube digestif, en créant une compétition vis-à-vis des nutriments ou encore en libérant des composés anti-microbiens luttant ainsi contre les bactéries pathogènes (Hooper *et al.*, 2003).

### 2.2. Les probiotiques

Metchnikoff a été le premier à évoquer le concept de « probiotique » (Ducluzeau, 2002). Un panel d'experts des commissions « Food and Agriculture Organization of the United Nations » et de l'organisation mondiale de la santé ont défini en 2001 les probiotiques comme étant des « **micro-organismes vivants, qui, administrés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques pour son hôte au-delà de leurs valeurs nutritionnelles** » (FAO/WHO., 2001 ; Bergonzelli *et al.*, 2005).

Les effets des probiotiques sont multiples. Ils pourraient prévenir certaines maladies telles que les infections systémiques, les maladies diarrhéiques, le cancer et les allergies. Ils jouent un rôle important dans le traitement des maladies inflammatoires et de l'hypercholestérolémie. Ils permettent également d'alléger l'intolérance au lactose et de stimuler le système immunitaire. Ils procurent à leur hôte des propriétés nutritives par la production de métabolites tels que des acides aminés, des acides gras à chaîne courte et des acides lactiques (Neu et Caicedo, 2005).

Les probiotiques sont aujourd'hui les acteurs d'un grand mouvement marketing, on retrouve ainsi de nombreux aliments dans lesquels de telles souches sont rajoutées (Gilliland, 2001). Les principales souches utilisées en industries alimentaires sont *Lactobacillus casei* (dans l'Actimel de Danone) et *Bifidobacterium* (dans l'Activia de Danone). Le marché des pro- et prébiotiques (facteur de croissance des probiotiques) est en constante augmentation, pour exemple, le secteur nutrition médicale de Danone comprenant les produits phares Actimel et Activia atteint un chiffre d'affaire de 0,9 milliard d'euros en 2008 (Danone, 2008).

Afin de pouvoir exercer tous ces rôles bénéfiques pour la santé (Gomes et Malcata, 1999 ; Reyed, 2007), les probiotiques ingérés oralement au sein d'un aliment vont devoir résister à de nombreuses agressions. Ils vont pénétrer dans le côlon où ils doivent résister au pH acide et être actifs métaboliquement. Pour cela, ils vont rentrer en compétition avec une centaine d'autres espèces microbiennes. Cette compétition va s'effectuer majoritairement sur deux critères : la disponibilité en substrats et l'adhésion à l'épithélium intestinal (Gorbach *et al.*, 1967 ; Lee et Salminen, 1995 ; Vesa *et al.*, 2000 ; Abbott, 2004 ; Frick *et al.*, 2007).

Lors de ma thèse, je me suis intéressée principalement à des souches bactériennes d'un genre bactérien possédant des effets probiotiques anti-oxydants et antimicrobiennes reconnus : les souches du genre de *Bifidobacterium*.

### 2.2.1. Le genre *Bifidobacterium*

*Bifidobacterium. spp* est présente naturellement dans l'intestin qu'il colonise durant la première semaine après la naissance. Il fait partie des Actinobactéries, (Van Der Werf, 2001).

Les bifidobactéries sont à Gram positif, non sporulées, non mobiles, de morphologie variable, généralement anaérobies strictes et catalases négatives (Ventura *et al.*, 2004). De plus, leur génome a un contenu en G+C généralement élevé qui varie de 42 à 67 % (Felis et Dellaglio 2007). Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes et ont un optimum de croissance entre 36-38°C. Certaines espèces peuvent croître à des températures de 46,5°C et pour la majorité des espèces, il n'y a pas de croissance à des températures de 20°C et moins. Les bifidobactéries ont un pH optimum de croissances entre 6 et 7 et à un pH de moins de 5,5 il n'y a pas de croissance observée (Rasic et Kurmann, 1983 ; Dong *et al.*, 2000a et b). Chimio-organotrophes avec un métabolisme fermentaire, les bifidobactéries peuvent cataboliser plusieurs sources de sucre et toutes peuvent fermenter le glucose, le fructose et le galactose. Les hexoses sont dégradés par une voie métabolique particulière, la voie du fructose-6-phosphate «bifid shunt»; la fermentation de deux moles de glucose produit approximativement trois moles d'acide acétique, deux moles d'acide lactique et 2,5 moles d'ATP. L'enzyme clé de cette voie métabolique, la fructose 6-phosphokétolase, est considérée comme un identifiant taxinomique pour la famille des Bifidobacteriaceae (Schleifer et Ludwig 1995 ; Ventura *et al.*, 2004).

Les bifidobactéries possèdent des capacités hydrophobicité permettant d'augmenter l'adhésion aux surfaces (Ducluzeau, 1993, Kerckhoffs *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009), ils reconnaissent différents récepteurs de l'épithélium intestinal (Guglielmetti *et al.*, 2009) et leur capacité à dégrader les sucres complexes leur confère un avantage dans la compétition vis-à-vis des nutriments qui se révèle être un facteur déterminant pour l'implantation (Klijn *et al.*, 2005). De plus, ils sont capables de moduler la réponse immunitaire et de créer une tolérance vis à vis de l'hôte (Trebichavsky *et al.*, 2009). Ces propriétés leur permettent donc d'obtenir une capacité d'adhésion sur les cellules intestinales (Kojima 1970 ; Delgado *et al.*, 2008).

Outre la capacité à coloniser l'intestin, les bifidobactéries sont particulièrement adaptés aux stress rencontrés *in vivo* tel que le stress biliaire (Collado et Sanz, 2007; Masco *et al.*, 2007) et le pH acide rencontré dans l'estomac (Delgado *et al.*, 2008; Koll *et al.*, 2008).

Plusieurs investigations ont démontré que la résistance aux stress des bifidobactéries pouvait provenir de transporteurs. En effet, l'expression du gène codant pour le transporteur BL0920 présent au sein de la souche *B. longum* NCC2705 augmente d'un facteur 20 en présence de sels biliaires, son homologue a également été identifié au sein de la souche *B. breve* (Bbr0838). Ces travaux indiquent que ces transporteurs jouent probablement un rôle dans la résistance au stress biliaire des bifidobactéries (Gueimonde *et al.*, 2009). L'implication de certaines protéines telles que la protéine DnaK, sont également impliquées dans la réponse aux stress biliaire, osmotique et thermique (Sanchez *et al.*, 2005). Enfin, il a été démontré l'existence d'une corrélation entre la production d'exopolysaccharides et la résistance aux sels biliaires et au pH acide des bifidobactéries (Alp, 2009). La persistance au sein du tube digestif de souris par des bifidobactéries en transit peut s'élever à une dizaine de jours ce qui lui confère un excellent avantage pour agir en tant que probiotique (Sheehan *et al.*, 2007).

### 2.2.1.1. Historique

Les bifidobactéries ont été découvertes et isolées pour la première fois en 1899 par Tissier, à l'Institut Pasteur de Paris, à partir des selles d'enfants nourris au lait maternel, une bactérie anaérobie de morphologie bifide qu'il appela *Bacillus bifidus* (Matto *et al.*, 2004). Tissier a été le premier à suggérer qu'il existerait une corrélation entre la dominance numérique des bifidobactéries, les particularités nutritionnelles et l'état de santé des enfants (Tissier, 1906).

Tissier avait alors décrit ces organismes comme des bactéries anaérobies, Gram positif en forme de bâtonnet. Ces bactéries avaient alors reçu le nom de *Bacillus bifidus communis*. Au même moment, en Italie, Moro découvrait des bactéries semblables qu'il a identifiées comme des *Lactobacillus* (Weiss et Rettger, 1934 ; Ballongue, 1993).

De 1900 à 1957, *Bacillus bifidus communis* est incluse dans la famille des *Lactobacillaceae* sous le nom de *Lactobacillus bifidus* (Winslow *et al.*, 1917 ; Holland, 1920). En 1927, Orla-Jensen reconnaît l'existence du genre *Bifidobacterium* mais étant donné ses similitudes avec le genre *Lactobacillus*, les bifidobactéries resteront assimilées au genre *Lactobacillus* jusqu'en 1957. En 1957, Dehnart réalise qu'il existe plusieurs biotypes de *Bifidobacterium*. Il faudra attendre 1963 pour que Reuter découvre sept espèces du genre *Bifidobacterium*. C'est dans la 8<sup>ème</sup> édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Rogosa, 1974) que le genre *Bifidobacterium* est reconnu. Il est inclus dans la famille *Actinomycetaceae* de l'ordre des Actinomycetales (Biavati *et al.*, 2000).

Le genre *Bifidobacterium* comprend 29 espèces dont 10 sont considérées comme étant d'origine humaine alors que les autres sont isolées dans les fèces d'animaux divers (Curk *et al.*, 1994). Depuis 1994, trois nouvelles espèces ont été ajoutées à la liste (*B. lactis*, *B. inopinatum* et *B. denticolens*) pour un total de 32 espèces (Kaufman *et al.*, 1997).

### 2.2.1.2. Taxonomie des bifidobactéries

Le diagnostic de genre, espèce et souche sert non seulement à la découverte de nouveaux membres du genre *Bifidobacterium*, mais aussi à la validation ou à l'invalidation des espèces « statutaires » et à l'identification et quantification de ces microorganismes. Par exemple, les techniques de biologie moléculaire ont permis à Jiang et Dong (2002) d'exclure du genre *Bifidobacterium* deux espèces identifiées en 1996, *Bf. denticolens* et *Bf. inopinatum* et de décrire une nouvelle espèce, *Bf. scardovii* (Scardovi 1986 ; Kandler, 1970 ; Kaneko *et al.*, 2001 ; Satokari *et al.*, 2001 ; Jian *et al.*, 2001 ; Jiang et Dong, 2002 ; Hoyles *et al.*, 2002 ; Requena *et al.*, 2002).

La classification des bifidobactéries ne s'est pas faite sans heurt. Pendant plusieurs années, les bifidobactéries ont été classées parmi les bactéries du genre *Lactobacillus* et puis plus tard au genre *Actinomyces* (Poupard *et al.*, 1973). Le pourcentage de cytosine-guanine de l'ADN chez le genre *Bifidobacterium* est en moyenne de 61%. Mais chez le genre *Lactobacillus* il est de 32 à 53 % (Glick *et al.*, 1960 ; Dellaglio *et al.*, 1994 ; Biavati *et al.*, 2000). Actuellement, le genre, *Bifidobacterium* appartient à la famille des *Actinomycetaceae*.

### 2.2.1.3. Métabolisme

La majorité des bifidobactéries utilisent le lactose, le glucose, le galactose, le sucrose et le fructose l'amylopectine, l'amylose, le xylan, etc (Scardovi 1984 ; Reid *et al.*, 2003) comme sources de carbone. L'ammoniac est la seule source d'azote utilisée par la majorité des espèces de bifidobactéries. Contrairement aux autres bactéries lactiques qui dégradent le glucose via le système glycolytique ou encore par la voie des hexoses monophosphates, les bifidobactéries dégradent le glucose par la voie du fructose-6-phosphate. La dégradation du glucose par cette voie est rendue possible grâce à l'enzyme fructose-6-phosphate phosphocétolase, qui est particulière aux bifidobactéries et qui scinde le fructose-6-phosphate en acétylphosphate et en érythrose-4-phosphate (Rasic et Kurmann, 1983). Une étude faite sur 22 souches de bifidobactéries d'origine humaine a démontré que toutes les souches testées possédaient les activités  $\alpha$  et  $\beta$ -galactosidases et une activité  $\alpha$ -glucosidase (Desjardins *et al.*, 1990) Dans une autre étude menée par Roy et Ward (1992), l'activité  $\beta$ -glucuronidase, a été



détectée chez 6 souches de *Bifidobacterium dentium* qui a été isolée lors des caries dentaires chez l'humain et pour cette raison cette espèce n'est pas souhaitable dans la préparation d'aliments nutraceutiques. Grâce à l'activité  $\beta$ -glucuronidase (Scardovi et Trovatelli, 1965 ; Uesugi et Yajima, 1978; Shimamura *et al.*, 1992 ; Thompson *et al.*, 1996).

La voie métabolique du fructose-6-phosphate phosphocétolase produit de l'acide lactique et de l'acide acétique comme métabolites primaires en proportion de 2:3 (De-Vries *et al.*, 1967). Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide lactique. Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par la suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (De-Vries et Stouthamer, 1969; Lauer et Kandler, 1976).

Les bifidobactéries se distinguent des lactobacilles principalement par la production d'une enzyme caractéristique : fructose 6-phosphate phosphocétolase impliquée dans la voie métabolique de D-fructose-6-phosphate (De-Vries et Stouthamer 1967). Cette enzyme caractérise essentiellement les bifidobactéries provenant de l'humain, alors que les bifidobactéries isolées des animaux distinguent par le duo de substrat : Xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphocétolase (Meile *et al.*, 2001). Une autre enzyme clé intervenant dans la fermentation des sucres a été identifiée chez les bifidobactéries, il s'agit de la B-galactosidase qui catalyse les réactions d'hydrolyse et de transgalactosylation (Zarate et Lopez-Leiva, 1990 ; Hughes et Hoover, 1995 ; Meile *et al.*, 1997; Tannock *et al.*, 2004).

Du point de vue métabolique, les bifidobactéries posséderaient trois avantages sélectifs par rapport aux autres microorganismes de la flore intestinale :

- la capacité à fragmenter des structures glucidiques complexe par synthèse et sécrétion de glycosidases extracellulaires ;
- la capacité à transporter des mono et oligosaccharides ainsi obtenus par des systèmes spécifiques de transport ;
- la capacité à dégrader des structures saccharidiques par des glycosidases intracellulaires et par des enzymes spécifiques des voies cataboliques des monosaccharides.

### 2.2.1.4. Les facteurs bifidigènes

Au niveau du colon, le milieu intestinal est caractérisé par son acidité (pH 5,1), qui exerce un effet bactériostatique sur de nombreux germes Gram-négatifs.

Cette acidité est due à l'acide carbonique produit par le *Bifidobacterium bifidum*, précédemment appelé *Lactobacillus bifidus*. Il prolifère largement dans le milieu intestinal de l'enfant nourri au sein. Il se développe grâce à des facteurs de croissances spécifiques : facteur bifidus à base d'oligosaccharides azotés, de glycopeptides (Vermeil et *al.*, 2003).

Un facteur Bifidus (facteur bifidigènes) est un composé qui précisément améliore la croissance des bifidobactéries soit dans un produit ou dans les intestins des humains ou des animaux. Plusieurs produits ont été commercialisés en tant que facteurs bifidogènes, comme plusieurs prébiotiques et de méthyl-N-acétyl-D-glucosamine (Thibault et Levasseur, 2001).

Il existe au moins 2 type de facteurs bifidigènes, thermostables pour *B. bifidum* et thermolabiles pour *B. infantis* (Romond et *al.*, 1980 ; Misra et Kuila, 1992).

- **Facteur bifidus I et II**

Les facteurs bifidus I sont représentés par des sources contenant du N-acétylglucosamine. On les rencontre dans différentes sécrétion humaines :

Le liquide amniotique et le lait maternel en contiennent (sous la forme de gynolactose) (Beerens et *al.*, 1980 ; Tamura, 1983). Ces facteurs stimulent essentiellement la croissance de *Bf. bifidum*. Les mucines de porcs et de rongeurs en présentent également. Ces facteurs sont utilisés comme source d'énergie par *Bf. bifidum* (Proulx et *al.*, 1992).

Les facteurs bifidus II sont obtenus au cours de la digestion par la voie enzymatique par action de la trypsine, la chymotrypsine, l'alcalase ou la papaine sur les protéines (Proulx et *al.*, 1992). Ces facteurs sont présents dans le lait maternel et dans le foie. L'addition de ces facteurs dans les produits lactés augmente le nombre de ces bactéries dans les selles et diminue le pH jusqu'à une valeur proche de celle des selles de nourrissons allaités au lait maternel (Modler et *al.*, 1990).

- **Les oligosaccharides**

Les oligosaccharides sont des facteurs de croissances pour les bifides. Ces germes colonisent le tube digestif du nourrisson allaité et assurent la fermentation du lactose et des lactosamines en acide lactique et acétique (FAO, 1995).

Le raffinose est un oligosaccharide naturel métabolisé par des espèces de bifidobactéries (Yazawa et *al.*, 1978 ; Terada et *al.*, 1992 ; Dubey et Mistry, 1996). Il existe même des oligosaccharides de synthèse tels que le fructo-oligosaccharides et le transgalactoside-oligosaccharides. Ces composés ne sont pas fermentescibles dans la bouche. Ils sont indigestes dans l'intestin grêle, mais totalement dégradables dans le colon (Champagne et *al.*, 2005).

Selon Wijisman et *al.*, (1989) les oligosaccharides de synthèse ont un grand intérêt au laboratoire pour un isolement sélectif des bifidobactéries à partir d'un produit polymicrobien tels que les selles.

- **Les autres facteurs bifidigènes**

L'addition de jus de carotte ou de ses constituants tels que l'acide pantothénique, l'acide 3-phosphocoenzyme A-5-sulphonique, ou l'acide 4-phosphopantétheine -5-sulphonique, aux milieux de culture augmente la croissance des bifidobactéries (Romond et Romond, 1987).

### **2.2.1.5. Niche écologique des bifidobactéries**

Les bifidobactéries font partie de la flore prédominante de l'intestin chez les humains et les animaux à tous les stades de vie. La composition de la flore dominante chez l'humain change au cours des différents stades de vie. Chez un jeune enfant nourri au lait maternel, la flore intestinale est composée de 85-99% de bifidobactéries et les principales espèces retrouvées sont *Bifidobacterium infantis* et *Bf. bifidum*. Les entérocoques, les coliformes et les lactobacilles représentent environ 1-15% de la flore fécale alors que les bactéroïdes et les clostridies représentent sont absents (Rasic et Kurmann, 1983, Fuller 1989).

Le lait maternel contient des facteurs, tels que des oligosaccharides comme le galactose, le fructose et le N-acetylglucosamine, qui stimulent la croissance des bifidobactéries (Bezkorovainy et Miller-Catchpole, 1989). L'absence de ces facteurs dans les préparations de

laits pourrait expliquer la différence observée entre les flores des enfants nourris au lait maternel et ceux nourris au lait de vache (Tamime *et al.*, 1995).

La flore des enfants sevrés représente une transition entre la flore infantile et la flore adulte. Plusieurs espèces telles que les bactéroïdes, les eubactéries, les fusobactéries, les peptostreptocoques et les clostridies apparaissent dans la flore fécale. Les bifidobactéries deviennent moins prédominantes (Rasic et Kurmann, 1983). La flore adulte devient plus complexe et la flore dominante est composée de bactéroïdes. Bien que les bifidobactéries ne soient plus prédominantes, elles demeurent un des groupes les plus importants de la flore intestinale. Les espèces de bifidobactéries les plus retrouvées chez l'adulte sont *Bifidobacterium adolescentis* et *Bf. longum*. Certains autres facteurs tels que l'origine ethnique de l'homme, des troubles intestinaux et le type d'alimentation expliquent la différence de composition de la flore intestinale observée entre individus (Tamime *et al.*, 1995).

Les souches de bifidobactéries identifiées chez l'humain (Tableau 2 et 3) sont entre autres : *Bf. catenulatum*, *Bf. adolescentis*, *Bf. longum*, *Bf. breve* (Savage, 1977 ; Scardovi, 1984 ; Lauer et Kandler, 1983). Tandis que le groupe de bifidobactéries d'origine animale (Tableau 4) (Mayrhofer *et al.*, 2011) par exemple Cinq espèces de *Bifidobacterium* ont été détectées chez les volailles : *Bf. thermophilum*, *Bf. animalis*, *Bf. pseudolongum*, *Bf. galinarum*, et *Bf. pullorum* (Mitsuoka 1969 ; Matteuzzi *et al.*, 1971; Scardovi et Trovatelli, 1974 ; Watabe *et al.*, 1983 ; Simpson *et al.*, 2003 ; Robert, 2009)

Scardovi et Travatelli (1969) et Biavati et collaborateur (1982) ont identifié trois espèces de *Bifidobacterium*, *Bf. asteroides*, *Bf. coryneforme* et *Bf. indicum* chez les abeilles.

Trois espèces de bifidobactéries ont été isolées à partir des eaux usées (Tableau 5): *Bf. minimum*, *Bf. subtile* et *Bf. thermacidophilum* (Biavati *et al.*, 1982 ; Dong *et al.*, 2000a et b).

**Tableau 2 :** Distribution des différentes espèces de *Bifidobacterium* dans le tractus digestif de l'homme en fonction de l'âge (Ballongue, 1993).

Population	Espèces mineurs	Espèces majeures
Jeunes enfants nourris au sein		<i>Bf. longum</i> , <i>Bf. infantis</i> <i>Bf. breve</i>
Jeunes enfants nourris au biberon	<i>Bf. bifidum</i> biovar. b	<i>Bf. adolescentis</i>
Enfants et adolescents		<i>Bf. infantis</i> ; <i>Bf. breve</i> ; <i>Bf. bifidum</i> biovar b ; <i>Bf. longum</i>
Adultes	<i>Bf. bifidum</i> biovar. A	<i>Bf. adolescentis</i> biovar. a et b
Personne âgées		<i>Bf. adolescentis</i> biovar b <i>Bf. longum</i>

**Tableau 3 :** Espèces de bifidobactéries d'origine humaine.

Espèce	Niche écologique	Référence
<i>Bifidobacterium asolescentis</i>	Intestin adulte	Reuter (1963)
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Intestin adulte	Scardovi et Crociani (1974)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Intestin (enfant, adulte), vagin	Tissier (1900)
<i>Bifidobacterium breve</i>	Intestin enfant, vagin	Reuter (1963)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Intestin (enfant, adulte), vagin	Scardovi et Crociani (1974)
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Cavité buccale (caries dentaires), intestin adulte, vagin	Scardovi et Crociani (1974)
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Intestin adulte	Lauer (1990)
<i>Bifidobacterium longum</i> biovar <i>longum</i>	Intestin (enfant, adulte), vagin	Reuter (1963)
<i>Bifidobacterium longum</i> biovar <i>infantis</i>	Intestin enfant, vagin	Reuter (1963) ; Sakata et al. (2002)
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Intestin enfant	Scardovi et al. (1979)
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Intestin	Hoyles et al. (2002)
<i>Bifidobacterium urinalis</i>	Tractus urogénital	Hoyles et al. (2002)

**Tableau 4** : Espèces de bifidobactéries d'origine animale.

Espèce	Niche Ecologique	Référence
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Intestin rat, poule, lapin, veau	Mitsuoka (1969)
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Abeilles	Scardovi et Trovatelli (1969)
<i>Bifidobacterium boum</i>	Rumen de bovin, intestin porcelet	Scardovi et al. (1979)
<i>Bifidobacterium choerium</i>	Intestin porcelet	Scardovi et al. (1979)
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Abeille	Scardovi et Trovatelli (1969) Biavati et al. (1982)
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Intestine lapin	Scardovi et al. (1979)
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	Intestine (caecum) poule	Watabe et al. (1983)
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Abeille	Scardovi et Trovatelli (1969)
<i>Bifidobacterium longum</i> biovar suis	Intestine porc	Matteuzzi et al. (1971) Sakata et al. (2002)
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Intestin lapin	Scardovi et Zani (1974)
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Rumen de bovin	Biavati et Materelli (1991)
<i>Bifidobacterium pseudolongum, subsp. Globosum</i>	Intestin porcelet, poule, lapin, veau, rumen de bovin	Yaeshima et al. (1992)
<i>Bifidobacterium pseudolongum, subsp. Pseudolongum</i>	Intestin porcelet, poule, lapin, veau, rumen de bovin	Mitsuoka (1969)
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Intestin poule	Trovatelli et al. (1974)
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Rumen de bovin	Biavati et Matarelli (1991)
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	Intestin de lapin	Biavati et al. (1992)
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Rumen bovin, intestin porc, poule, veau	Mitsuoka (1969)

**Tableau 5** : Espèces de bifidobactéries d'origine environnementale.

Espèces	Niche écologique	Références
<i>Bifidobacterium animalis, subsp. lactis</i>	Lait fermentés	Klein et al., 1998.
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Eaux usées	Biavati et al., 1982
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	ND*	Simpson et al., 2003
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Eaux usées	Biavati et al., 1982
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	Eaux usées	Dong et al., 2000a

\*ND = non définie

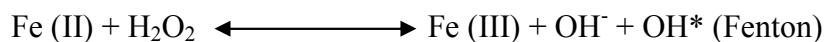
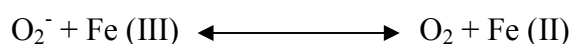
## Chapitre 03 : Le stress, les antioxydants et le diabète

### 3.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les systèmes de défenses antioxydants, en faveur des premières (Sies, 1991).

La formation incontrôlée d'espèces réactives de l'oxygène comme l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le radical hydroxyle ( $OH^*$ ) aura des conséquences souvent lourdes pour l'organisme. Mais la formation d'espèces réactives n'est pas toujours synonyme de toxicité. En effet, certaines sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux. Ce n'est que lorsque les systèmes de défense sont dépassés et ne suffisent plus à neutraliser la surproduction de ces espèces que la toxicité apparaît (Pincemail et *al.*, 1999).

Un stress oxydatif pourra induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, le radical hydroxyle, présenté comme le plus toxique malgré sa faible diffusion, peut attaquer tous les types de constituants cellulaires et engendrer diverses altérations (dégradation protéique, inactivation enzymatique, lipoperoxydation, adduits à l'ADN, etc.) (Dringen et Hamprecht, 1997). Il résulte de la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène et peut aussi être produit par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss (Das et *al.*, 2015):



#### 3.1.1. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme une molécule ou un atome ne contenant qu'un seul électron (électron célibataire) sur son orbitale externe (couche de valence). Cet électron célibataire offre une très grande réactivité chimique au « radical libre ». Ces radicaux libres sont produits dans tous les tissus et cellules de l'organisme. Leur existence est généralement, de courte durée (de quelques nanosecondes à quelques secondes, selon la molécule) (Poortmans et Boisseau, 2009).

### 3.1.1.1. La production des radicaux libres

La molécule d'oxygène contient 2 électrons célibataires sur son orbitale externe. Sa réactivité dépend de cette propriété radicalaire, principalement en présence de donneurs d'électrons. La majorité de l'oxygène capté par nos cellules est réduite en eau par l'intermédiaire du cytochrome oxydase mitochondriale. Cette opération requiert 4 électrons par molécule d'O<sub>2</sub> :



Il existe toute fois des étapes intermédiaires dans la réduction de l'oxygène en H<sub>2</sub>O. Par ajout de 1, 2, 3 électrons, on obtient respectivement le radical libre « l'anion superoxyde », le « peroxyde d'hydrogène » et le radical libre « le radical hydroxyle » (Poortmans et Boisseau, 2009).

La disparition du radical hydroxyle -OH est ultrarapide (demi-vie égale à 10<sup>-9</sup> seconde) mais celle du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et celle de l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>\*</sup> sont soumises à une décomposition enzymatique. Au repos, on considère généralement que 2-3 % de l'oxygène mitochondrial se convertit en ion radical libre superoxyde (Halliwell et Gutteridge, 1999).

L'anion superoxyde se dismute rapidement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> par l'enzyme superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène, produit toxique, se transforme en acide hypochloreux, HOCl, grâce à une myéloperoxydase et en radical hydroxyle HO<sup>\*</sup> par l'intermédiaire d'un ion Fe<sup>2+</sup>. Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitreux), NO réagit également avec l'anion superoxyde pour former un composé le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) qui se décompose en radical hydroxyle (toxique) et en NO<sub>2</sub> (Poortmans et Boisseau, 2009).

### 3.1.1.2. Conséquences de la présence des radicaux libres

Les dérivés radicaux libres de l'oxygène réagissent particulièrement sur les macromolécules lipidiques, protéiques, glucidiques et nucléiques. La réaction initiale stimule d'autres réactions, ce qui accroît la production de radicaux libres. Les radicaux libres ont des cibles (préférées) : ce sont les acides gras polyinsaturés (fixation de R<sup>\*</sup> sur les doubles liaisons), les protéines (modification de leur structure) et l'ADN (rupture des chaînes bicaténaires) (Halliwell et Gutteridge 1999 ; Gardès-Albert *et al.* 2003)



Le résultat de ces perturbations est un dysfonctionnement cellulaire menant à des désordres inflammatoires, à des troubles immunologiques, à des problèmes neurologiques, à des mutations génétiques, au vieillissement (Poortmans et Boisseau, 2009).

### 3.1.2. La défense de l'organisme contre les radicaux libres

L'organisme se défend contre la formation et la propagation des radicaux libres par deux mécanismes distincts (Halliwell Gutteridge 1999 ; Bergendi *et al.*, 1999 ; Wong *et* Wessel, 2005) :

-L'intervention d'enzymes qui catalysent une réaction éliminant les molécules réactives, Ces enzymes comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX). La SOD existe sous 2 formes : une forme Cu-Zn-SOD qui protège le cytosol et une forme qui protège la mitochondrie.

-L'utilisation de substances qui piègent les radicaux libres dès leur apparition (les antioxydants). Les antioxydants, « substances présentes en faibles quantité capables de retarder ou prévenir l'oxydation d'une substance oxydantes ».

## 3.2 Les antioxydants

En conditions normales, le métabolisme aérobie chez les mammifères génère des substances réactives de l'oxygène, lesquelles sont susceptibles de créer d'importants préjudices à l'organisme. Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé des populations. Il est souvent initié et propagé par une surproduction d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  et par leur conversion en de puissants oxydants qui sont très dommageables pour les cellules. Cependant, en guise de protection, les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non-enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant résultant du métabolisme aérobie et que l'on appelle antioxydants.

Les antioxydants ont comme principal rôle de neutraliser et de dégrader les radicaux libres toxiques pour les tissus (Halliwell et Gutteridge 1999).

La neutralisation des produits des réactions radicalaires de  $^{\circ}OH$  est considéré une réaction importante et serait à la base de l'effet des antioxydants contenus dans alimentation sur l'incidence de certaines maladies (Tedesco *et al.*, 2000 ; Youdim *et al.*, 2000 ; Sandoval *et al.*, 2002 ; Benedetti *et al.*, 2004 ; Kitagawa *et al.*, 2004 ; Balasundram *et al.*, 2004 ; Grabmann *et al.*, 2005 ; Colado-Simao *et al.*, 2006). Un antioxydant est n'importe quelle

substance, qui quand elle est présente en des concentrations faibles, comparées à ceux d'un substrat oxydable, retarde de façon significative, ou empêche, l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1995 ; Gutteridge et Halliwell, 2000). Les antioxydants biologiques sont des substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères possibles des processus ou réactions engendrant une oxydation excessive (Solzbach et *al.*, 1997 ; Ostrakhovitch et Afanas'ev, 2001 ; Miquel, 2002 ; Boldyrev, 2005). Les antioxydants sont donc des molécules qui peuvent prévenir la formation des ERO, ou qui peuvent réagir avec ces derniers pour les neutraliser.

### 3.2.1 Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles (Pastre, 2007).

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories (Tableau 6) avec :

- les enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme.
- les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules (Pastre, 2007).

**Tableau 06** : Les deux types de protections antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants (Pastre, 2007)

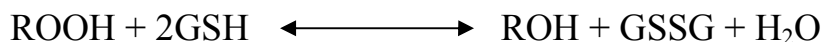
<b>Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes</b>	<b>Systèmes antioxydants d'origine alimentaire</b>
<b>Superoxyde dismutase</b> <b>Glutathion peroxydase</b> <b>Catalase(s)</b> <b>Lipases, protéases, endonucléases</b> <b>(éliminent les molécules oxydées)</b> <b>Albumine, ferritine (complexent les ions divalents)</b>	Vitamine E Vitamine C Taurine Caroténoïdes (lycopène, lutéine...) Polyphénols Minéraux et oligo-éléments

### 3.2.2. Les systèmes de défense antioxydant

#### 3.2.2.1. Système enzymatique

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène, (Amzal, 2008) :

- **les peroxydases** qui catalysent la réduction conjoint d'un hydroperoxyde et d'un peroxyde organique, le glutathion (GSH), suivant la réaction :



Le maintien d'activité peroxydase implique le recyclage NADPH- dépendant du glutathion réduit par une glutathion réductase, le NADPH étant produit par la voie des pentoses phosphates ( $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ ). En outre, il y a plusieurs peroxydases liées au GSH autant cytosolique, mitochondriale que membranaire :

#### **-GSH peroxydase sélénium-dépendante (Se-GSH-Px) :**

Les GSH-Px sont impliquées dans la défense de l'organisme contre les espèces réactives de l'oxygène. Elles constituent la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes (peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydroperoxydes organiques ROOH) dans la plupart des cellules et des compartiments subcellulaires (Scholz *et al.*, 1997)

**-Phospholipide-hydroxyperoxyde-GSH peroxydase (PLOOH-GSHPx)** (Krinsky, 1992). Cette enzyme agit directement sur les hydroxyperoxydes phospholipidiques, sans hydrolyser les hydroxyperoxydes d'acides gras à partir des phospholipides ( $\text{PLOOH} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{PLOOH-GSHPx}} \text{phospholipide LOH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ ).

#### **-GSH transférases :**

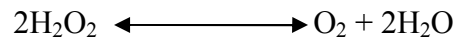
Certains dérivés des hydroxyperoxydes ne sont pas des substrats pour la GSH-Px. Ces dérivés, ainsi que les «aldéhydes de coupure» provenant de la peroxydation lipidique, dont le 4-Hydroxynonanal (HNE), sont détoxiqués sous forme d'acides mercapturiques issus de l'action successive d'une GSH-S-transférase (Chen *et al.*, 1998a), de l'alpha-glutamyl transpeptidase puis d'une peptidase.

- **Les superoxydase dismutases**, métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, moins réactif, suivant la réaction :



Elles constituent une première ligne de défense très efficace en empêchant l'accumulation cellulaire de superoxyde. Il y a trois isoenzymes, deux cytosoliques (une cupro-zincique et une ferrique) et l'autre mitochondriale (manganèse).

- **Les catalases** : cette enzyme est présente principalement dans les peroxysomes « riches en oxydases génératrices de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) » et les hématies. Les catalases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire :



### 3.2.2.2. Système non enzymatique

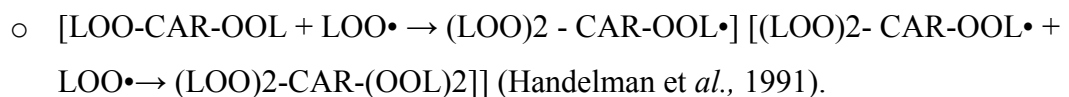
L'action protectrice enzymatique est renforcée par celle de différents composés réducteurs se comportant comme des piègeurs stoechiométriques (Kikugawa et Beppu, 1987). Ils protègent les biomolécules (acides nucléiques, les protéines, les lipides...). Leur action peut être paradoxale, car selon la composition de leur environnement, sous certaines conditions (présence de métaux de transitions), ils peuvent se comporter comme des pro-oxydants (l'acide ascorbique ne peut exercer son action antioxydant qu'en l'absence d'ions de métaux de transition) (Halliwell et Gutteridge, 1990).

Les molécules et les macromolécules pouvant agir comme piègeurs sont présentes dans les compartiments extra et intracellulaires. Les plus importantes sont présentées ci-dessous selon leurs lipophilicités.

**-Tocophérols (incluant la vitamine E)** : ils inhibent la propagation de la peroxydation lipidique (Burton et Ingold, 1984). Ce sont d'excellents piègeurs de radicaux lipidiques, tout particulièrement LO• et LOO•.

L'alpha-tocophérol agit en se convertissant en radical alpha-tocophéroxyle, peu réactif. Ensuite, le radical migre à la surface de la membrane où il est reconverti en alpha-tocophérol via l'ascorbate (Wefers et Sies, 1988).

**-Caroténoïdes**: les caroténoïdes, dont la vitamine A, sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires grâce à leur système conjugué de doubles liaisons (Packer et *al.*, 1981 ; Krinsky, 1992). La beta carotène réagirait directement avec le radical peroxyde (LOO•) (Burton et Ingold, 1984) neutralisant au moins deux radicaux peroxydes :



**-Bilirubine** : C'est le produit final du métabolisme de l'hème. La bilirubine peut inhiber efficacement la peroxydation lipidique via un mécanisme qui s'apparenterait à celui de l'alpha-tocophérol (Stocker *et al.*, 1987).

**-Acide ascorbique (C-OH)** : joue un rôle très important en assurant la régénération de l'alpha-tocophérol en se transformant en un radical très peu réactif (C-O•) (Bielski *et al.*, 1975) à partir duquel l'acide ascorbique est régénéré grâce à une NADH réductase. Il est peu probable que l'acide ascorbique piège directement les radicaux hydroxyles.

**-Acide urique** : A des concentrations physiologiques, il présente une activité antioxydante soutenue vis-à-vis des radicaux hydrosolubles tel l'hydroxyle (Ames *et al.*, 1981). Cependant, il est inefficace contre les générateurs de radicaux liposolubles.

**-Le sélénium** : Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes, et à l'activité biologique antiradicalaire des sélénoprotéines (Burk, 2002).

**-Le zinc** : Le zinc (Zn) joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD (Powell, 2000). Il inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène ERO par les métaux de transitions, en entrant en compétition avec le fer et le cuivre dans la réaction de Fenton. Le zinc protège les groupements thiols des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires. L'activité antioxydante du zinc pourrait également passer par l'induction de metallothionéines pouvant piéger les ERO (Tato-Rocha *et al.*, 1994).

**-Polyphénols** Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre *et al.*, 2005).

**-Protéines de fixation des métaux** : elles diminuent la concentration des métaux de transition capables de réagir avec les hydroxyperoxydes. On retrouve :

- **la transferrine**, qui ne transporte que de 20 à 30 % de sa capacité totale de fixation de fer, maintenant ainsi le fer libre plasmatique à des niveaux très faibles (Gutteridge *et al.* 1982);

- **la lactoferrine**, qui est produite par les neutrophiles et qui est similaire à la transferrine;
- **la céruloplasmine**, qui a deux mécanismes antioxydants : la fixation des ions cuivre et l'oxydation du  $Fe^{2+}$
- **l'albumine** par fixation des ions cuivre (Gutteridge et Wilkins, 1983).

**-Protéines liant l'hème libre et protéines liant les protéines hémiques** : l'hème libre et les protéines hémiques (ex. : hémoglobine et myoglobine) sont des pro-oxydants. Ils peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène et entretenir la peroxydation lipidique. La protection contre ces événements est assurée par deux protéines : l'haptoglobine qui se lie fortement à l'hémoglobine, et l'hémopexine, qui se lie à l'hème libre, formant des complexes éliminés rapidement par l'organisme (Oshiro et Nakajima, 1988).

### 3.3. L'activité anti-oxydantes et la spiruline

La spiruline étant particulièrement riche en antioxydants puissants comme le  $\beta$ -carotène, la vitamine E, le zinc, le sélénium, la superoxyde dismutase, il est logique qu'elle ait des propriétés antioxydantes et antiradicalaires.

Des études ont remarqué que l'extrait alcoolique de spiruline empêchait de manière plus significative la peroxydation des lipides, par rapport aux antioxydants chimiques: inhibition de 65% contre 35% avec l' $\alpha$ -tocophérol, 45% avec le butylhydroxyanisol et 48% avec le  $\beta$ -carotène (Manoj et *al.*, 1992).

L'extrait aqueux de spiruline a également montré un effet antioxydant plus puissant (76%) que l'acide gallique (54 %) et l'acide chlorogénique (56%). Un aspect intéressant de leurs résultats est que l'extrait aqueux avait une activité antioxydante significative même après l'enlèvement des polyphénols (Manoj et *al.*, 1992).

Dans une autre étude, par Zhi-gang et *al.* (1997), les effets antioxydants de deux fractions d'un extrait d'eau chaude de spiruline ont été étudiés en utilisant trois systèmes qui produisaient des radicaux superoxyde ( $O_2\bullet$ ), lipidiques et hydroxyle ( $OH\bullet$ ). Les deux fractions ont montré la capacité significative à débarrasser les radicaux hydroxyles (radicaux les plus fortement réactifs de l'oxygène), sans aucun effet sur les radicaux superoxyde. Une fraction a permis un nettoyage significatif des radicaux lipidiques, même à faible concentration.

### 3.4. L'activité anti-oxydante et les probiotiques

Les bactéries ont également besoin de développer des systèmes antioxydants afin de lutter contre les dérivés toxiques de l'oxygène. La présence de SOD a été identifiée chez *Lactococcus. lactis*, *Enterococcus faecalis* et *Aerococcus viridans*. Chez d'autres bactéries lactiques telles que *Lactobacillus. plantarum*, *Lactobacillus. casei* ou encore *Lactobacillus. fermentum*, la SOD est remplacée par une concentration élevée de manganèse capable d'éliminer O<sub>2</sub><sup>°</sup>. (Archibald et Fridovich, 1981).

Enfin, chez certaines souches telles que *Lactobacillus. casei* ATCC 334, la présence du gène *sodA* dans le génome a été mise en évidence sans pour autant que la SOD soit exprimée. En ce qui concerne la CAT, sa présence chez les bactéries lactiques n'est pas évidente, une CAT à manganèse a été identifiée chez *Lactobacillus. plantarum* ATCC14431 (Kono et Fridovich, 1983). Certains gènes codant pour des CAT héminiques ont également été identifiés chez les bactéries lactiques mais ces dernières restent inactives sans apport d'hème au sein du milieu extérieur (Mares et al., 1994; Abriouel et al., 2004).

### 3.5. Stress oxydant et le diabète

#### 3.5.1. Définition du Diabète

Selon l'O.M.S., le diabète sucré est caractérisé par une hyperglycémie permanente et des troubles du métabolisme des glucides, des lipides, et des protéines associées à des déficits absolus ou relatifs de l'action et de la sécrétion d'insuline (OMS, 1980).

L'insuline est en effet la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme, elle est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle stimule l'absorption du glucose sanguin par les tissus dits insulino-dépendants (foie, muscles squelettiques et tissu adipeux) et son stockage sous forme de glycogène. De plus, elle inhibe les voies de production hépatique de glucose (néoglucogenèse et glycogénolyse).

Elle intervient dans la régulation du métabolisme lipidique en inhibant la lipolyse des triglycérides adipocytaires et en facilitant leur synthèse, ainsi que celle de protéines dans le foie et le tissu adipeux. Dans les tissus non insulino-dépendant comme le cerveau ou la rétine, l'absorption et le métabolisme glucidique sont au contraire proportionnels à la concentration sanguine en glucose et sont donc plus élevés au cours du diabète (Rodier 2001 ; Capeau et al., 2012).

Il existe deux principales formes cliniques de diabète correspondant à deux mécanismes pathogéniques différents : le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1 et le diabète non insulino-dépendant ou diabète de type 2

### **3.5.1.1. Le diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1**

Le diabète de type 1 ou DID, représente environ 10% des cas de diabète mondiaux (Peter-Riesch *et al.*, 2002). Il apparaît le plus souvent chez l'enfant et le jeune adulte, c'est pourquoi il est aussi appelé « diabète juvéniles ». Les symptômes classiques les plus manifestes sont une sécrétion excessive d'urine (polyurie), une sensation de soif (polydipsie) ainsi qu'une perte de poids (Grimaldi *et al.*, 2001).

Le diabète de type 1 est caractérisé par l'incapacité du pancréas à sécréter l'insuline. Par conséquent, même après un repas, il y a peu ou pas d'insuline dans le sang, entraînant ainsi une hausse de la glycémie. L'injection d'insuline doit être faite de manière périodique afin de maintenir la glycémie à un niveau normal (Boitard, 2002)

### **3.5.1.2. Diabète non insulino-dépendant (DNID)**

Le diabète de Type 2 ou DNID est de loin la forme de la maladie la plus fréquente puisqu'elle présente 90% des cas mondiaux. Le diabète de type 2 est aussi appelé « diabète mature » car il survient le plus souvent chez l'adulte, autour de la cinquantaine, sa prévalence augmente avec l'âge (Peter-Riesch *et al.*, 2002 ; Dey, 2002a). Les sujets atteints sont généralement en surcharge pondérale (Girardin et Schwitzgebel, 2007). L'installation de la maladie est en effet insidieuse et les symptômes sont souvent moins marqués que dans le diabète de type 1 pouvant même être inexistant au début.

L'hyperglycémie des diabétique de type 2 est la conséquence de deux grand mécanismes physiopathologiques.

Le premier correspond à une diminution de la sensibilité tissulaire à l'action de l'insuline (insulino-résistance) touchant les tissus périphériques que sont le muscle, le tissu adipeux et le foie. Cette résistance découle d'une altération de la signalisation de l'insuline qui toucherait notamment le nombre de récepteurs à insuline et/ou leur affinité pour l'hormone et le nombre de transporteurs membranaires dépendants de l'insuline qui permettent l'entrée du glucose dans les cellules (Dagogo et Santiago, 1997 ; Féry et Paquot, 2005).



Le deuxième phénomène consiste en une anomalie de l'insulino-sécrétion. La production de l'insuline est tout d'abord augmentée pour palier son efficacité et l'hyperinsulinémie permet dans un premier temps de maintenir une glycémie normale (Féry et Paquot, 2005). Plus la maladie progresse et plus la sensibilité à l'insuline baisse (Ferrannini et *al.*, 2005). L'hypersecrétion d'insuline ne suffit alors plus à compenser l'insulino-résistance ce qui manifeste à la fois par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie. Peu à peu, les cellules  $\beta$  deviennent moins sensibles au stimulus du glucose. De plus, leur nombre et leur masse diminuent à cause de la toxicité du glucose.

La sécrétion d'insuline finit alors par diminuer et les diabétiques de type 2 deviennent à terme, comme les diabétiques de type 1, insulino-pénique. Avec cette baisse de l'insulino-sécrétion, l'hyperglycémie se fait plus sévère. Ces désordres du métabolisme glucidique sont associés à des troubles importants du métabolisme lipidique résultant à une dyslipidémie avec augmentation des triglycérides, acides gras libres, LDL et baisse du HDL cholestérol (Vergès, 2007).

L'obésité favorise l'insulino-résistance et ainsi l'apparition du diabète qui est d'ailleurs la complication la plus répondeuse de l'obésité (Féry et Paquot, 2005 ; Samaan et *al.*, 2008). Dans la plupart des pays, l'augmentation du nombre de personnes diabétiques résulte de changements sociaux, tels la sédentarisation, la baisse d'activité physique, et une alimentation déséquilibrée particulièrement riche en graisses et en sucres raffinés...etc (Peter-Riesch et *al.*, 2002).

Le traitement de ces malades passe tout d'abord par une réduction de charge pondérale grâce à un régime alimentaire approprié et un exercice physique accru. Il peut être associé à la prise d'antidiabétiques oraux (Marles et Farnsworth 1994 ; Peter-Riesch et *al.*, 2002).

### **3.5.2. Les complications liées au diabète**

Malgré le développement des molécules normalisant la glycémie et l'amélioration de schémas thérapeutiques, le diabète reste soumis à une surmorbidity et à une surmortalité liée essentiellement à des atteintes dégénératives tissulaire notamment au niveau des nerfs, des reins, de la rétine et du cœur.

Le diabète sucré induit fréquemment l'apparition des complications aiguës ou chroniques. Les principales complications diabétiques aiguës est un coma causé soit par une

hyperglycémie (acido-cétose) soit par une hypoglycémie due par exemple à une prise trop importante d'un médicament hypoglycémiant (Jakuš et Rietbrock, 2004).

Les complications chroniques du diabète consistent surtout en des maladies vasculaires dégénératives dont les caractéristiques principales sont l'obstruction progressive de la lumière des vaisseaux et, au niveau de la microcirculation, le passage anormal de protéines de la circulation sanguine vers les tissus. Ces complications concernent à la fois les gros vaisseaux (macroangiopathie) et les microvaisseaux (microangiopathie). La persistance de l'hyperglycémie est étroitement liée à l'augmentation de l'indice et de la gravité des complications vasculaires diabétiques.

### **3.5.3. Diabète et stress oxydatif**

Le stress oxydant est augmenté dans les différents tissus à la fois dans le cas de diabète expérimentale ou pour les patients diabétiques, l'hyperglycémie induit une production prolongée des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire et ceux-ci prolongent le gradient électrochimique des protons généré dans la chaîne mitochondriales menant à une surproduction d'anion superoxyde, qui est l'une des espèces réactives de l'oxygène qui peut endommager les cellules dans de nombreuses voies à travers le stress oxydatif, en l'absence d'une compensation appropriée de la réponse des réseaux antioxydants endogènes des cellules, le système est débordé, entraînant un déséquilibre d'oxydo-réduction, ce qui aggrave encore la situation (Korshunov et *al.*, 1997).

Les espèces réactives de l'oxygène généré lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides. En plus il est évident que dans le diabète de type 2, l'activation des voies de stress sensible par l'élévation du glucose et des acides gras conduit à deux niveaux de résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion d'insuline et la dysfonction des cellules B sécrétrice de l'insuline (Evans et *al.*, 2003).

#### **3.5.3.1. Glycation (glycosylation)**

La glycation des peptides et des protéines est une réaction chimique lente des sucres réduits en modifiant les groupements aminés. La première de ces intermédiaires non enzymatique de glycosylation sont les produits Amadori (Gillery, 2006).

La dégradation des produits Amadori génère des produits cétoniques tels que le 1 et 3 desoxyglucosone avec la production des radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène. De

nombreuses preuves suggèrent que les radicaux libres et le peroxydes d'hydrogène, produit par l'auto-oxydation du glucose en présence de métaux de transition, sont une cause importante des dommages de la structure des protéines au cours de l'exposition au glucose *in vitro* (Wolff et *al.*, 1993).

1 et 3 desoxyglucosone sont des composés très réactifs aux protéines que le parent monosaccharide et sont capable de réagir avec les protéines pour former des liens croisés, ainsi que des adduits chromofluorophonique appelé les produits de Maillard ou les produits de glycation avancée (Monnier et Tenada, 1989).

Le résultat type de la glycation des protéines au cours de l'hyperglycémie est la formation de l'hémoglobine glyqué utilisé, largement comme indice de contrôle de la glycémie à long terme, et le taux des AGE intracellulaires et extracellulaires (Monnier et Tenada, 1989).

### **3.5.3.2. Les AGE-RAGE**

La formation des produits finaux de glycation (AGE) est due à l'augmentation de la glycation enzymatique des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Une fois formés, l'AGE peut influencer la fonction cellulaire en se liant à plusieurs sites membranaire, y compris le récepteur de l'AGE (RAGE).

L'interaction des AGE au RAGE conduit à la génération intracellulaire des radicaux libres de l'oxygène (Schmidt et *al.*, 1996 ; Yan et *al.*, 1997), parallèlement, l'épuisement des antioxydants (Tanaka et *al.*, 2000).

### **3.5.3.3. Augmentation de la voie de polyol**

Les nerfs périphériques, cellules de Shwan, glomérule rénal et, éventuellement, la rétine contiennent deux enzymes qui constituent la voie de polyol.

Le premier enzyme est l'aldose réductase est une enzyme nécessitant le NADPH comme un cofacteur, il réduit le glucose en sorbitol, la deuxième enzyme est la Sorbitol déshydrogénase NAD-nécessitant transforme le sorbitol en fructose (Gabby, 1975).

Il est connu que chez le patient diabétique le contenu en Sorbitol de la lentille, les nerfs et la glomérule est élevé et la voie de sorbitol lié au stress, joue un rôle clé dans l'apparition des complications tardives de diabète de type 1 et 2 (Joseph et *al.*, .2002).

L'activation de la voie de polyol contribue à la formation du triose phosphate et de son auto-oxydation, se traduit par la formation d'une espèce réactive qui est l'alpha oxo-aldéhyde.

En outre, l'épuisement de NADPH cellulaire rétablit par l'aldose réductase conduit au mal fonctionnement même une inhibition de l'enzyme clé dans la physiologie de la cellule comme le monoxyde d'azote synthase et le glutathion réductase.

Le Sorbitol déshydrogénase, la deuxième enzyme de la voie de polyol qui converti le Sorbitol en fructose, contribue au stress oxydatif très probablement, par l'épuisement du cofacteur NAD (Hamadi et *al.*, 2012).

### **3.5.3.4.L'épuisement des anti-oxydant sérique et cellulaire:**

La concentration de l'acide ascorbique au niveau du sang et les globules blancs diminué d'une façon significative chez les patients diabétiques alors que son produit d'oxydation est trouvée avec des concentrations très élevés (Akkus et *al.*, 1996).

Il a été observé que l'acide urique, qui présente 30-65 % de la défense contre le radical pyroxyde est trouvé avec des concentrations réduite chez les diabétiques de type 1 (Moshe et *al.*, 2007) .ainsi les patients diabétiques présentent une faible concentration en Quinone 10 (Q10) par apport aux seins (Ketan et *al.*, 2007).

L'élévation de la concentration des métaux de transition comme celle du cuivre ou de fer joue un rôle dans le stress oxydatif lies au diabète car ils catalysent la réaction de formation des radicaux libres. D'autre part, il y a une carence en zinc chez le diabétique, cet élément joue un rôle principale dans l'activité de la SOD (Janet et *al.*, 2005).

### **3.5.4. Les antioxydants et le Diabète**

Etant donné l'implication du stress oxydant dans la pathologie diabétique, il est intéressant de considérer l'apport potentiellement bénéfique des antioxydants. Du fait que les antioxydants agissent en synergie et de façon à éviter un éventuel déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydants, il est souvent souhaitable de les administrer en association.

Une supplémentation par la vitamine E permet d'améliorer les effets de l'insuline et l'équilibre glycémique, ce qui se traduit par l'abaissement de la glycémie, de l'hémoglobine glyquée, et de la fructosamine (Paolisso et *al.*, 1993) ; elle conduit aussi à une diminution de la peroxydation lipidique plasmatique et l'oxydabilité des LDL (Jain et Palmer, 1997 ; Anderson et *al.*, 1999), ce qui serait favorable à la réduction du risque cardiovasculaire.

l'acide  $\alpha$ -lipoïque, a montré un effet bénéfique sur la peroxydation lipidique et la glycation des protéines dans les hématies soumises à de fortes concentrations de glucose ainsi que dans le traitement de la neuropathie diabétique chez l'animal (Keegan *et al.*, 1999 ; Kocak *et al.*, 2000).

Par ailleurs, une étude clinique menée chez des sujets diabétiques de type 2 a montré que la N-acétylcystéine pourrait ralentir la progression des dommages vasculaires en diminuant les concentrations de VCAM-1 soluble au niveau plasmatique (De-Mattia *et al.*, 1998).

### 3.5.5. Diabète et la Nutrition

Selon Le-Bail, 2014 ; dans le cas du diabète, et plus précisément de sa prévention, il est éminemment souhaitable de ne pas multiplier les carences en certains minéraux et oligo-éléments, du fait de leur importance cruciale :

- ✓ **Chrome** : cofacteur de l'insuline. Agit en se liant à l'insuline pour former un complexe permettant le transport de cette dernière jusqu'aux récepteurs cellulaires. Améliore la liaison de l'insuline à son récepteur. Stimule l'activité de la tyrosine kinase ; une enzyme qui régule l'activité du récepteur à l'insuline. Un déficit en chrome conduit à une diminution de la tolérance au glucose.
- ✓ **Zinc**: essentiel à la synthèse, à la sécrétion et au stockage de l'insuline. De plus, protège les récepteurs à l'insuline sur les membranes cellulaires.
- ✓ **Magnésium**: nécessaire à la synthèse de l'insuline et à l'activation des récepteurs à l'insuline. Facilite le transport du glucose dans les cellules.
- ✓ **Soufre**: l'un des composants de l'insuline. Favorise la régulation de la glycémie.
- ✓ **Manganèse**: contribue à la régulation de la glycémie. Systématiquement déficient chez les diabétiques.
- ✓ **Nickel**: renforce et prolonge l'action hypoglycémiante de l'insuline.
- ✓ **Cobalt**: a également une action hypoglycémiante. À noter que le complexe zinc-nickel-cobalt est conseillé pour combattre l'attrance pour le sucré.
- ✓ Autres nutriments importants dans la prise en charge du diabète et de ses complications, en particulier à travers leur action contre les radicaux libres : Vitamines (A, B, C, E) Phyto-composés (flavonoïdes, polyphénols) autres nutriments (acide alpha- lipoïque, coenzyme Q10).

# 1 Matériel et Méthodes

## 1.1. Les souches bifides autochtones isolées

### 1.1.1. Isolement des bifidobacteries

Les bifidobactéries ont été isolées à partir des selles fraîches de nouveau-nés (1-6 mois) allaités exclusivement au lait maternel.

Un gramme de selles a été prélevé dans 9mL d'eau physiologique peptonée cystéiné (Annex I) (Reyed, 2006).

L'isolement de *Bifidobacterium* a été réalisé en profondeur sur gélose MRS cystéiné à 0,05% avec l'ajout d'un antibiotique la Gentamycin 32 à 64 µg/mL (Annexe I) qui rend le milieu sélectif pour les bifidobactéries à un pH de 6,4 et 37°C (Rosaria-D'Aimmo et al., 2006).

### 1.1.2. Purification des bifidobacteries

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon MRSc additionné à la gentamycin, suivie de l'ensemencement sur milieu gélosé par la méthode des stries jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes. Les bactéries présentant une réaction positive à la coloration de Gram et dénuées de la catalase ont été retenues pour être identifiées.

### 1.1.3. La conservation à court terme

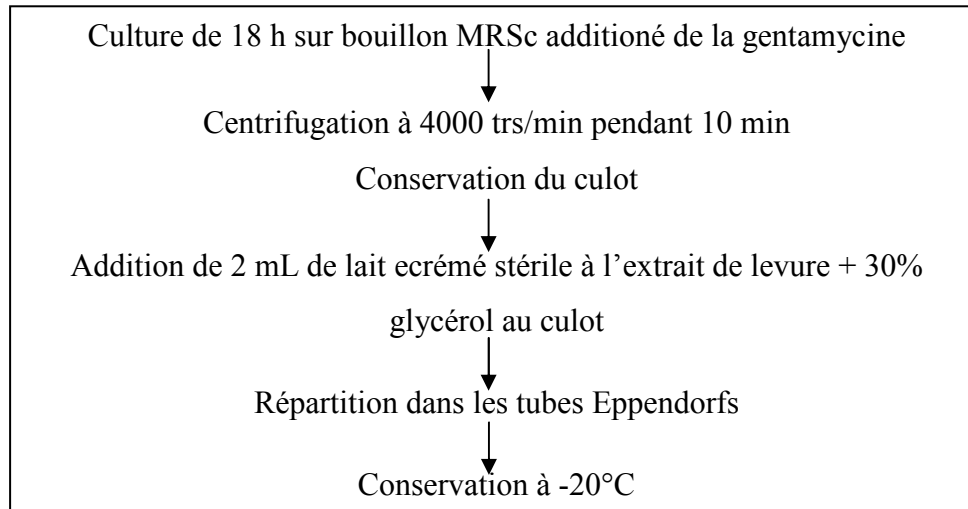
La conservation des isolats purifiés a été réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après incubation à 37°C pendant 24heures en anaérobiose, les tubes ont été conservés à + 4°C, Le renouvellement des cultures s'est fait tous les trois semaines (Saidi et al., 2002).

### 1.1.4. La conservation à long terme

A partir des jeunes cultures (18 h) sur milieu liquide, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4000 trs/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, le milieu de culture de conservation a été ajouté sur le culot. Ce dernier contient du lait écrémé la cystéine 0,05%, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol.

Les cultures ont été conservées en suspension dense et en tube Eppendorfs à -20°C. Il est à noter que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation.

En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé avec 0,05% de cystéine, 0,5 % d'extrait de levure, avant utilisation (Saidi *et al.*, 2002).



**Figure 3** : Conservation de longue durée des bactéries lactiques purifiées (Saidi *et al.*, 2002)

### 1.1.5. Identification des bifidobactéries

La démarche et les techniques utilisées pour identifier les souches bactériennes sont mentionnée en annexe II.

### 1.1.6. Sélection des souches bifides selon leur aptitude technologique

La sélection est réalisée par le suivi de la cinétique de la croissance des souches dans bouillon MRSc par l'évolution de l'acidité, la cinétique bactérienne et l'effet antimicrobien.

L'évolution de la population bactérienne est déterminée par dénombrement sur milieu solide (nombre UFC/mL). L'activité acidifiante est caractérisée par quatre paramètres (Desmazeaud, 1999)

$$V_m = \Delta pH / \Delta T = (pH_i - pH_f) / \Delta T$$

$V_m$  : Vitesse maximale d'acidification exprimée en mUpH/min ;

$\Delta T$  : temps où intervient  $V_m$  ;

$pH_i$  :pH initial

$pH_f$ :pH final

La mesure de la croissance par dénombrement (UFC/mL) permet de calculer le temps de génération (G) qu'ainsi que le taux de croissance ( $\mu$ ) (Hassan *et al.*, 1989)

$$G = T \cdot \text{Log}_2 (\text{Log} V_f - \text{Log} N_i)$$

$$\mu = 1/G$$

Log  $N_f$  : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final ( $T_f$ ) ;

Log  $N_i$  : Logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial ( $T_i$ ).

### 1.1.7. Sélection des souches bifides selon leur effet inhibiteur

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant (extrait brut) de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec les souches pathogènes testées.

Les souches précédemment sélectionnées après l'identification biochimique sont concernées par ce test.

Les souches sont cultivées dans le milieu MRSc pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé à 8000 trs/min pendant 10 min et le surnageant est conservé à 4°C.

Dans une boîte de Pétri contenant la gélose Muller Hinton et ensemencé par la souche pathogène utilisée (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) des puits sont creusés. Après ajout de 100  $\mu$ L du surnageant de la souche bifide, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positives.

## 1.2. Les bactéries pathogènes

### 1.2.1. Les souches de référence

Trois souches de référence ont été utilisées, Elles ont été fournies par le Laboratoire Vétérinaire Régionale de Tlemcen (Algérie). Il s'agit des souches: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Chaque souche a été repiquée dans un bouillon nutritif et l'incubation a été réalisée à 37°C pendant 48h. Puis, *S. aureus* ATCC 25923 a été ensemencée sur gélose Chapman. *E. coli* ATCC 25922 sur gélose Hecktoen. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 48h, de même que pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 ensemencée sur gélose nutritive.



### **1.2.2. La souche autochtone isolée**

Pour la recherche des Salmonelles, nous avons effectué un pré-enrichissement, puis un enrichissement (Humbert et *al.*, 1998).

#### **Le pré-enrichissement**

C'est une phase non sélective qui utilise un milieu riche dans lequel l'échantillon est dilué au dixième (1/10) et pour laquelle l'incubation dure une vingtaine d'heure à 35°C ou 37°C. Le milieu utilisé est l'eau peptonée tamponnée ou le bouillon lactosé.

#### **L'enrichissement**

L'enrichissement vise à minimiser la croissance des autres bactéries associées au prélèvement et de permettre la multiplication sélective des Salmonelles. 0,1mL ou 1mL de la solution de ré-enrichissement est transférée dans le milieu d'enrichissement qui est le bouillon au sélénite.

#### **L'isolement**

C'est une phase sélective qui utilise des milieux solides coulés en boîtes de Pétri. Les milieux d'isolement contiennent une variété d'association de facteurs sélectifs.

Les *Salmonella* apparaissent sous forme de colonies caractérisées par leur forme, leur couleur et leur morphologie. Un ensemencement en strie est effectué sur la gélose Salmonella-Shigella (gélose SS) avec une incubation à 37°C pendant 48h.

### **1.2.3. Identification**

L'identification des souches utilisées est effectuée à l'aide des galeries biochimiques miniaturisées API 20 E, en ajoutant quelques tests : Coloration de Gram, catalase, production de gaz, et Oxydase.

### ***1.3.Spirulina platensis***

#### **1.3.1. Culture de la spiruline**

La souche algale utilisée provenant de la région de Tamanrasset au niveau de la Guelta du Palmier situé à 1824 m d'altitude (23°N., 5°E.). Le transport des échantillons a été réalisé dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination. Aussi pour éviter tout contact avec l'air extérieur, les échantillons ont été mis dans des récipients stériles et à basse température (glacières) (Chader *et al.*, 2009 ; Doumandji *et al.*, 2012).



**Figure 4 :** *Spirulina platensis* de Tamenrasset

##### **1.3.1.1. Réactivation de la souche**

La réactivation de la poudre de spiruline s'est faite dans un milieu liquide constitué d'eau distillée (1 mL) et de bicarbonate (0,2%).

Nous avons prélevé 100 mL de cette solution que nous avons chauffé pendant 10 à 20 minutes à 50-60°C (Figure 5) puis nous avons ajouté 2 à 4 gramme de poudre sèche de *S. platensis* après quelques minute, (20 à 30 min). Une agitation a été réalisée doucement jusqu'à homogénéisation totale (Figure 6).



**Figure 5:** Solution de bicarbonate 0,2% chauffée pendant 10 à 20 minutes à 50-60°C



**Figure 6 :** Solution de spiruline après chauffage et homogénéisation

### 1.3.1.2. Isolement de la souche

La spiruline est filtrée à l'aide de papier filtre (Whatman N°4). Le principe d'isolement est de purifier la spiruline par l'augmentation de la concentration de bicarbonate de sodium de 2% à 8% puis 15%.

Les filaments obtenus par la filtration sont recueillis dans le milieu liquide d'isolement N°1 dont la Composition est cité en annexe I:

Nous avons prélevé stérilement 100 mL de ce milieu dans un bécher de 200 mL dans lequel nous avons plongé le filtre. Puis nous avons enlevé le filament du filtre et nous avons procédé à son lavage plusieurs fois avec le même milieu.

La solution a été répartie dans des tubes à essai à raison de 2 mL par tube.

Après 24 à 48 h, nous avons ajouté 2 mL dans chaque tube à essai de la solution N°2 à une concentration de 8% de bicarbonate de sodium (Annexe I).

Après 24 heures, nous avons rajouté 4 mL de la solution N°3, la teneur de bicarbonate est à raison de 15% (Annexe I)

Les solutions de la spiruline obtenues ont été conservées dans du papier aluminium (obscurité). Cette méthode de conservation réduit la croissance de la spiruline et élimine certains contaminants tels que les bactéries photosynthétiques.

### **Isolement sur boîte de pétrie**

Nous avons également effectué des essais d'isolement de la spiruline à partir d'un milieu solide dont la composition est en Annexe I

Après stérilisation, nous avons coulé le milieu dans des boîtes Pétri. Après refroidissement, nous avonsensemencé une goutte de la spiruline réactivée par étalement. Puis nous avons procédé à l'incubation dans une étuve à 37°C en aérobiose. Après 48heures, jusqu'à une semaine, nous avons observé. L'apparition des filaments.

#### **1.3.1.3. Purification de la souche**

Les cultures uni-algales développées, nous avons cherché à éliminer les bactéries. La technique consiste à préparer des solutions d'antibiotique que nous avons filtré à 0,3 µm et ajouté dans la culture de la spiruline. L'antibiotique utilisé est le Chloramphénicol (0,2 mg/mL).

#### **1.3.1.4. Examen microscopique**

A l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire, nous avons prélevé une goutte d'une solution de la spiruline réactivée et l'avons déposé sous le microscope. L'examen microscopique est effectué avec grossissement (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25).

#### **1.3.1.5. La culture de la spiruline sur le milieu Hiri**

**Culture de la spiruline** : Le milieu de culture utilisé est un milieu liquide constitué d'eau distillée et de sels minéraux, avec un pH compris entre 9,5 et 10 avec une agitation mécanique continue. La composition de ce milieu est présentée en annexe 1

La culture de la spiruline débute par l'ensemencement qui est réalisé par dilution d'un inoculum de 100 mL, en respectant les conditions physiques (une température d'incubation à 30°C., une intensité lumineuse égale à 1512 lux et une agitation mécanique à l'aide d'une pompe à air toute la journée avec des coupures de 20 minutes de temps en temps).

Après 6 à 8 jours, un doublement est réalisé par repiquage dans 500 mL de milieu de culture jusqu'à l'obtention de 4L de culture de spiruline concentrée.

Lorsqu'une biomasse optimale de spiruline est obtenue, la filtration est réalisée en utilisant un papier filtre de type Whatman GF/C de 47 mm de diamètre. La récupération de la

spiruline s'effectue en raclant délicatement la biomasse avec une spatule stérile qui sera entreposée dans une boîte de Pétri stérile.

Après cette opération, le séchage est réalisé à l'étuve entre 80°C et 100°C pendant 24h, La spiruline bien séchée obtenue présente un aspect craquant, se détache toute seule du support de séchage (Doumandji et *al.*, 2012).

### **1.3.1.6. Estimation de la croissance de la spiruline**

La croissance de la spiruline peut être estimée par la mesure pH, du poids sec, de la phycocyanine et de la biomasse (Doumandji et *al.*, 2012) :

**Estimation du poids sec** : Cette technique repose sur une dessiccation à 80 °C pendant 24h d'un papier filtre de type Whatman GF/C, 47 mm de diamètre comprenant 25mL d'une culture de spiruline. Le poids sec de la micro-algue est déterminé par soustraction.

**Estimation de la teneur en phycocyanine** : pour estimer la teneur en phycocyanine, l'absorbance est mesurée à 618 nm. Il s'agit de l'absorption maximum (Fox, 1986). L'échantillon homogénéisé est de 3mL et est placée dans une cuve en quartz. Les mesures sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre.

**Concentration de la biomasse** : Consiste en une lecture d'absorbance à 625nm par spectrométrie d'une culture de spiruline. La concentration de la biomasse ( $C_b$ ) est en g/L selon la relation suivante,  $C_b = 0,38 \times DO$  à 625 nm.

## **1.3.2. Les analyses physicochimiques de la spiruline**

### **1.3.2.1. Détermination du potentiel d'hydrogène pH selon la norme ISO**

**1842, NA 2233, 1993**

Nous avons déterminé le pH de la solution de spiruline à 4 % (4g de poudre de spiruline diluée dans 100 mL d'eau distillée) à l'aide d'un pH mètre de pailleasse.

### **1.3.2.2. Détermination de la teneur en humidité**

La détermination de la teneur en humidité s'est faite par étuvage à  $103 \pm 2^\circ$  jusqu'à stabilité du poids selon la méthode officielle AOCS (American Oil Chemist's Society) en 1990.

Les résultats exprimés en pourcentage du poids d'eau par rapport au poids initial, sont exprimés par l'équation suivante :

$$H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

**H** : taux d'humidité, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

**m<sub>0</sub>** : masse, en gramme, de la capsule vide ;

**m<sub>1</sub>** : masse, en gramme, de la capsule et de la prise d'essai ;

**m<sub>2</sub>** : masse, en gramme, de la capsule et le résidu sec.

Il faut signaler que cette méthode ne mesure pas la teneur en eau proprement dite, le terme « humidité » que nous avons utilisé pose problème également. Le terme correct pour le résultat de ces méthodes devrait être « perte de masse » ce qui ne correspond pas seulement à de l'eau, mais à tous les composés volatils dans les conditions opérationnelles de séchage (Le Mestre et *al.*, 2002).

### 1.3.2.3. Détermination de la teneur en protéine (Méthode Kjeldhal)

Après minéralisation d'une prise d'essai d'environ un (01) gramme par chauffage à 350°C dans l'acide sulfurique concentré 0,25 N en présence de catalyseur (sulfate de cuivre et sulfate de potassium), une alcalinisation du minéralisât obtenu est réalisée après une éventuelle dilution.

Après un traitement à la vapeur de l'ammoniac, nous procédons à un titrage par de l'acide chlorhydrique 0,25N.

Les résultats exprimés en pourcentage du poids de protéines par rapport au poids total de la prise d'essai, sont donnés par l'équation suivante :

$$P = \frac{1,4 \times N \times (V_1 - V_0)}{m} \times 6,25$$

**P** : Taux de protéines, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

**N** : Normalité de l'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination ;

**V<sub>1</sub>** : Volume, en millilitres, d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination ;

**V<sub>0</sub>** : Volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination sur blanc ;

**m** : Masse, en gramme, de la prise d'essai initiale ;

**6,25** : Facteur de conversion des protéines de la spiruline

#### 1.3.2.4. Détermination du taux de cendres

La teneur en cendres (minéraux) a été estimée par incinération au four à 550°C de façon à obtenir la totalité des cations sous forme de carbonate et autres sels minéraux anhydres (AOCS, 1990).

Le taux de cendres a été déterminé après incinération d'une prise d'essai dans un four à moufle réglé à 550°C. Les résultats, exprimés en pourcentage du poids de cendres par rapport au poids initial, ont été obtenus à partir de l'expression suivante :

$$C = \frac{m_3 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

**C** : Taux de cendres, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

**m<sub>0</sub>** : Masse, en gramme, du creuset vide ;

**m<sub>1</sub>** : Masse, en gramme, du creuset et de la prise d'essai ;

**m<sub>3</sub>** : Masse, en gramme, du creuset et son contenu (cendres) après incinération.

#### 1.3.2.5. Détermination de la teneur en éléments minéraux par Spectroscopie d'absorption atomique (NF V05-113, 1972)

##### Principe

La spectrométrie d'absorption atomique est une méthode d'analyse élémentaire qui utilise la possibilité des atomes à être excités par l'apport d'une énergie extérieure sous forme d'un rayonnement électromagnétique (photon) à une fréquence bien définie t (Lynch, 2001).

Les éléments minéraux (Fe, Zn, Ca, K, Na) sont déterminés par spectrométrie d'absorption atomique de type (VARIAN AA 240) lié à l'atomiseur de flamme (GTA 120). En effet, la concentration en ppm des éléments minéraux a été déterminée à l'aide de courbes étalons préparées au préalable.

#### 1.3.2.6. Détermination de la teneur en sucres solubles par la méthode d'anthrone

Le dosage des sucres solubles totaux se fait par colorimétrie à l'anthrone. Cette méthode est basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide à chaud.

Les dérivés obtenus se condensent avec l'anthrone pour donner des produits colorés bleu-vert avec les hexoses et rouge avec les pentoses (Sanchez-Miron, 2003) :

### Extraction des sucres

Nous pesons 20 mg de la spiruline,

Un broyage fin à l'aide d'un mortier dans 5mL d'éthanol 80% bouillant est réalisé ;

La centrifugation de la solution se fait à 5000 trs/min pendant 20 minutes ;

Le surnageant (A) est récupéré dans un tube. Nous couvrons le culot avec 5mL d'éthanol 80% qui après agitation il y a une centrifugation à 5000 trs/min pendant 15minute ;

Le surnageant (B) est récupéré, nous le mélangeons avec le surnageant (A) dans une fiole de 100mL.

Nous ajustons avec l'eau distillée jusqu'à 100 mL (solution C).

Les différentes densités optiques sont rapportées sur la courbe d'étalonnage du glucose établie. (Annexe III)

### Echantillon à doser

Dans un tube à essai, 50 µL de la solution C sont prélevé et 950 µL d'eau distillée sont ajoutés ;

Après addition de 2mL d'anthrone, le mélange est réalisé à l'aide d'un vortex ;

La lecture de la densité optique se fait grâce à un spectromètre à 625nm.

Après avoir établi la courbe d'étalonnage, la densité optique de l'échantillon est déduite.

En effet, la teneur en sucre totale est exprimée en mg/g de spiruline à analyser :

$$Q_s = C \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{1000}{p}$$

**$Q_s$** : Teneur en sucres (mg/g) ;

**$C$**  : Concentration de sucres dans le volume à doser (mg/ml) ;

**$V$**  : Volume de l'extrait (100mL);

**$v$**  : Volume à doser (mL);

**$P$**  : Poids de la prise d'essai (g).



### 1.3.2.7. Détermination de la teneur en Lipide (NF V 03-905)

La détermination des matières grasses est obtenue selon la méthode d'extraction par le SOXHLET en utilisant l'hexane comme solvant.

50 g d'échantillon sont placées dans le Soxhlet et 500 mL d' hexane sont introduits dans le ballon, puis la température est réglée à 60°C.

La majeure partie du solvant est éliminée à l'aide de l'évaporateur rotatif pour éviter l'ébullition de l'huile qui, à la longue, pourrait modifier les indices d'acidité.

Le ballon contenant les lipides est placé à l'étuve pendant 30 min à 103°C, puis au dessiccateur pendant 30 min. Le poids des lipides est obtenu par la différence entre le poids final et le poids initial du ballon. Les résultats sont donnés par la formule suivante:

$$\text{Teneur en MG (\% MS)} = (A-B) \cdot 100 / C \cdot \text{MS} / 100$$

A: poids du ballon + extrait en gramme

B: poids du ballon vide en gramme

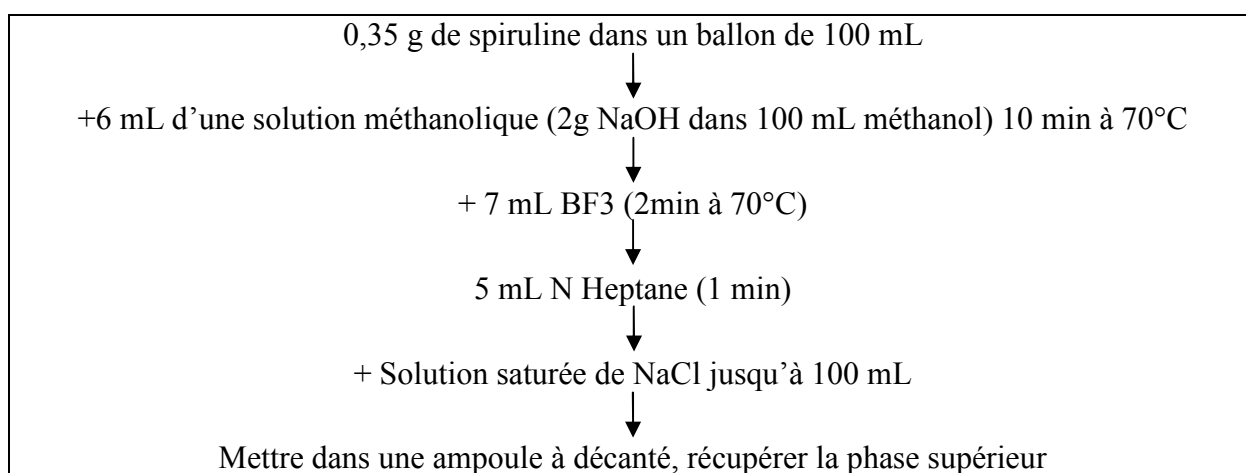
C: poids de la prise d'essai en gramme

MS: matière sèche en pourcentage

#### 1.3.2.7.1. La composition chimique des acides gras

La composition en acides gras de la spiruline a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La matière grasse testée, est obtenue par le soxhlet ou par l'estérification de la spiruline.

L'estérification :



**Figure 7** : Etapes de l'estérification de la spiruline

Les conditions opératoires de l'analyse de CPG sont:

Chromatographie : Chrompack  
Détecteur : CP9002  
Injecteur : FID  
SPLIT 1/100

Gaz vecteur : Azote  
Colonne capillaire : DB23  
Longueur : 30m  
Diamètre inférieur : 0,32 mm  
Epaisseur : 0,25 $\mu$ m

Température

Injecteur : 250°C

Détecteur : 250°C

Four : 150  
220°C (4°C/mn)

Quantité injectée : 0,2  $\mu$ L

Vitesse du papier : 0,5 Cm/mN

### 1.3.3. Détermination des pigments

#### 1.3.3.1. Dosage colorimétrique simplifié des Caroténoïdes

A 4g de spiruline sont additionnés 100 mL d'acétone (25 %) ou, d'alcool à 90°, la suspension ainsi obtenue est maintenu 24 heures au réfrigérateur.

Après centrifugation, nous prélevons 0,5 mL de la solution et ajoutons à 100mL l'acétone ou à l'alcool. La mesure de la densité optique s'effectue à 450 nm (Jourdan, 2012). La concentration en caroténoïdes dans la spiruline s'obtient par la formule:

$$\text{DO}_{450} \times \text{DIL} / 2,8 / C, \text{ mg/g}$$

DIL: le facteur de dilution en volume ;

C : concentration de la spiruline.

#### 1.3.3.2. Détermination de a teneur en Chlorophylle

3g de spiruline en poudre sont mélangés à 0,1g de CaCO<sub>3</sub> et quelque grain de sable. Puis, 20 mL d'acétone (85% acétone et 15% d'eau) sont ajoutés au mélange. Une macération de ce dernier est réalisée pendant quelques minutes suivie d'une filtration.

Le filtrat ainsi obtenu est porté jusqu'à 100mL avec de l'acétone à 84%. 50 ml de cet extrait est prélevé et mélangé avec 50 mL d'éther de pétrole dans une fiole à décantation. Un lavage avec l'eau distillé (100mL et la solution 3fois) est réalisé afin d'enlever les traces de l'acétone.

Le Chlorophylle obtenu est déshydraté par le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  est ajusté avec l'éther de pétrole à 50mL (Jourdan, 2012).

Après l'extraction de la chlorophylle nous déterminons la densité optique et l'extrait obtenu à 660nm et à 642,5nm. La quantité de la Chlorophylle est obtenue en utilisant les formules suivantes :

**-Chlorophylles totales :  $7,12 A_{660} - 16,8 A_{642,5}$**

### **1.3.3.3. Détermination de la teneur en phycocyanine**

La méthode la plus précise pour mesurer la teneur en pigments est la colorimétrie. Soit C % la concentration de spiruline sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %.

Nous avons laissé décanter et nous avons prélevé une solution bleue. Puis environ 0,5 à 1 ml de la solution décanté sont Dilué avec de l'eau. Avec un ce facteur de dilution (DIL), en volume.

Mesuré par Spectrophotomètre, la densité optique 615, et à 652 nm (Jourdan, 2012). Puis calculé le % en poids de phycocyanine par la formule:

$$1,873 \times (\text{DO}_{615} - 0,474 \text{ DO}_{652}) \times \text{DIL} / \text{C}$$

DIL: le facteur de dilution en volume ;

C : concentration de la spiruline.

### 1.3.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques

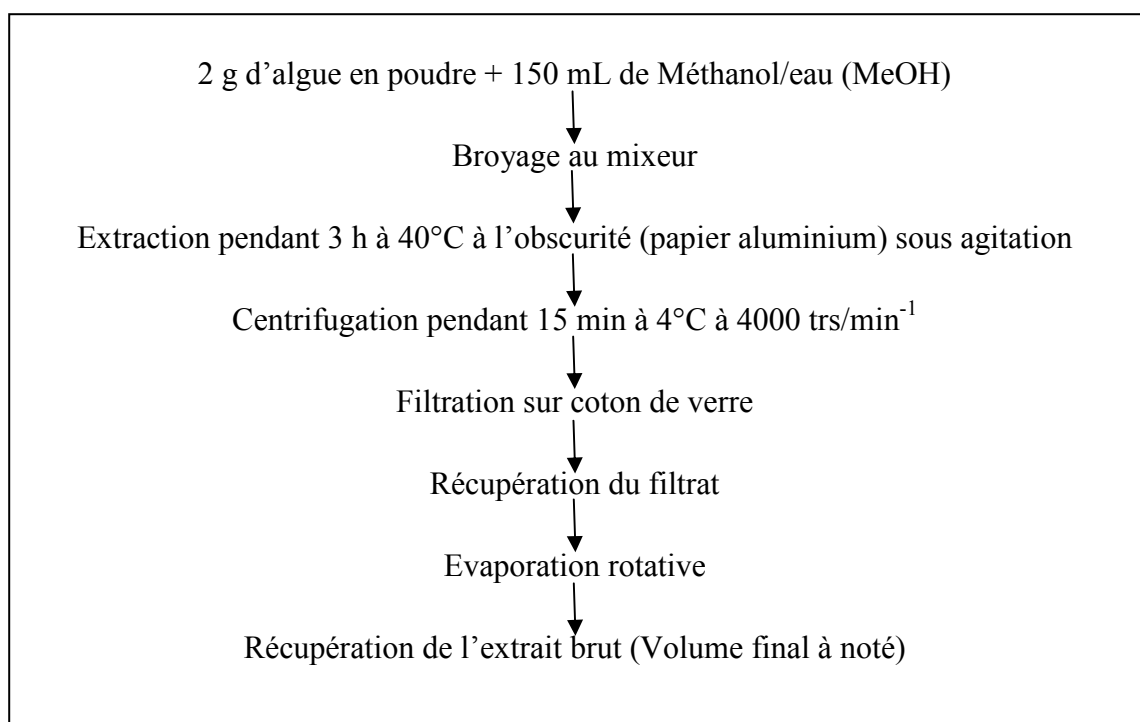
#### 1.3.4.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols s'est faite par différents solvants : méthanol, éthanol, éthanol/eau (50/50) méthanol/eau (50/50) et éthanol/méthanol (50/50).

Afin de limiter les risques d'oxydation des composés phénoliques, les processus d'extraction et d'évaporation sont réalisés à l'abri de la lumière. De plus, les polyphénols étant sensibles à des températures excessives, les extraits sont maintenus à des températures inférieurs à 40°C durant la phase d'extraction et d'évaporation et d'évaporation.

Après extraction, les extraits sont centrifugés et filtrés, environ 150 mL seront récupérés puis passés ensuite à l'évaporateur rotatif (Rotavapeur) afin d'éliminer le méthanol et de concentrer ainsi l'extrait (Lann *et al.*, 2012).

La figure 8 représente les étapes d'extraction des polyphénols par Méthanol/eau (MeOH), les mêmes étapes ont été suivies avec les autres solvants



**Figure 8** : Protocol de l'extraction des composés phénoliques (Lann *et al.*, 2012)

#### **1.3.4.2. Dosage des composés phénolique selon la méthode de Folin-Ciocalteu)**

La détermination de la teneur en composés phénolique totaux a été réalisés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965). Ce réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols donnant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle au taux de composé phénolique présent dans le milieu.

Une quantité de 0,3 mL de l'extrait a été introduites dans des tubes à essai et 1,5 mL du réactif le Folin-Ciocalteu (dilué dans de l'eau distillé 1/10) ont été ajouté, puis 1,2 mL de carbonate de sodium 75g/L).

Les tubes à essai ont été placés dans le vortex à une température de 50°C pendant 5min puis refroidis.

L'absorbance a été mesurée à 760 nm.

Une gamme étalonnage (Annexe IV) établie à partir de différentes concentration d'acide gallique (0 à 0,17 mg/mL) Le résultat est exprimé en milligramme d'acide gallique par gram de l'extrait (mg GA/g de l'extrait).

#### **1.3.5. Détermination de l'activité antioxydante de la spiruline**

##### **1.3.5.1. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH**

L'activité antiradicalaire de nos extraits a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanolique de DPPH• (2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, La forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance (Perez et *al.*, 2007).

L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été mesurée par la méthode spectrophotométrique (Anbarasan et *al.*, 2011).

Des concentrations ont été préparées pour chaque extrait (100µg/mL, 75 µg/mL, 50µg/mL et 25µg/mL), 1mL de chaque concentration a été mélangé avec une solution éthanolique de DPPH (200µM). Après une incubation 20min, l'absorbance a été mesurée à 517nm.

Une solution contrôlée a été préparée avec 1mL d'éthanol et 1mL de solution éthanolique de DPPH (200µm).

La Vitamine C et le BHT ont été considérés comme les antioxydants standards de ce test et cela à différentes concentrations (100µg/mL, 75 µg/mL, 50µg/mL et 25µg/mL). 1mL de chaque concentration a été mixé avec 1 mL de DPPH (200 µm).

Les expériences ont fait l'objet d'une triple répétition et l'activité antioxydante a été calculée de la manière suivante :

$$AA\% = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ controle}] \times 100$$

### **1.3.6. Détermination des polyphénols par chromatographie liquide à haute performance**

La chromatographie liquide de haute performance est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange se trouvant en phase homogène liquide. Son principe repose sur l'équilibre des concentrations des composés à séparer entre deux phases en contact : la phase stationnaire (colonne chromatographique) et la phase mobile qui se déplace.

La séparation est basée sur la rétention différente des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps variables et liés à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc.) et à leur affinité respective pour la phase stationnaire et pour la phase mobile. A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

L'analyse HPLC se réalise à l'aide d'un système constitué de quatre modules principaux :

- un système de pompage ;
- un système d'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique ;
- une colonne chromatographique ;
- un détecteur.

**Mode opératoire**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe HPLC (HPLC Waters Alliance 2695) avec un détecteur UV 24889 et un logiciel empower V3.

La colonne est d'une longueur de 250 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm. Elle contient la phase stationnaire apolaire (phase inverse) qui est constituée de silice (C-18). Ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques;

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Débit: 1 mL/min ;
- Pression de travail : 21,3 MPa
- Volume d'injection : 20 µL
- Longueur d'onde: 254 nm
- Concentration de l'échantillon: 1 mg/mL ;
- Temps d'analyse : 25 min ;

La phase mobile est de composition gradiente. Elle est composée de deux éluants A et B dont la composition est mentionné dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Composition de la phase mobile pour l'étude des polyphénols par HPLC en fonction du temps.

Time (min)	Composition (%)	
	Solvant A (Acétonitril)	Solvant B (H <sub>2</sub> O, pH 2,5)
Initial	2	98
5.00	2	98
15.00	5	95
17.00	100	0
25.00	100	0
Débit	1mL/min	
Temps	24min	

La phase mobile est filtrée avant l'utilisation par une pompe à filtre

### 1.3.7. L'activité antimicrobienne

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de la spiruline, quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* ssp.) ont été choisies. Ces bactéries sont pathogènes et sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'Homme (Bencheqroun et *al.*, 2012).

Les préparations des inoculum bactériens sont évaluées par turbidité qui est exprimées par la mesure de la Densité Optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre.

Une DO comprise entre 0,08-0,1 correspond à  $10^8$  UFC/mL (Haddouchi et *al.*, 2009).

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Treki et *al.*, 2009).

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatmann de 6mm de diamètre. Les disques sont imprégnés dans différentes solutions (10mg/mL) des extraits dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde). Un disque imbibé par le DMSO est employé en tant que contrôle négative. Puis déposés à la surface d'un milieu étalé par une suspension microbienne.

Nous avons utilisé pour les souches bactériennes le milieu Muller Hinton. A la fin de la durée d'incubation 18-24h pour les souches bactériennes, L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse le diamètre de la zone d'inhibition.

#### 1.3.7.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Selon Konan et *al.* (2014), Cette technique se pratique soit sur milieu solide ou en milieu liquide, mais la plus économique est celle sur milieu solide, qui permet de tester plusieurs souches bactériennes dans une même boîte.

Elle consiste à réaliser des dilutions d'extraits, et les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi à 45°C, et à tester sur ces milieux les souches bactériennes à étudier. Ce test donne un intervalle de valeurs de la concentration minimale inhibitrice de chaque souche. Cette méthode est utilisée comme un indicateur de l'activité antibactérienne, en plus de la recherche de la valeur réelle lorsque c'est possible.



❖ *Préparation de l'inoculum*

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester.

L'anse est déchargée dans 10 mL d'eau distillée stérile, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland à une DO de 0,08 à 0,10 à 625 nm.

❖ *Ensemencement et dépôt des disques*

L'ensemencement de la suspension bactérienne a été réalisé par étalement sur boîtes Pétri contenant la gélose Muller Hinton

Les disques sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile, pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif). Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C (Rahal, 2005).

❖ *Préparation des dilutions*

Une concentration de 10 mg/mL a été préparé pour chaque extrait, puis des dilutions successives au demi ont été effectués, en effet de chaque dilution nous prélevons 10 µL et nous les mettons dans les disques qui sont déjà dans les boîtes de pétri. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C. (Tableau 8)

**Tableau 8** : Dilutions préparées à partir des extraits de la spiruline

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
<b>%</b>	100	50	25	12,5	6,250	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	0,049
<b>mg/mL</b>	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,020	0,010	0,005
<b>µg/mL</b>	10000	5000	2500	1250	625	312,5	156,25	78,125	39,063	19,531	9,766	4,883

### ❖ *La Lecture*

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (Ponce *et al.*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistance : diamètre <8mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20

### **1.3.8. Les analyses microbiologiques de la spiruline**

Les manipulations sont faites sous une hotte ventilée et/ou dans une zone stérile assurée par le bec benzène, tout en désinfectant les mains avec un gel antiseptique (Annexe II).

### **1.4. Effet de la concentration de *Spirulina platensis* sur la croissance des *Bifidobacterium breve***

La souche utilisée après identification d'après l'effet technologique et l'effet antimicrobien est : *Bifidobacterium breve*

En basant sur les résultats d'étude récentes, nous avons choisi trois (03) concentrations de spiruline (1mg/mL, 5mg/mL et 10mg/mL) (Dola *et al.*, 2009) pour étudier son effet sur la croissance des *bifidobacterium breve*.

Nous avons par cela prélevé une colonie de 18h de *Bifidobacterium breve* ensemencée sur la gélose MRS cystéiné 0,05% additionné à la Gentamycine (Rosaria D'Aimmo *al.*, 2006).

L'incubation s'est faite à 37°C pendant 18h. L'inoculum a été préparé par un ensemencement à 10% de préculture dans le lait infantile 1<sup>er</sup> âge (GUIGOZ I), incubé à 37°C pendant 18h.

Après l'incubation, nous avons préparé des cultures enrichies en *Spirulina platensis* à différentes concentrations.

Quatre (04) cultures ont été réalisées : Une culture témoin de *Bf. breve* , et trois cultures mixtes enrichies par différentes concentrations choisies de Spiruline (1mg/mL, 5mg/mL, 10mg/mL), Chaque culture a étéensemencé par 10% d'inoculum standard de *Bf. breve* dans 300 mL de lait infantile. La température d'incubation était de 37°C en anaérobic.

L'étude des cinétiques de croissance s'est faite par le suivi de trois (03) paramètres : évolution de la biomasse, pH, acidité dornic et l'effet antimicrobien.

### 1.4.1. Mesure de la cinétique de la croissance

Nous avons utilisé la méthode de numération sur milieux solides. A chaque temps considéré ( $t_0, t_1, t_2, t_3, \dots$ ) nous avons prélevé 1 mL à partir de chaque culture et nous avons réalisé une série de dilutions dans 9mL d'eau physiologique ( $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ ). Les dilutions ont étéensemencées en profondeur puis nous avons ajouté le milieu MRSc additionné à la gentamycine avec incubation à 37°C pendant 24 à 48h.

Seulement les boites contenant 30 à 300 colonies ont été dénombrées (Prescott *et al.*, 2003). Les cinétiques de croissance ont été suivies jusqu'à l'obtention de la phase de déclin.

$$n = t/G$$

$$X = X_0 \times 2^{t/G}$$

$$\ln X = \ln X_0 + \ln 2/G \times t$$

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \times t$$

$$\mu = \ln 2/G$$

**X** : le nombre de cellules au temps  $t$

**X<sub>0</sub>** : le nombre de cellules au temps initial  $t_0$

**μ** : Taux de croissance spécifique.

**G** : temps de génération (temps nécessaire au doublement de la population cellulaire).

**n** : le nombre de génération.

### 1.4.2. Evolution du pH

L'évaluation de l'acidité a été réalisée grâce au suivi du pH mètre en fonction du temps.

### 1.4.3. Dosage de l'acidité Dornic

L'évaluation de l'acidité dornic produite par titrimétrie en fonction du temps a pour but de déterminer la concentration molaire en ions  $H_3O^+$  dans un échantillon de lait. La concentration est exprimée en "Degrés dornic (°D)" (Annexe V).

### 1.4.4. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des puits

Une gélose de Muller Hinton est ensemencée à raison de 1 % avec les souches cibles (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* ssp., ). Puis 20 mL de cette gélose sont coulés dans des boîtes de Pétri.

Nous avons réalisé une centrifugation pour chaque culture à 6000 trs/min pour récupérer le surnageant.

Les surnageants récupérés ont été placés dans des puits de 6 mm de diamètre creusés stérilement sur gélose et remplis avec 100 µL. Ces boîtes de Pétri ont été placés à une température de +4°C/4h pour permettre une bonne diffusion de surnageant.

Les boites Pétris ont été mises dans une étuve à 37°C.

L'effet inhibiteur est réalisé par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition (Zi) formées autour des puits. La mesure du diamètre d'inhibition Zi est effectuée selon la formule suivante:

$$Zi \text{ en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6 mm)}$$

### 1.5. Essai *In vivo* sur l'effet antioxydant de *Spirulina platensis* en association avec *bifidobacterium breve* sur le diabète

Nous avons dans cette partie voulu évaluer et étudier les effets suivant:

- L'effet de la souche *Bf. breve* sur le diabète alloxanique provoqué chez le rat ;
- L'effet de la concentration de *S. platensis* sur le diabète alloxanique provoqué chez le rat ;
- L'effet de l'association *S. platensis* avec *B. breve* sur le diabète alloxanique provoqué chez le rat.

#### 1.5.1. Le modèle animal

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé 54 rats femelles de type Wistar Albinos (*Rattus norvegicus alvinus*) provenant de l'institut Pasteur d'Alger (centre d'élevage de Kouba-Alger) et pesant entre 180- 190 g.

### **1.5.2. Condition d'élevage**

Dès leur réception, les rats ont été répartis en groupes de 6 dans des cages pour d'une semaine avant d'être utilisés dans les différentes expériences.

Les animaux ont eu un accès libre à la nourriture et à l'eau (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger).

Les rats ont été maintenus dans une température ambiante, soumise à un cycle de 12 heures de lumière suivi de 12 heures d'obscurité

La phase obscure de ce cycle commençait à 12h et les différentes expériences ont toujours lieu de 13h à 18h en raison de l'activité nocturne de l'animal.

### **1.5.3. L'induction de diabète (Hyperglycémie permanente)**

La destruction des îlots de Langerhans entraîne l'installation d'une hyperglycémie permanente. Cette technique est utilisée pour créer le diabète expérimental (Weaber, 2007).

Deux substances sont utilisées de nos jours. Il s'agit de l'alloxane et de la streptozotocine.

Pour évaluer l'effet antidiabétique de l'association des *Bf. breve* avec *S. platensis*, un modèle de rat diabétique induit par alloxane a été considéré.

Après une mise à jeun pendant une nuit (privation de la nourriture pendant 16 heures mais pas de l'eau), nous procédons à l'injection de l'alloxane par voie intrapéritonéale d'une solution fraîchement préparée de l'alloxane à une dose de 120 mg/Kg de poids (Diatewa et *al.*, 2004 ; Faidallah et Khan 2012; Osman et *al.*, 2012). Après 48h la glycémie est mesurée.

L'alloxane monohydrate est reconstitué juste avant l'administration dans une solution physiologique (NaCl 0,9%) pour constituer la concentration décrite précédemment pour être injecté au rat (Kebieche, 2009).

### **1.5.4. Le traitement préventif du diabète alloxanique**

Les rats ont été traités par injection intrapéritonéale de monohydrate d'alloxane à la dose de 120 mg/kg en solution dans du sérum physiologique.

Quarante huit heures après administration de l'alloxane, la glycémie des rats a été déterminée à l'aide du glucomètre On-Call-Plus ACON.

Une évaluation de glucose sanguin est effectuée et les rats dont le glucose sanguin est supérieur à 2 g/L sont considérés diabétiques. Les animaux ayant présenté une glycémie franche ont été retenus pour l'expérimentation et répartis en neufs (09) lot de six (06) rats:

- **GI** : Temoin, le groupe de contrôle a reçu de l'eau physiologique (10mL *per os*) ;
- **GII** : Témoin diabétique, groupe de rats ayant reçu une injection d'alloxane 120mg/kg par voie intraperitonial et de l'eau physiologique (10mL *per os*) ;
- **GIII** : des rat diabétique ayant reçu une injection d'alloxane 120mg/kg par voie intraperitonial,
  - **GIIIa**: 1mL pré-culture de *Bf. Breve*+9mL de bouillon MRS<sub>C</sub> (*per os* 7jours) ;
  - **GIIIb** : 1mL pré-culture de *Bf. breve* + 9mL de bouillon MRS<sub>C</sub> + 1 mg/mL de la poudre *S. platensis* (*per os* 7 jours)
  - **GIIIc**: 1mL pré-culture *Bf. breve* + 9mL de bouillon MRS<sub>C</sub> + 5 mg/mL de la poudre *S. platensis* (*per os* 7jours) ;
  - **GIIId** : 1mL pré-culture *Bf. breve* + 9mL de bouillon MRS<sub>C</sub> + 10 mg/mL de la poudre *S. platensis* (*per os* 7 jours)
  - **IIIe**: 9 mL eau distillée stérile + 1 mg/mL de la poudre *S. platensis* (*per os* 7 jours)
  - **IIIf** : 9 mL eau distillée stérile + 5 mg/mL de la poudre *S. platensis* (*per os* 7 jours)
  - **IIIg** : 9 mL eau distillée stérile +10 mg/mL de la poudre *S. platensis* (*per os* 7 jours) ;

Chaque jour, des prélèvements de sang ont été effectués et cela pendant toute la période de traitement.

Après l'arrêt des traitements, nous avons continué les prélèvements jusqu'au Septieme jour J<sub>7</sub>.

Le dosage de la glycémie a été réalisé par un glycomètre et les meilleurs résultats ont été repérés.

### **1.5.5. Effet du lait infantile 1<sup>er</sup> âge (GUIGOZ I) enrichi par *Spirulina platensis* et *Bifidobacterium breve***

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune chronique dans laquelle les cellules bêta des îlots de Langerhans sont sélectivement détruites.

Ce type de diabète peut toucher les enfants de 0 à 15 ans, ainsi que les bébés de moins de 2ans qui sont allaités au lait artificiel.

Nous avons cette optique d'amélioration proposé de compléter le lait infantile par l'ajout des *Bf. breve* et de *S. platensis* et cela à des concentrations étudiées.

Par cela 30 rats femelles de type Wistar Albinos (*Rattus norvegicus alvinus*) provenant de l'institut pasteur d'Alger est pesant entre 150- 170 g.

Après injection d'alloxane à raison de 120 mg/Kg. Les rat sont devenus diabétiques, et ont été réparties en 6 lots à raison de 5 rats par lot.

**Lot T** : Rats temoins, nourris avec un régime témoin ;

**Lot TD** : Rats temoins diabétiques, nourris avec un régime témoin ;

**Lot Dtm** : Rats témoins diabétiques, traités par glibenclamide (100mg/kg)

**Lot DBf** : Rats diabétiques traités par lait infantile inoculé par *Bf. breve* (*per os* 10 jours);

**Lot S10** : Rats diabétiques traités pat lait infantile enrichi par *S. platensis* à une concentration de 10 mg/mL (*per os* 10 jours)

**Lot DBf+ S10**: Rat diabétiques traités par lait infantile inoculé par *Bf. breve* et enrichi par *S. platensis* à une concentration de 10mg/mL (*per os* 10 jours);

Afin d'évaluer l'induction du diabète, nous avons évalué la glycémie chaque trois (03) jour (J1, J4, J7, J10) et J13 après l'arrêt du traitement.

### **1.5.5.1. Détermination de la glycémie**

La glycémie, a été mesurée tous les 3 jours et cela à des horaires fixes, à l'aide de glucomètre à bandelettes On-Call-Plus *ACON*.

Le sang a été prélevé à partir de la veine caudale des rats femelles en effectuant une petite incision dans la partie distale de la queue (BVA, FRAME, BSPCA, UFAW, 1993). Après chaque opération établie, la queue de l'animal a du être désinfectée à l'aide de coton imbibé de Bétadine.

### **1.5.5.2. Sacrifice et préparation des prélèvements**

Le matin et à la même heure choisie pour mesurer la glycémie, tous les rats femelles de tous les lots ont été décapités à l'aide de lames bistouri stériles. Après chaque décapitation, le sang a été prélevé dans des tubes héparines et tout de suite centrifugé à 5000 trs/min pendant 25min. Le plasma récolté a été ensuite séparé dans des tubes Eppendorf et conservé à  $-18^{\circ}\text{C}$  pour nous permettre de doser les paramètres biochimiques (Annexe VI).

### **1.5.5.3. Analyse statistique et expression des résultats**

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes d'erreur standard à la moyenne. Une analyse de variance est effectuée sur l'ensemble des résultats pour vérifier la comparabilité des groupes de départ. Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à l'aide de logiciel « ANOVA ».



## 2. Résultats et Discussion

### 2.1. Identification des souches bifides isolées

Après purification des colonies, nous avons entamé l'étape d'identification. Les colonies qui présentaient les caractères de *Bifidobacterium* sont les seules qui ont été considérés.

#### 2.1.1. Les bifidobactéries

L'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué pour identifier une bactérie. Elle comprend une caractérisation macroscopique et microscopique.

##### 2.1.1.1. Caractères macroscopiques

La caractérisation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu MRS cystéiné additionné à l'antibiotique Gentamycin à pH 6,4 après 72h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité) (Belen *et al.*, 2006).

Plusieurs espèces appartenant dans le genre des bifidobacteries ont été isolées à partir des selles de nouveaux nés de moins de 6 mois allaités au lait maternel exclusivement. Les colonies du genre *Bifidobacterium* cultivées sur géloses MRS cystéiné additionné à un antibiotique la "Gentamycin" se sont caractérisées par des formes lisses, convexes, à contour régulier, de couleur blanche ou crème et de 1 à 2mm de diamètre (tableau 9).

**Tableau 9** : Caractères macroscopiques des colonies purifiées de *Bifidobacterium*

	Aspect des colonies	Diamètre (mm)	Forme de cellules	Gram
<b>Bf1</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf2</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf3</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf4</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf5</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf6</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf7</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf8</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf9</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf10</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf11</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf12</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf13</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf14</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1,5	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf15</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf16</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1,5	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf17</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf18</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	1	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf19</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+
<b>Bf20</b>	Colonies blanchâtres et crémeuses avec un contour régulier	2	Bacille droit, courte, elle présente des formes bifides en V en Y.	+

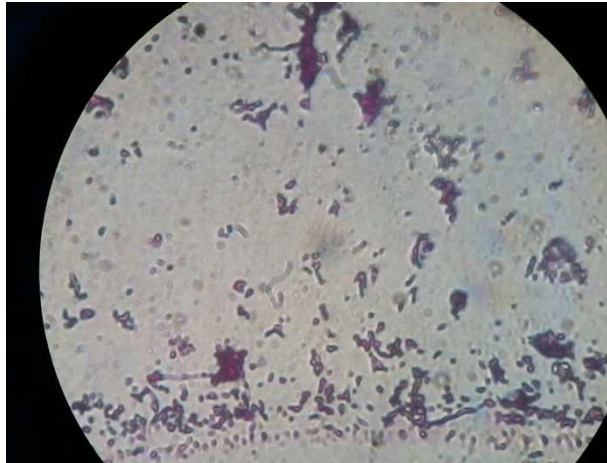
*Bf* : *Bifidobacterium*

### 2.1.1.2. Caractères microscopique

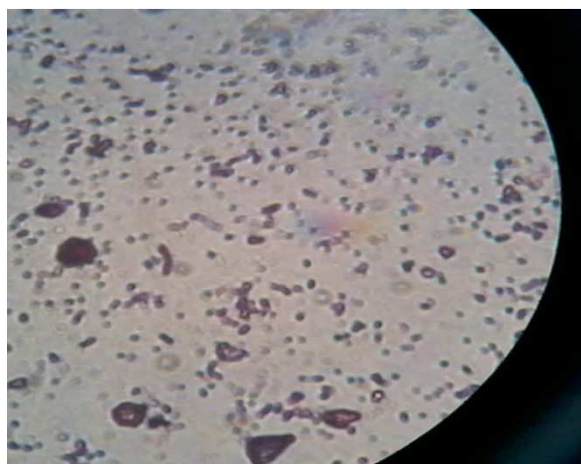
Une coloration de Gram a été effectuée et les résultats obtenus ont montré que les souches obtenus étaient des bacilles courts droits et parfois incurvés aux extrémités bien arrondis ayant une forme bifide en V et en Y.

Les cellules étaient regroupées en paires, en palissades, en étoiles et le caractère immobile a été constaté suite à l'observation des colonies à l'état frais sous microscope (Figure 9, 10 et 11).

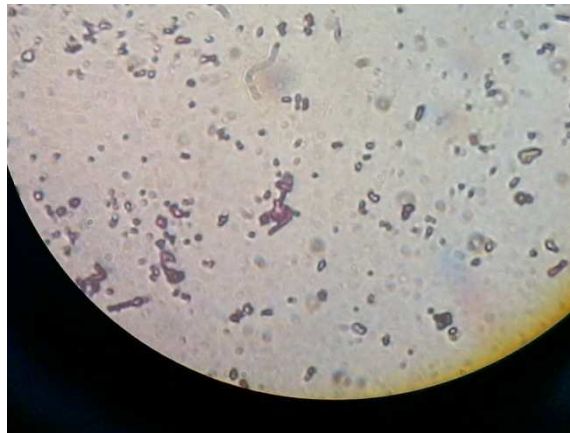
Les souches bactériennes sont apparues en couleur violette sous le microscope après coloration de Gram et se sont avérées Gram positif.



**Figure 9** : Aspect microscopique d'une colonie de la souche bifide *BfI* (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25)



**Figure 10** : Aspect microscopique d'une colonie de la souche bifide *Bfδ* (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25).



**Figure 11** : Aspect microscopique d'une colonie de la souche bifide *Bf11* (Gr : 100 . 1,25 . 10 . 0,25)

### 2.1.1.3. Identification du genre

Le tableau 10 représente les résultats obtenus par nos souches isolées après identifications par les tests biochimiques réalisés.

**Tableau 10** : Résultats d'identification des caractères biochimiques des souches bifides

Test	<i>Bf1</i>	<i>Bf2</i>	<i>Bf3</i>	<i>Bf4</i>	<i>Bf5</i>	<i>Bf6</i>	<i>Bf7</i>	<i>Bf8</i>	<i>Bf9</i>	<i>Bf10</i>	<i>Bf11</i>	<i>Bf12</i>	<i>Bf13</i>	<i>Bf14</i>	<i>Bf15</i>	<i>Bf16</i>	<i>Bf17</i>	<i>Bf18</i>	<i>Bf19</i>	<i>Bf20</i>	
Type fermentaire	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate de simons	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation du lait écrémé	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liquéfaction de la gélatine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Hm : homofermentaire

2.1.1.4. Fermentation des sucres

L'identification des souches observées suite aux tests de fermentation de sucres est résumée dans le tableau 11

**Tableau 11** : Identification des espèces du genre *Bifidobacterium* selon Mitsuoka, 1969, Mitsuoka 1984 et Biavati et al., 1992.

	<i>Bf1</i>	<i>Bf2</i>	<i>Bf3</i>	<i>Bf4</i>	<i>Bf5</i>	<i>Bf6</i>	<i>Bf7</i>	<i>Bf8</i>	<i>Bf9</i>	<i>Bf10</i>	<i>Bf11</i>	<i>Bf12</i>	<i>Bf13</i>	<i>Bf14</i>	<i>Bf15</i>	<i>Bf16</i>	<i>Bf17</i>	<i>Bf18</i>	<i>Bf19</i>	<i>Bf20</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galatose	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	-	S+	+	+	+	S+	+	+	+	S+	+	+	+	+	-	+	+
Mannose	+	+	+	-	S+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	-	+	+
Cellubiose	+	S+	+	S+	S+	S+	S+	+	+	+	S+	+	S+	S+	+	+	+	-	+/-	+
Levulose	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	S+	S+	+
Salicine	+	+	+	-	S+	+	S+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	S+	-	+	-	+/-	+	+/-	+	-	-	+/-	+/-	+	+	+	-	S+	+
Xylose	+	+	+	-	S+	+	-	S+	+	+	S+	+	+	+	+	+	S+	-	+/-	+
Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	S+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Rhamnose	+	+	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

+:résultat positif (couleur au jaune) ;- : résultat négatif (couleur bleu-verte), S : virage du couleur lentement

La détermination des genres et des espèces bactériennes réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. L'analyse des profils fermentaires (tableau 11) révèle une grande diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus.

Le sucre sélectif comme seule source de carbone tels que : le xylose, le cellubiose, le fructose, l'arabinose, le mannose au départ dans le milieu d'isolement a permis d'isoler des souches bactériennes appartenant à différentes espèces de bifidobactéries.

Le glucose et le lactose sont utilisés comme source de carbone et d'énergie par toute les espèces de bifidobacteries (Yazawa *et al.*, 1984 ; Mitsuoka, 1996).

## 2.1.2. Sélection des souches bifides selon leur aptitude technologique

### 2.1.2.1. L'activité acidifiante et l'effet inhibiteur des souches bifides

Le premier rôle des bactéries lactiques étant d'acidifier le lait, leur activité acidifiante est un important critère de sélection pour la fabrication des produits laitiers (Zourari et Desmazeaud, 1991, Samona *et al.*, 1996).

**Tableau 12** : Classification des souches de *Bifidobacterium* selon leur vitesse d'acidification et leur effet inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC25922.

Souches	$\Delta\text{pH}$	$\Delta\text{V}$ (mU pH/min)	G (t)	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Zone d'inhibition (mm)
<i>Bf1</i>	2,2	0,52	0,22	4,61	23
<i>Bf2</i>	1,99	0,45	0,66	1,51	13
<i>Bf3</i>	1,43	0,29	0,44	2,27	16
<i>Bf4</i>	1,87	0,41	0,71	1,42	13
<i>Bf5</i>	1,85	0,41	0,89	1,12	12
<i>Bf6</i>	1,76	0,38	0,82	1,22	14
<i>Bf7</i>	1,27	0,25	0,46	2,16	19
<i>Bf8</i>	2,23	0,53	0,39	2,57	24
<i>Bf9</i>	1,5	0,31	1,36	0,74	12
<i>Bf10</i>	2,13	0,50	0,47	2,15	21
<i>Bf11</i>	2,14	0,50	0,50	2,00	22
<i>Bf12</i>	1,77	0,38	0,49	2,03	19
<i>Bf13</i>	1,85	0,41	0,58	1,73	17
<i>Bf14</i>	1,97	0,45	0,63	1,58	16
<i>Bf15</i>	1,67	0,36	0,31	3,21	21
<i>Bf16</i>	2,1	0,48	0,35	2,86	19
<i>Bf17</i>	1,65	0,35	0,35	2,84	19
<i>Bf18</i>	1,75	0,38	0,40	2,52	20
<i>Bf19</i>	1,94	0,43	0,30	3,30	24
<i>Bf20</i>	2,04	0,46	0,28	3,59	22

$\Delta\text{pH}$  : pH initiale- pH final ;  $\Delta\text{V}$ : vitesse d'acidification (en mU pH/min)  $\Delta\text{pH}/ \Delta\text{T}$  ;

$G = T \cdot \text{Log}_2 (\text{Log} V_f - \text{Log} N_i)$  ;  $\mu = 1/G$  ;  $N_f$  : Nombre des UFC obtenu au temps final ( $T_{24}$ ) ;

$N_i$  : Nombre des UFC obtenu au temps initial ( $T_0$ ).

La sélection des souches est effectuée sur la base de l'activité antimicrobienne et l'activité acidifiante. Les meilleurs résultats ont été enregistrés par la souche *Bf8* ( $\Delta\text{pH}= 2,23$ ,  $\Delta\text{V}=0,53$   $\text{Zi}= 24\text{mm}$ ), *Bf1* ( $\Delta\text{pH}=2,2$   $\Delta\text{V}= 0,52$  et  $\text{Zi}= 23\text{mm}$ ), dont les deux espèces sont *Bifidobacterium breve* selon l'identification Biavati et al., (1992) et Mitsuoka (1969).

La présence de germe pathogène dans les selles de nourrissons diarrhéiques peut s'expliquer par l'état de santé du nourrisson (diarrhée) : affaiblissement du système immunitaire, la nature de la diarrhée (diarrhée aigue), le nombre réduit des bifidobactéries retrouvées dans leurs selles ainsi que les conditions externes (hygiène, la prise en charge...).

La multiplication des microorganismes à l'intérieur du tractus intestinal est déterminée par des facteurs associés à l'hôte. L'un de ces facteurs est la composition de la flore intestinale (Saavedra et al., 1994).

Tojo et al., (1987) rapporte que *Campylobacter jejuni* peut être éliminé plus rapidement par une souche de *Bf.breve* que par les médicaments antidiarrhéiques (Gibson et Wang, 1994).

Des études ont montré qu'un traitement à *Bf. longum* est d'un grand intérêt dans la normalisation de la flore fécale, en inhibant la colonisation par les pathogènes, in vivo, montrèrent l'effet antagoniste de *Bifidobacterium* contre *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* et *Yersinia enterocolitica* (Frick et al., 2007).

Des études montrent que dans des cultures mixtes de *Bifidobacterium* avec *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* et *Shigella* ainsi que *Vibrio Cholerae*, *Bifidobacterium* était capable d'exercer un effet inhibiteur lié à la production d'acides entre autres (Lievin et al., 2000 ; Arboleya et al., 2010)

Dans notre étude : notre premier critère de choix a porté sur la souche *Bf8* qui présente une meilleure activité antimicrobiennes vis-à-vis de la souche pathogène *Escherichia coli* ATCC25922 ( $\text{Zi}= 24\text{mm}$ ). De même pour le deuxième critère qui est l'intérêt technologique, nous avons choisis souche *Bf8* ( $\Delta\text{pH}= 2,23$ ,  $\Delta\text{V}=0,53$ ).

## 2.2. Identification des bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes considérées sont (03) trois souches de références : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella* ssp.

L'identification des souches a été maîtrisée. En effet la vérification de leur pureté s'est faite par l'étude des caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques (forme des colonies, mobilité, coloration de Gram) et biochimiques (test oxydase, test catalase, API 20<sup>E</sup> (Biomérieux®)).

### 2.2.1. *Staphylococcus aureus* ATCC25923

#### 2.2.1.1. Caractères macroscopiques

Elle se cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose en formant sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque "doré".(Figure 12)



**Figure 12:** Aspect macroscopiques des colonies de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

#### 2.2.1.2. Caractères microscopiques

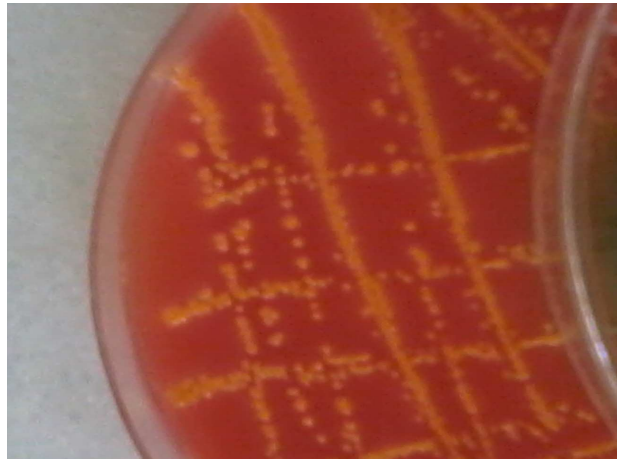
*Staphylococcus aureus* est une coccobactérie Gram positif, catalase positive, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, de diamètre d'environ 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ , est immobile, asporulé et facultativement anaérobique.



## **2.2.2. *Escherichia coli* ATCC 25922**

### **2.2.2.1. Caractères macroscopiques**

Sur milieu Hektoen et du fait de son utilisation du lactose (contrairement aux salmonelles qui sont lactose-), *Escherichia coli* donne des colonies saumon (Guillaume, 2004).(Figure 13)



**Figure 13 :** Aspect macroscopiques des colonies d'*Escherichia coli* ATCC 25922

Les colonies d'*Escherichia coli* ATCC 25922 donnent la couleur jaune saumon, ronde, plus ou moins régulière, souvent peu bombée dans le milieu de culture Hecktoen

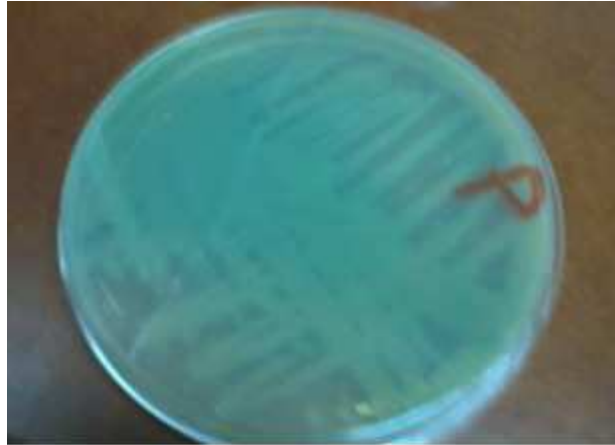
### **2.2.2.2. Caractères microscopiques**

*Escherichia coli* est de forme bacille gram négatif de la famille des enterobacteriaceae. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3  $\mu\text{m}$ ).

## **2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853**

### **2.2.3.1. Caractères macroscopiques**

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* apparaissent d'une couleur bleu-vert dû à la formation de la pyocyanine. Elles sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé. (Figure 14)



**Figure 14 :** Aspect macroscopiques des colonies *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sur gélose nutritive

La température optimale de croissance est comprise entre 30°C et 37 C. Cette bactérie présente un métabolisme aérobie.

*P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments, entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge). C'est une bactérie dépourvue d'enzymes dégradant le lactose et dégageant une odeur de raisin ou seringa *in vitro*.

### **2.2.3.2. Caractères microscopiques**

*Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif se présente sous forme de bacilles fins droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche) dépourvus de spores et de capsule. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles et ces caractères ont été cités.

Prescott et *al.*, (2003) qui ont décrit que *P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif.

### **2.2.4. Salmonella ssp**

#### **2.2.4.1. Caractères macroscopiques**

*Salmonella* ssp. présente des colonies noires ou à centre noir: production de sulfure de fer noir due à la réduction du thiosulfate en H<sub>2</sub>S: souche H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>. (Figure 15)



**Figure 15:** Aspect macroscopiques des colonies de *Salmonella* ssp.

#### 2.2.4.2. Caractères microscopiques

Les Salmonelles sont des bactéries bâtonnets de gram négatif, facultativement anaérobies qui forment des colonies typiques. La coloration de Gram est une méthode qui permet d'identifier rapidement les types de bactéries.

Le tableau 13 conclure les résultats macroscopiques et microscopiques des bactéries pathogènes étudiées

**Tableau 13 :** Aspects macroscopiques et microscopiques des bactéries pathogènes testées

Souches	Aspect macroscopiques	Aspect microscopiques	Coloration de Gram
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Colonies jaune sommons	Bacille	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Colonies avec des pigments verts	Bacille	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune	Cocci	+
<i>Salmonella</i> ssp.	colonies noires ou à centre noir	Baciles	-

#### 2.2.5. Identification biochimiques des bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes ont été identifiées par la galerie API 20 E (bioMerieux) avec quelques tests biochimiques ajoutés (Production d gaz, RM, Catalase, Oxydase, Indole et ADH).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des tests biochimiques obtenus par les galeries API 20 E sont regroupés dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Identification biochimiques de souches isolées par la galeries API 20 E

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	Cit	H <sub>2</sub> S	Uré	TDA	Ind	VP	Gas	RM	Cat	Oxy
<i>Salmonella</i> ssp.	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sucres	Gél	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mel	Amy	Ara				
<i>Salmonella</i> ssp.	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+				
<i>S. aureus</i> ATCC25923	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-				
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+				
<i>P. aerogenosa</i> ATCC27853	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Cat : catalase ; oxy : oxydase ; Uré : uréase ; Ind : indole ; gaz : production de gaz ; RM : rouge de méthyle ; VP : Proskauer Voges ; Cit : citrate de simmons ; Gél : Gélatine ; Lac: lactose; Glu : Glucose Man : Mannitol ; Ino : Inositol ; Sor : Sorbose ; Rha : Rhamnose ; Sac: Saccharose ; Mel: Melibiose; Amy : Amygdaline ; Ara: Arabinose.

La première étape de l'identification biochimique est la recherche de l'oxydase : La colonie suspecte est déposée sur une pastille d'oxydase imprégnée d'eau physiologique dont *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella* ssp Sont Oxydase négative (-) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 oxydase positive (+).

D'après Les tests biochimiques, nous avons identifié le genre de *Salmonella* ssp , confirmé nos souches de références *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## 2.3. Culture de *Spirulina platensis*

### 2.3.1. Réactivation de la souche algale

Lors de la réactivation de la souche algale dans l'eau bicarbonate, les filaments de *Spirulina* se détachent les uns des autres. Le milieu se colore en vert-bleu dû au pigment extracellulaire de la spiruline en particulier : la phycocyanine et la chlorophylle.

Les filtrations successives sur papier Whatman nous permettent de réduire le nombre de bactéries dans la culture. Les filtrats obtenus sont utilisés comme inoculum pour ensemençer les milieux après deux à trois filtrations.

### 2.3.2. Purification de la spiruline

Lorsque les cultures uni-algales sont développées ; nous visons l'élimination des bactéries.

Ainsi pour avoir une culture axénique ; nous avons eu recours aux antibiotiques qui nous permettent d'éliminer la totalité des bactéries. A la fin de cette étape ; nous avons obtenu une culture de *Spirulina platensis* presque totalement pure.

### 2.3.3. Observation microscopique de la spiruline

L'observation microscopique de la spiruline a montré la forme spirale.



**Figure 16** : Aspect microscopique de *Spirulina platensis*

(Gr : 100 . 1,25 . 10 . 0,25)

### 2.3.4. Estimation de la croissance de la spiruline

L'estimation de la croissance a été réalisée par la mesure pH, du poids sec, de la phycocyanine et de la biomasse (Doumandji et *al.*, 2012).

La souche de spiruline étudiée a été cultivée dans un milieu non renouvelé "système clos" dans des conditions idéales de salinité (16 g/L) et de pH alcalin (9,5). Les courbes de croissance de la spiruline obtenues sont exprimées en fonction du poids sec et de la concentration de biomasse.

D'une manière globale : la tendance des courbes relatives au poids sec et à la concentration de la biomasse sont similaires.

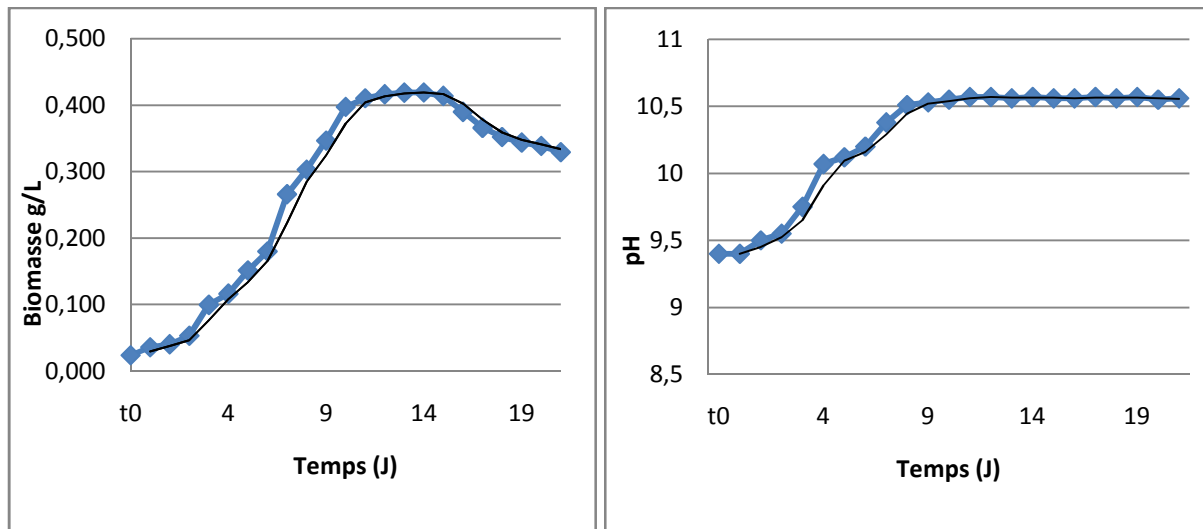
En effet, l'évolution de la quantité de biomasse obéit à la loi classique de la croissance des microorganismes en culture discontinue "batch" définie par les différentes phases : phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin.

Nous distinguons une courte phase de latence correspondant au temps d'adaptation avec les conditions du milieu. Ces dernières étant les mêmes que celles utilisées pour l'inoculum et qui ont permis de réduire le temps d'adaptation. Selon Le Borgne (1986), il faut attendre un certain temps pour remarquer un trouble visible. La durée de cette phase dépend de l'âge de l'inoculum et son adéquation enzymatique aux nouveaux substrats du milieu en question.

A la phase de latence succède la phase d'accélération où nous assistons à des divisions successives pendant lesquelles le taux de croissance spécifique augmente et tend vers la valeur maximale pour arriver à son maximum et à la phase exponentielle de la croissance ou logarithmique qui dure 8 - 9 jours.

A partir du 10<sup>ème</sup> j survient une stabilité du poids de la biomasse : ce qui correspond à la phase stationnaire d'une durée de 2 - 3 jours ( $\mu = 0$ ) pendant laquelle la population de spiruline atteint sa valeur maximale. Elle représente un équilibre entre le gain des cellules viables et celles qui commencent à se faiblir à cause des conditions difficiles du milieu. Au bout de 15 jours, le milieu de culture commence à s'appauvrir, d'où une régression de la concentration de la biomasse (poids sec) jusqu'à la lyse totale de la bactérie.

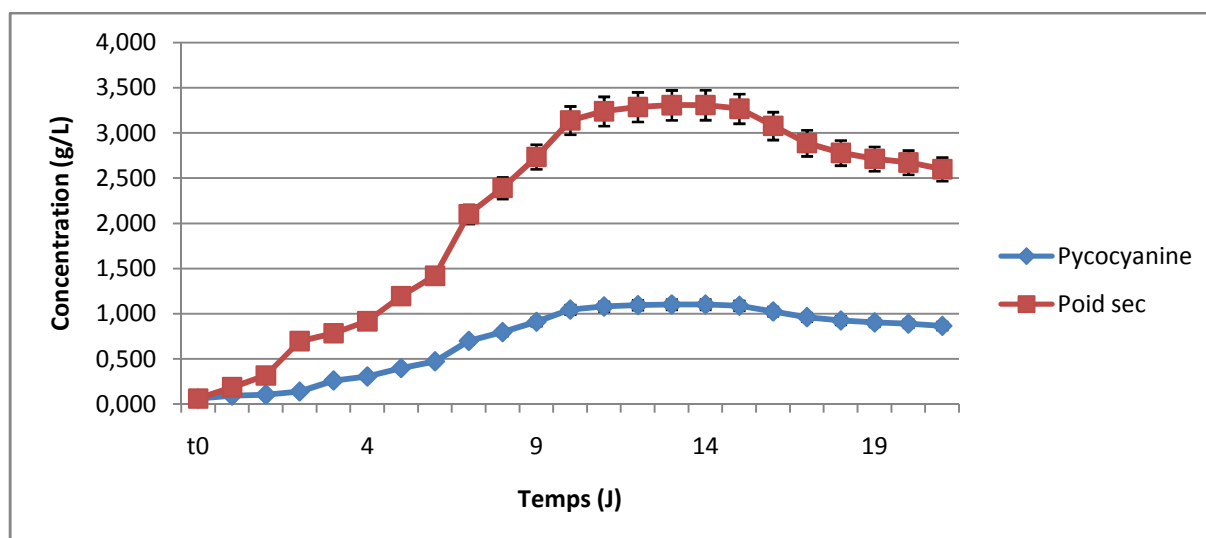
De ce qui précède, il apparaît que les méthodes préconisées (mesure du poids sec et lecture de l'absorbance) pour l'estimation et le suivi de la cinétique de croissance de la spiruline, semblent être similaires.



**Figure 17** : Evolution du pH et de la biomasse de *Spirulina platensis* dans le milieu Hiri

Le pH du milieu, paramètre de croissance plus subtil car sujette à des variations le long de la journée permet tout de même de savoir s'il y a croissance ou pas de la spiruline. Pour ce faire, cette mesure est prise au même moment de la matinée tout comme la concentration. Dans la journée, le pH croit car dans la photosynthèse, le  $\text{CO}_2$  est absorbé par la spiruline alors que dans la nuit, la respiration plus intense libère du  $\text{CO}_2$  dans le milieu abaissant par conséquent le pH (Fox, 1986 ; Doumandji *et al.*, 2012).

De même en consommant les carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et bicarbonates ( $\text{CO}_3\text{H}^-$ ) de son milieu : les spirulines tendent à augmenter encore l'alcalinité du liquide. Ainsi une augmentation du pH sous entend une nutrition carbonée et par conséquent un accroissement de population de spiruline.



**Figure 18 :** Evolution du poids sec, et de phycocyanine de la souche de *Spirulina platensis* et en fonction du temps

Plus la concentration des spirulines augmente plus la concentration de phycocyanine est grande dans le milieu.

Pour une absorbance de la spiruline égale à 0,139 : la masse sèche de la spiruline est de 0,697 g/L de milieu de culture. Avec une absorbance égale à 1 : la concentration est égale 3 g/L.

### 2.3.5. Analyses physicochimiques de la spiruline

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la poudre de spiruline figurent dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Résultats des analyses physico-chimiques de la spiruline

Paramètres	La poudre de spiruline %
Potentiel d'hydrogène	7,81±0,05
Taux d'humidité	5,42±0,031
Teneur en protéines	60,32±0,15
Teneur en matière grasse	7,28±0,021
Taux des sucres totaux	17,63±0,133
Taux des cendres	6,88±0,05
Apport calorique	369.28 kcal



La composition de la spiruline étant sujette à des variations en fonction des conditions de culture et des techniques de production. Certains écarts ont pu être observés.

### **2.3.5.1. Le pH**

Nous avons remarqué que le pH de la poudre de spiruline ; *Spirulina platensis* ; reconstituée est de  $7,81 \pm 0,05$  : est un pH légèrement basique, étant donnée que la spiruline a été réalisée dans un milieu alcalin.

### **2.3.5.2. Le taux d'humidité**

Le taux d'humidité est la teneur en eau de la poudre de spiruline, mesurée en pourcentage d'eau par rapport à son poids sec.

Nous avons observé un taux d'humidité de  $5,42 \pm 0,031\%$ . Cette valeurs est très proche de celle trouvée par des travaux précédents : Espiard (2002) de 4-6% ; Pierlovisi (2008) 4-7%.

Il est facile d'avoir une idée sur la qualité du lavage ou de l'essorage de la biomasse, soit en prenant le pH de la biomasse pressée (qui doit être entre 7 et 9), soit en mesurant le pH d'une suspension à 4 % de spiruline sèche dans l'eau.

Lorsqu'une spiruline a été séchée à température assez haute (60 à 65°C) et qu'elle est réhydratée, ses cellules éclatent et le pH baisse, jusqu'à 5 parfois. Le pH obtenu est d'autant plus bas que la spiruline est bien essorée. Ce bas pH serait du à l'acidité interne des cellules et/ou à la fermentation commençante (Jourdan, 2012).

### **2.3.5.3. Les protéines**

Il ressort de ces résultats que la spiruline est bien l'aliment le plus riche en protéine que l'on connaisse avec une moyenne de  $60,32 \pm 0,15$  % de protéines totales dans l'échantillon.

Ce chiffre 60,32% acquière une grande valeur si on les compare avec les teneurs moyennes en protéines de certaines graines de légumineuses: haricot (22%), pois (22%) et même le soja (38%) pourtant réputé pour sa richesse en protéines. *Spirulina platensis* apparaît donc comme une des espèces végétales les plus riches en protéines (Leonard et Compere, 1967).

La spiruline est particulièrement riche en protéines puisqu'elles représentent 50 à 70 % de sa matière sèche (Clément, 1975a ; Fox, 1999). A noter que les teneurs les plus élevées

sont obtenues lorsque la récolte a lieu au début de la période lumineuse. D'autre part, par comparaison avec les autres sources de protéines végétales qui sont toutes moins riches. La spiruline est consommable dans sa totalité.

### 2.3.5.4. Les glucides

D'après le tableau 15, la teneur en glucide représente  $17,63 \pm 0,133$  % cette valeur est similaire avec les valeurs d'autres chercheurs (Quillet, 1975, Shekharam et *al.*, 1987 ; Falquet et Hurni, 2006) dont les glucides représentent 13,6 à 25% de la matière sèche des Spirulines. La paroi des Spirulines comme les bactéries Gram-négatives, est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides.

Les sucres simples comme le glucose, le fructose et le saccharose existent à l'état de traces. Le glycogène représente 0,5%, le glycérol et des polyalcools comme le mannitol et le sorbitol sont présents en petite quantité.

L'essentiel des glucides assimilables est constitué par ces polymères. Ils constituent l'ensemble des mucilages extractibles par l'eau, soit 11 à 12% du poids sec. Le glucosane et le rhamnosane constituent respectivement 1,9% et 9,7% du poids sec de la Spiruline (Quillet, 1975). La glucosamine représente une part non négligeable des polysaccharides. Par contre, le galactose et ses dérivés sont absents de cet équipement glucidique.

La paroi de la spiruline présente une teneur en glycogène estimée à environ 0,5% de son poids sec (Quillet, 1975 ; Fox, 1999) et une teneur en cellulose très faible, soit 0,5% de son poids frais (Jacquet, 1974). Elle serait donc facilement assimilable même par les personnes ayant une absorption intestinale faible.

La spiruline est constituée aussi de polysaccharides sulfatés spécifiques comme le spirulane-calcique (Ca-Sp) ou le spirulane-sodique (Na-Sp) (Lee et *al.*, 1998). Ces polysaccharides sont porteurs de nombreux résidus sulfatés et se composent de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, d'acide glucuronique et galacturonique, ainsi que d'ions calcium et sodium. Ils auraient d'après des études *in vitro* des propriétés anticoagulantes<sup>2</sup>, immunostimulantes et antivirales (Lee et *al.*, 2001).

### 2.3.5.5. Les cendres

D'après Pierlovisi (2008) la richesse de la spiruline en fer : la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande, se révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques.

Le calcium et le phosphore sont présents à des taux comparables à ceux retrouvés dans le lait et dans des proportions qui excluent tout risque de décalcification par apport excessif de phosphore.

La spiruline est aussi une bonne source de magnésium biodisponible chez l'Homme. Le potassium est richement représenté dans la spiruline, est intéressant dans les pays industrialisés où le rapport sodium/potassium est souvent trop élevé. Enfin, Il est possible d'enrichir des souches de spiruline en certains oligoéléments (Zinc, Sélénium...) en modifiant leur milieu de culture.

### 2.3.5.6. Lipides

Avec un taux de matières grasses de  $7,28 \pm 0,021$  % de poids sec, la spiruline peut se vanter de faire partie des sources de protéines les moins grasses. Cette caractéristique lui donne l'avantage de se conserver assez aisément en étant à l'abri des phénomènes d'oxydation des lipides et de rancissement.

D'après Hudson et Karis (1974), les lipides représentent généralement de 6 à 8% du poids sec de la Spiruline mais ce pourcentage peut atteindre 11%. La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés (AGPI). Elle se subdivise en deux fractions : une fraction saponifiable « ou acides gras » (83%) et une fraction insaponifiable (17%) (Clément, 1975ab ; Dillon et *al.*, 1995).

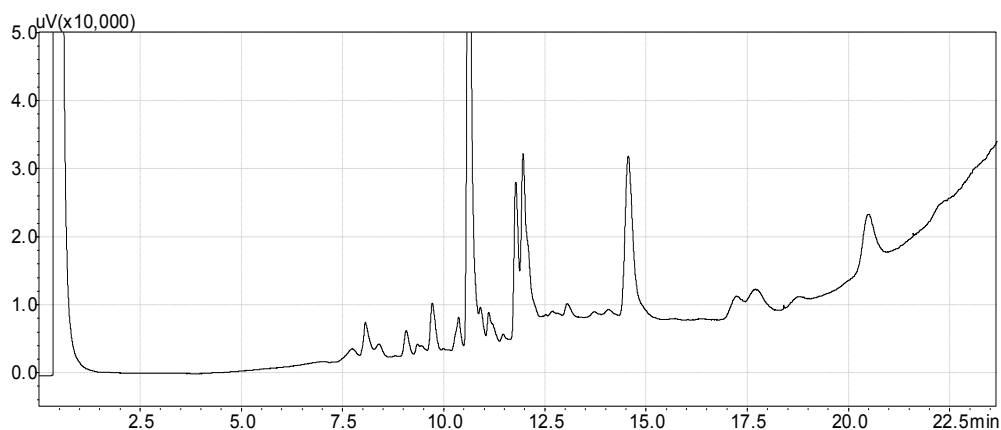
D'après Pierlovisi (2008) la spiruline est un aliment à faible apport calorique. Les lipides totaux varient entre 5,6 et 7 % du poids sec de l'algue. La fraction saponifiable (83 %) est constituée majoritairement de diglycérides (mono et digalactosyl diglycérides), ainsi que de phosphatidyl glycérides. On souligne aussi la présence de sulfoquinovosyl diglycérides récemment étudiés *in vitro* pour leur effet protecteur vis-à-vis de certaines infections virales.

### 2.3.5.6.1. Détermination des acides gras

Il est considéré que chez l'homme : les besoins en acides gras essentiels sont de 1 ou 2% des calories alimentaires pour l'adulte et de 3% pour les enfants (Pascaud et Brouard, 1991). Il est maintenant bien établi que l'apport de lipides essentiels influe (entre autres) sur le système immunitaire tant humoral que cellulaire (Hwang, 1989). On range actuellement les acides gras essentiels en deux groupes (oméga-3 et oméga-6) caractérisés par la position de l'insaturation la plus proche du groupe méthyl terminal. Comme les acides oméga-3 et oméga-6 sont convertis chez l'homme en dérivés biochimiques distincts qui semblent avoir des effets antagonistes. Certains spécialistes recommandent actuellement un rapport oméga-6/oméga-3 situé entre 4 et 5 (Pascaud *et al.*, 1993).

Pour une analyse détaillée des acides gras de la spiruline, nous nous rapportons à Hudson et Karis (1974); les glycolipides de la spiruline ont aussi été étudiés en détail (Xue *et al.*, 2002).

Le profil et les pourcentages des acides gras de la spiruline par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont récapitulés dans la figure 19 et le tableau 16



**Figure 19** : Profil des acides gras de *Spirulina platensis*

Nef (09) acides gras sont identifiés dans notre algue *Spirulina platensis* : acide Laurique (3,10%), acide Myristique (3,60%), acide Palmitique (42,79%), acide Palmitoléique (0,52%), acide Stéarique (1,81%), acide oléique (0,33%), acide linoléique (9,43%), acide Gamma linoléique (18,41%) et acide Béhénique (20,01%).

**Tableau 16 :** Composition en acides gras de *Spirulina platensis*

Acides Gras	Nomenclature physiologique	Temps de rétention (min)	Teneurs %	Teneur (%) selon et Falquet et Hurni (2006)	Teneur selon Benahmed-Djilali (2013)
Laurique	C 12 :0	8,066	3,10	-	-
Myristique	C 14 :0	9,718	3,60	0,2-0,5	3,67
Palmitique	C 16:0	10,615	42,79	25-60	46,02
Palmitoléique (Oméga 6)	C 16:1	10,909	0,52	0,5-10	3,07
Stéarique	C 18:0	11,111	1,81	0,5-2	0,26
Oléique (Oméga 9)	C 18:1	11,473	0,33	0,4-16,6	4,89
Linoléique (Oméga 6)	C 18:2	11,781	9,43	10-30	13,11
Gamma linoléique (Oméga 3)	C 18:3	11,961	18,41	8-40	9,53
Béhénique	C 22 :0	14,567	20,01	-	-

D'après Pierlovisi, (2008) le profil d'acides gras de la spiruline varie en fonction de la souche étudiée. En règle générale, après hydrolyse, la spiruline renferme principalement des acides gras poly insaturés essentiels à 18 atomes de carbones, notamment de la série oméga-6 ( $\omega$  6). C'est en effet une des meilleures sources d'acide gamma-linolénique (18:3  $\omega$  6) après le lait humain et certaines huiles végétales onéreuses.

La présence d'acide gamma-linolénique, 18:3oméga-6 est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants et de sa haute valeur alimentaire présumée (Otlés, 2001). Normalement synthétisé chez l'homme (à partir de l'acide linoléique, 18:2oméga-6, d'origine végétale) l'acide gamma linoléique peut néanmoins être directement assimilé avec profit en cas de trouble ou d'insuffisance de sa synthèse endogène (Merck, 1994).

L'importance de ces acides gras tient à leurs devenir biochimiques: ce sont les précurseurs des prostaglandines, des leukotriènes et des tromboxanes qui sont autant de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires.

Cette richesse lui donne un intérêt biologique particulier puisque que cet acide gras est un précurseur des prostaglandines, molécules ayant une activité anti-inflammatoire et immunostimulante au sein de l'organisme.

D'autres acides gras essentiels comme l'acide linoléique (18:2  $\omega$  6) sont retrouvés dans la spiruline ainsi qu'un fort pourcentage d'acide palmitique (acide gras saturé) permettant de préférer certaines souches à d'autres.

La fraction insaponifiable de la spiruline (17%) renferme des stérols en faible quantité (cholestérol en majeure partie, clionastérol, stigmastérol, campestérol), des terpènes ( $\alpha$  et  $\beta$ -amyrine pour l'essentiel) et des hydrocarbures saturés à longue chaîne ou paraffines (principalement du ndécaheptane, composant potentiellement toxique et devant faire l'objet d'essais toxicologiques).

La fraction saponifiable, représentant 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la Spiruline (Fox 1999), est essentiellement composée de monogalactosyl diglycéride et de digalactosyl diglycéride (23%), de sulfoquinovosyl diglycéride (5%) et de phosphatidyl glycérol (25,9%) (Xue et al., 2002). Les triglycérides ne sont présents qu'à de très faibles taux (0,3%).

La phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine et le phosphatidyl inositol ne sont pas présents en quantité appréciable. Il est à noter que 4,6% de phospholipides sont encore indéfinis.

La composition des principaux acides gras de l'espèce *Spirulina platensis* (Tableau 16) révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels (acides gras insaturés C18). Ces acides gras incluent les oméga-3 et des oméga-6 qui sont qualifiés d'essentiels car l'organisme humain en a absolument besoin et ne peut les produire.

Les acides gras omega-3 et oméga-6 de la Spiruline préviendraient l'accumulation de cholestérol dans l'organisme. Ceci pourrait expliquer en partie la diminution des taux en cholestérol et triglycérides observés lors des expériences de Ramamoorthy et Premakumari (1996) et Samuels et al. (2002). Ces expériences sur l'homme sont cependant réalisées avec de faibles effectifs et sur des sujets souffrant d'hyper cholestérolémie ou hyperlipidémie.

L'acide gamma-linolénique (non-essentiel car il peut être synthétisé à partir de l'acide gras linoléique) constitue 10 à 20% des acides gras (soit 1-2% du poids sec) chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *S. platensis*, (soit 4% du poids sec).

La spiruline figurerait parmi les meilleures sources connues d'acide gamma-linolénique, avec le lait humain, et quelques huiles végétales peu connues (huile d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre) (Ciferri 1983 ; Cohen et *al.*, 1993). La présence d'acide gamma-linolénique est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants et que c'est un précurseur de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (Falquet et Hurni, 2006).

Les sulfolipides tels les sulfoquinovosyl diglycérides qui représentent 5% de la fraction saponifiable, intéressent les chercheurs pour leur activité protectrice contre des infections virales. Le composant lipide sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) de *Spirulina platensis* riche en sulfolipides a démontré par expérience *in vitro* sa capacité à inhiber la transcriptase inverse 1 du hiv-1 et du hiv-2 alors que ce dernier est naturellement résistant à cette classe de molécules (Kiet et Durand-Chastel, 2006).

Des études *in vitro* ont indiqué que linoléique et gamma-linolénique acides pourraient affecter la croissance et l'adhérence des probiotiques (Laparra et Sanz, 2010).

### **2.3.5.7. Le pouvoir calorique**

Le pouvoir calorifique de la spiruline a été calculé à l'aide d'un calorimètre (c5000 CONTROL kika werke). Il n'est pas très élevé (369,28 kcal/g), la spiruline se rattrape aisément par sa valeur protéique et vitaminique, en comparant par d'autres aliments énergétiques tels les céréales.

### 2.3.6. Détermination de la teneur en éléments minéraux par spectroscopie d'absorption atomique

Les résultats d'analyses de la composition minérale de la poudre de spiruline sont présentés dans le tableau 17 en comparaison avec les données de Johnson and Shubert,(1986).

**Tableau 17** : Composition minérale de la poudre de la spiruline (mg/g).

	Fe	Zn	Ca	Na	K
Poudre de la spiruline	0,88	0,009	0,22	27	20
Données de Johnson and Shubert, (1986)	0,58-1,8	0,021-0,040*	1.3 - 14	4,5	6,4 – 15,4

\* : Valeur obtenus par enrichissement spécifique

D'après le tableau 17 nous remarquons que la spiruline de Tamanrasset présente des valeurs relativement élevées en éléments essentiels pour l'organisme tels que le sodium le potassium qui sont respectivement, de 27 et 20 mg/g de matière sèche, cependant, la teneur en fer.

La spiruline est connue par sa richesse en fer qui peut vari entre 0,55 et 6 mg/g MS (Flaquet et Hunri, 2006).

Il est aussi rapporté que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande (Puyfoulhou et *al.*, 2001).

Plusieurs études ont été effectuées, montrant l'utilisation de la spiruline comme agent bio-adsorbant des métaux (Rangsayatorn et *al.*, 2004 ; Solisio et *al.*, 2006).

Toutefois, les micro-algues photosynthétiques comprennent des fonctions carboxyles sulfates et d'autres fonctions ionisables qui permettent la fixation ionique ou chimique de molécules (cas de la pluparts des oligo-éléments et des métaux essentiels). Mais les métaux toxiques comme le plomb et le mercure sont aussi concernés par ce phénomène de séquestration. Et c'est la raison pour laquelle il est important de réaliser un contrôle sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à l'alimentation humaine. (Benahmed Djilali, 2013).



La richesse de la spiruline en fer, dont la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande, se révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques.

Le calcium et le phosphore sont présents à des taux comparables à ceux retrouvés dans le lait et dans des proportions qui excluent tout risque de décalcification par apport excessif de phosphore.

Le potassium est richement représenté dans la spiruline, il est intéressant dans les pays industrialisés où le rapport sodium/potassium est souvent trop élevé.

Enfin, Il est possible d'enrichir des souches de spiruline en certains oligoéléments (Zinc, Sélénium...) en modifiant leur milieu de culture (Pierlovisi, 2008).

### 2.3.7. Détermination des pigments

**Tableau 18 :** Teneur en phytonutriments de *Spirulina platensis*

Composé	Chlorophylle totale (mg/g)	Caroténoïdes (mg/g)	Phycocyanine (%)
<i>Spirulina platensis</i>	3,67 ± 0,05	3,505 ± 0,001	10,62 ± 0,01

La spiruline renferme de la chlorophylle, typique chez les végétaux, des caroténoïdes et des phycobiliprotéines. Ces pigments présentent un intérêt dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

#### 2.3.7.1. Phycocyanine

D'après nos résultats obtenus la phycocyanine représente une valeur de 10,62 ± 0,01% soit (10,62 ± 0,01mg/g). Cette valeur est similaire à celle trouvée par Jourdan (2012) dont la valeur est de 10 % de la spiruline sèche.

*Spirulina platensis* est une excellente source de phycocyanine. La phycocyanine aurait une activité antitumorale. Elle induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses (Li et al., 2006), aurait une activité antioxydante et un rôle d'hépatoprotection. En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel (Chopra et Bishnoi, 2007). Phycocyanines constituent environ 15-25 % du poids sec des microalgues (Bermejo et al., 1997; Romay et al., 2003 ).

la phycocyanine de la Spiruline conduit à la protection des îlots pancréatiques, la diminution de la glycémie à jeun . Elle est caractérisée par la capacité anti-oxydante totale de maintenir et diminuer le cholestérol et les triglycérides (Downham et Collins, 2000 ; Ou et *al.*, 2012).

### 2.3.7.2. Caroténoïdes

D'après les données regroupées dans le tableau 18, nous remarquons que notre algue *Spirulina platensis* renferme  $3,505 \pm 0,001$  mg/g. Cette valeur est proche de la valeur de Jourdan (2012) dont le taux des caroténoïdes est 3,7 g/kg (3,7 mg/g).

Parmi les vitamines liposolubles, nous notons une teneur très élevée en  $\beta$ -carotène. Cette provitamine A représenterait 80% des caroténoïdes totaux (Pierlovisi, 2007), le reste étant principalement composé de xanthophylle, de cryptoxanthine, d'échinénone, de zéaxanthine et de lutéine.

La vitamine A n'étant pas synthétisée par l'organisme humain, elle doit être obligatoirement apportée par l'alimentation. Elle est impliquée dans la croissance des os et la synthèse de pigments de l'oeil.

La Spiruline ne contient pas de vitamine A libre, seulement du  $\beta$ -carotène. Cependant, un surdosage de  $\beta$ -carotène ne peut être toxique. L'organisme humain convertit ce pigment en vitamine A « ou rétinol » en quantité nécessaire à ses besoins (Henrikson, 1994). Il n'y a donc pas de risque d'excès de vitamine A (hypervitaminose).

Une étude récente de Wang et *al.* (2008) portant sur des chinois adultes montre que l'ingestion de 4.5 mg de  $\beta$ -carotène provenant de la Spiruline apporte 1mg de vitamine A. Ainsi, les teneurs de vitamine A à 156–378  $\mu$ g de vitamine A par g de Spiruline. Il faudrait prendre entre 3 et 6 g de Spiruline pour couvrir les besoins journaliers recommandés chez l'adulte, estimés à 900  $\mu$ g.

En ce qui concerne les enfants de 6 mois à 3 ans, si le coefficient de conversion du  $\beta$ -carotène en vitamine A est le même que pour les adultes, compte tenu de leur besoin journalier en cette vitamine (300 - 500  $\mu$ g), il leur faudrait une dose de Spiruline entre 1 et 3g/j.

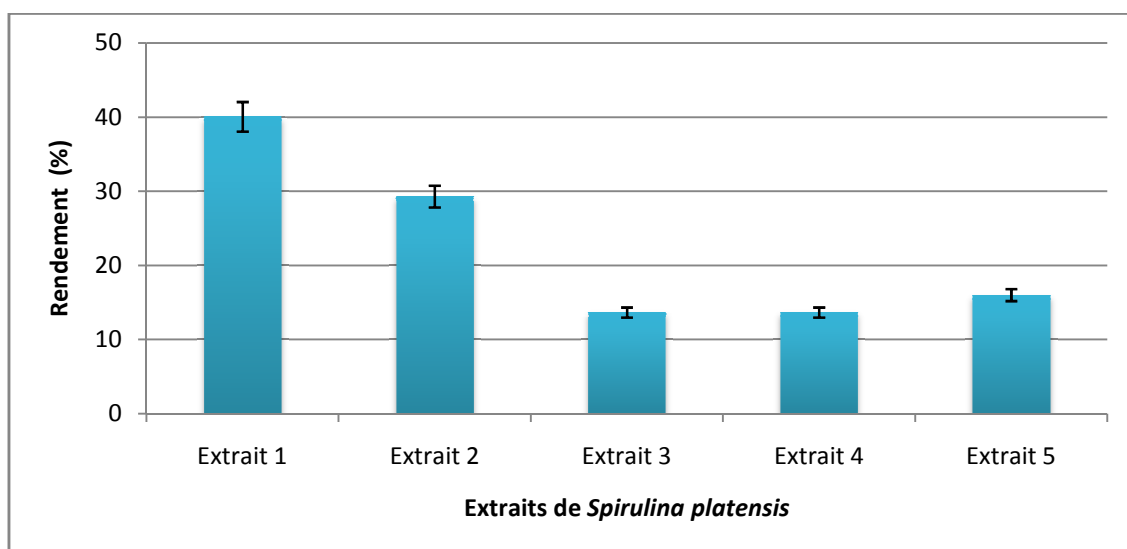
### 2.3.7.3. Chlorophylles

La spiruline possède un des taux les plus élevés en pigments chlorophylliens que l'on puisse trouver dans la nature environ 1 %. Elle ne dépasse pas cependant les niveaux de la chlorelle (2 à 3 %) qui est aussi une microalgue très intéressante sur le plan nutritionnel.

### 2.3.8. Extraction des composés phénoliques par les différents solvants

#### 2.3.8.1. Détermination du rendement pour chaque extrait de la spiruline

La figure 20 représente le rendement des extraits de spiruline obtenus par différentes solvants



**Figure 20 :** Rendement des extraits de la spiruline

L'extraction des polyphénols par les solvants organiques à partir de la poudre de Spiruline, montre que l'extrait 1 représente le rendement le plus élevé (40,05%) suivi de l'extrait 2 (18%) puis de l'extrait 5 (16%).

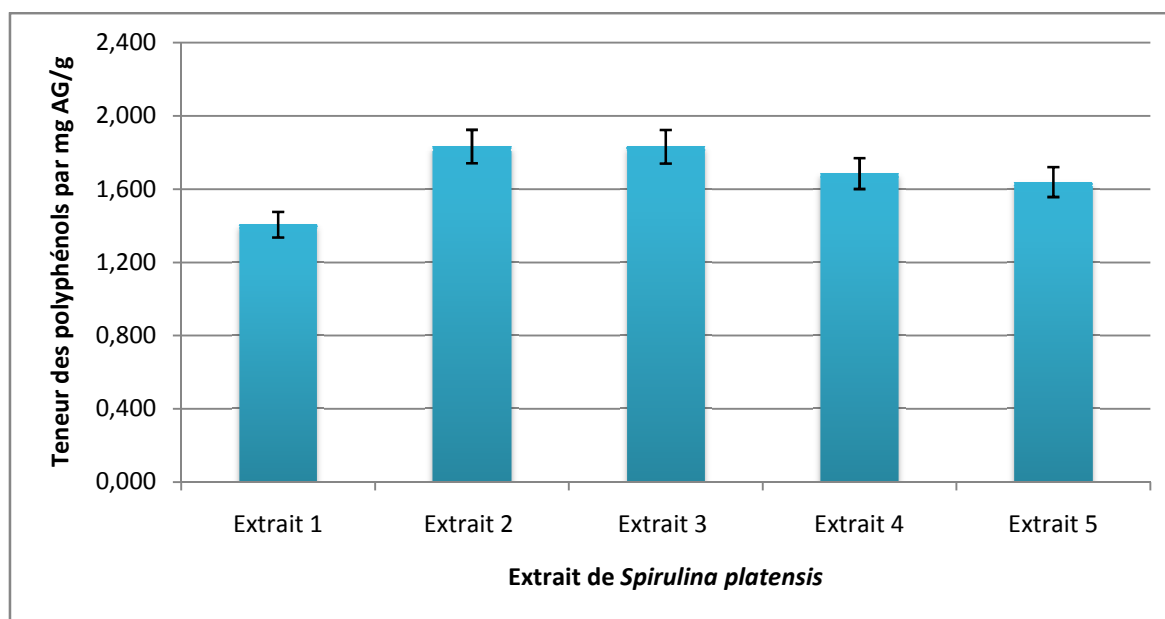
Le rendement le plus faible (13,65%) est obtenu par l'extrait 3 et l'extrait 4.

Nous avons utilisé une méthode d'extraction à température ambiante et sous agitation contenue, ce qui permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable. En effet la température élevée provoquerait l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant, et affecterait leur quantification.

L'extraction de composés phytochimiques des systèmes naturels solides perméables à l'aide solvants est une première étape importante dans la caractérisation des systèmes naturels phénoliques riches. Phénolique solubilité est fortement influencé par leur structure chimique, qui peut varier de petites molécules qui contiennent différents types et le nombre de groupes fonctionnels (OH , O, ou COOH) ou conjugués (glycosides , des aldéhydes, des alcools, des groupes méthyle ) des composants à de grosses molécules polymérisées (Mutlib et Abbott, 1992; Jung et *al.*, 2000 ; Naczk Shahidi, 2006). En outre, les phénols peuvent interagir avec d'autres substances, telles que des glucides, des protéines et des complexes insolubles conduisant à (Hagerman et Butler, 1978; Jung et *al.*, 2000 ; Kang et *al.*, 2004) . Étant donné que phénoliques sont une classe très diversifié de composés phytochimiques avec la composition globale profils qui sont spécifiques de la plante (Naczk et Shahidi, 2006).

### 2.3.8.2. Détermination des composés phénolique selon la méthode de Folin-Ciocalteu)

La figure 21 représente la teneur des polyphénols par mg AG/g d'extrait sec de différents extraits de *Spirulina platensis*



**Figure 21** : Détermination de la teneur des polyphénols par mg AG/g d'extrait sec

Le réactif de Folin-Ciocalteu est largement utilisé pour la détermination des composés phénoliques basées sur la réaction d'oxydo-réduction et il est utilisé pour les tests de la biomasse de la plante, y compris les micro-algues.

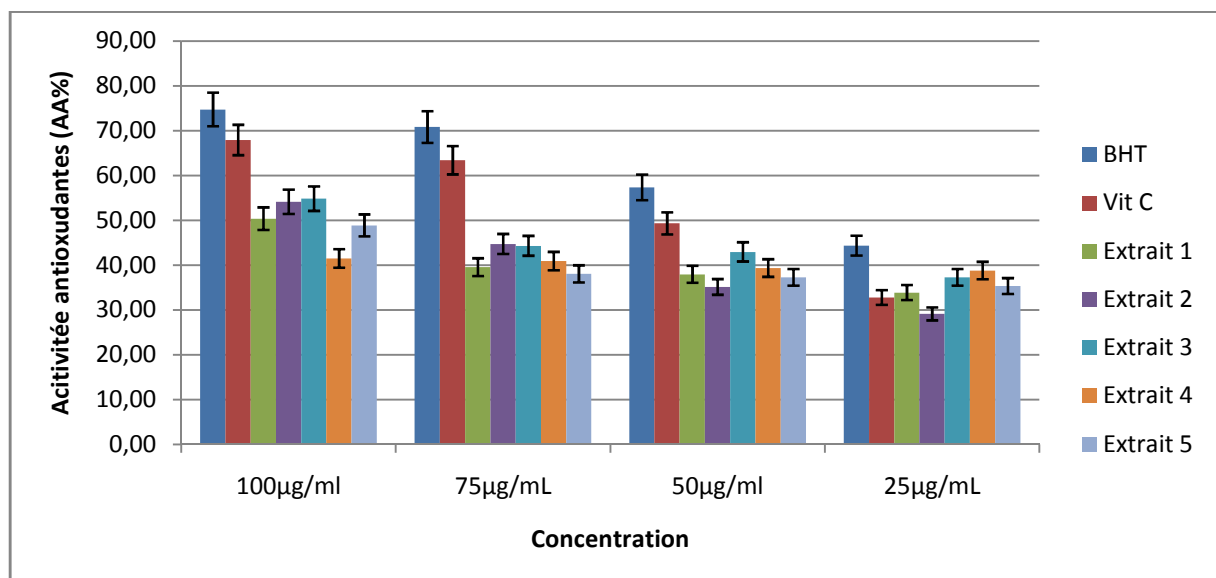
D'après la figure 21, nous avons enregistré des taux de polyphénols totaux pour les 5 extraits dont la valeur élevée est enregistré avec l'extrait 2 ( $1,832 \pm 0,08$  mg AG/g), Extrait 3 ( $1,831 \pm 0,01$  mg AG/g), puis ( $1,685 \pm 0,05$  mg AG/g) et ( $1,635 \pm 0,18$  mg AG/g) pour les extrait 4 et Extrait 5 respectivement, le taux inférieur des polyphénols est enregistré par l'extrait 1 où la valeur est ( $1,406 \pm 0,003$  mg AG/g).

Ces résultats semblent supérieurs à ceux trouvés par Colla et *al.*, (2007) et qui varient entre 2,45 à 4,9  $\mu$ g/g.

### 2.3.8.3. Détermination de l'activité antioxydante

#### 2.3.8.3.1. Détermination de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH

Les résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure 22), révèlent que tous les extraits testés ainsi que le BHT et acides ascorbique pris comme références sont des antioxydants .



**Figure 22 :** Activités antioxydantes des différents extraits de *Spirulina platensis* avec la vitamine C et le BHT selon la méthode de DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits du *Spirulina platensis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.

Le DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est un radical libre organique, toujours utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité antiradicalaire des antioxydants (Oyaizu, 1996 ; Molyneux, 2004).

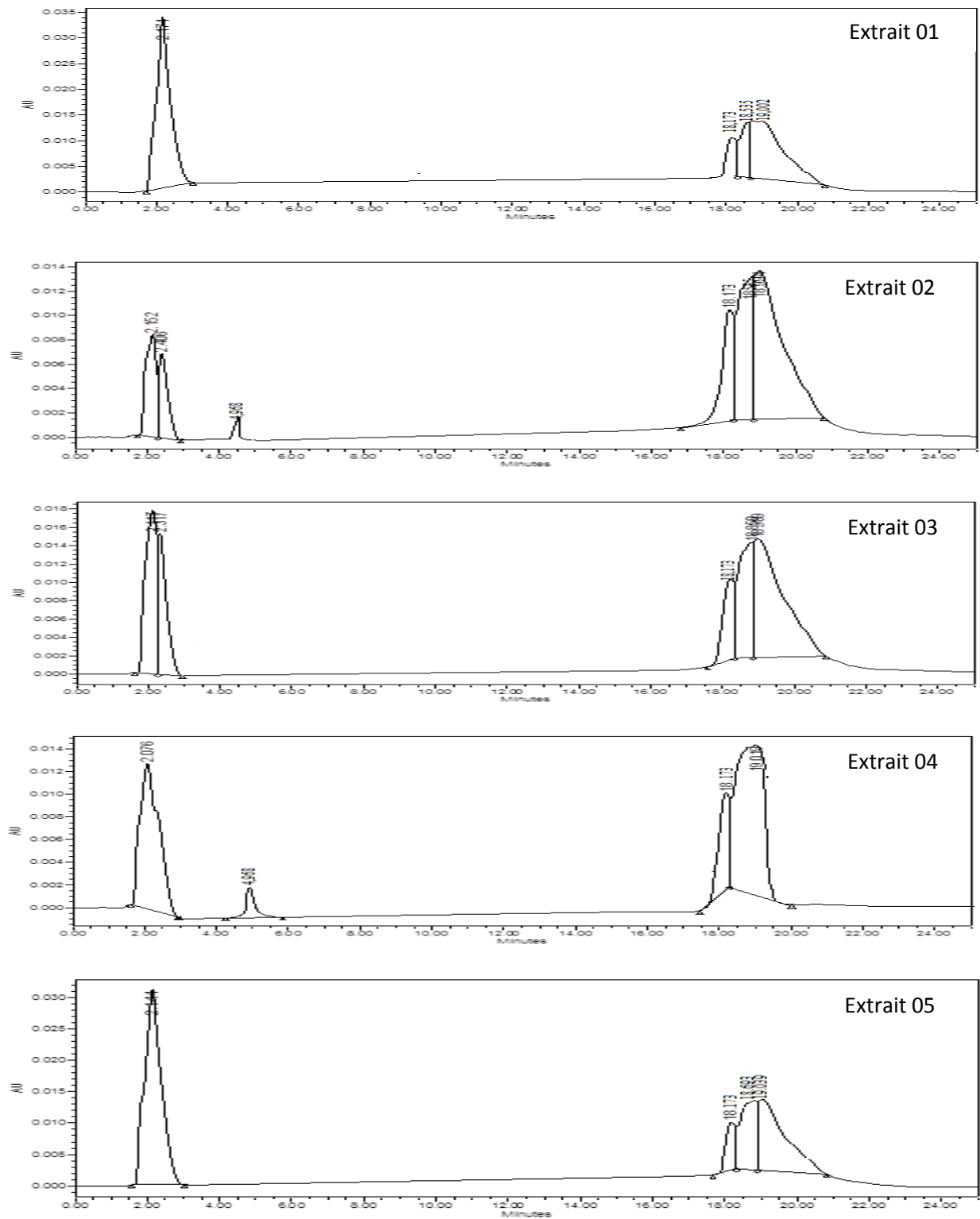
L'activité antioxydante n'est pas liée aux polyphénols seulement mais plutôt aussi à la présence d'une multitude variée d'antioxydants comme le sélénium, le B carotène, et le roi des antioxydants la Vitamine E.

D'après l'étude de Fedkovic et *al.* (1993) les antioxydants comme le  $\beta$ -carotène contenus dans la Spiruline permettraient d'inhiber l'effet mutagène et l'effet régulateur induit par les radicaux libres.

#### **2.3.8.4. Détermination des polyphénols par HPLC**

L'analyse des composés phénoliques se fait par une HPLC à phase inverse avec un fractionnement selon leur degré d'hydrophobicité, les composés les moins hydrophobes seront élués en premier, tandis que les plus hydrophobes en dernier.

L'identification des pics sur le chromatogramme se fait grâce à des échantillons standards e en se basant sur le temps de rétention des molécules analysées.



**Figure 23 :** Profils des polyphénols des extraits à 254 nm

Les chromatogrammes de la figure 23 ont permis de mettre en évidence la présence des composés polyphénoliques dans *Spirulina platensis*.

**Tableau 19:** Détermination des polyphénols pour chaque Extrait de la spiruline

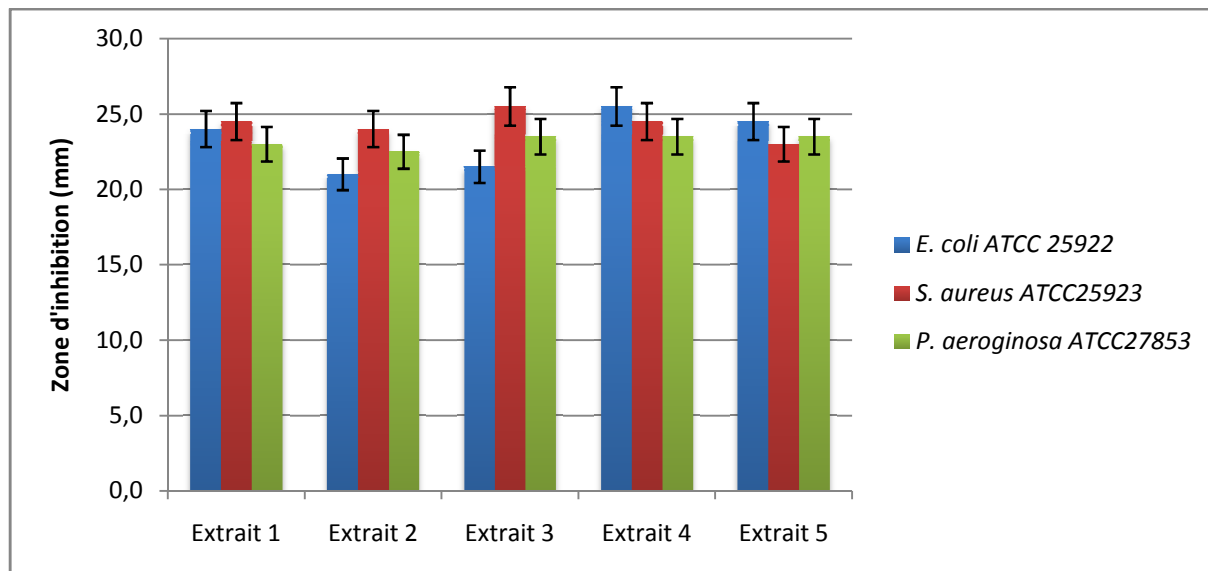
Extrait 1	
Temps de rétention	Polyphénols
2,17	Inconnu
18,173	Pyrogallol
18,535	Rutin
19,002	Acide vanilline
Extrait 2	
Temps de rétention	Polyphénols
2,152	Inconnu
2,406	Inconnu
4,968	Acide gallique
18,173	Pyrogallol
18,535	Rutin
18,994	Quercitine
Extrait 3	
Temps de rétention	Polyphénols
2,117	Inconnu
2,314	Inconnu
18,173	Pyrogallol
18,850	Inconnu
18,999	Quercitine
Extrait 4	
Temps de rétention	Polyphénols
2,076	Inconnu
4,968	Acide gallique
18,173	Pyrogallol
19,019	Acide vanilline
Extrait 5	
Temps de rétention	Polyphénols
2,144	Inconnu
18,173	Pyrogallol
18,963	Quercitine
19,039	Acide vanilline

D'après les résultats obtenus, le profil des extraits phénoliques par HPLC a montré la présence d'acides phénoliques et de quelques composés flavonoïdes comme : Pyrogallol, Acide gallique, Rutin, Quercitine et acide vanilline, avec d'autres produits phénoliques qui sont non identifiés.



### 2.3.8.5. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits

L'activité antimicrobienne des différents extraits de *Spirulina platensis* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne. (Figure 24).



**Figure 24:** Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus par différents extraits de *Spirulina platensis*

Tous les extraits du *Spirulina platensis* se sont révélés actifs avec un degré différent, lié au contenu des extraits aux substances à activité antimicrobienne.

Nous avons observé que l'extrait 1 (Ethanol/eau v/v) a enregistré un diamètre de (24mm) vis-à-vis d'*E.coli* ATCC 25922, (24,5mm) vis-à-vis du *S. aureus* ATCC 25923 et 23mm vis-à-vis du *P. aerogenosa* ATCC 27853.

Nous avons enregistré avec l'extrait 2 des diamètres de (21mm, 24mm 22,5) vis-à-vis de *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, et *P.aerogenosa* ATCC 27853 respectivement, pour l'extrait 3 nous avons enregistré des diamètres inhibiteurs : (21,5mm 25,5mm, 24mm) vis-à-vis du *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aerogenosa* ATCC 27853 respectivement, avec l'extrait 4 nous avons enregistré 25,5 mm vis-à-vis d'*E.coli* ATCC25922, (24,5) mm pour *S. aureus* ATCC 25923 et 23,5 mm pour *P. aerogenosa* ATCC 27853. L'extrait 5 nous avons enregistré (24,5 mm) vis-à-vis d'*E.coli* ATCC 25922, (23 mm) pour *S. aureus* ATCC 25923 et 23,5 mm pour *P. aerogenosa* ATCC 27853.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que toutes les souches microbiennes testées sont inhibées par les extraits utilisées, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de cette algue (Akhtara *et al.*, 2012).

L'extrait 4 du *Spirulina platensis* semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant, parmi les quatre extraits en présentant des zones d'inhibition de croissance avec toutes les souches microbiennes, de même cet extrait montre la plus grande zone d'inhibition, qui est apparue avec *Escherichia coli* une zone d'inhibition = 25,5mm alors que l'extrait 3 a montré un grande d'inhibition part rapport aux autres extrait vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* (25,5mm) et vis-à-vis du *Pseudomonas aerogenosa* (24 mm).

### 2.3.8.5.1. Détermination de la CMI pour chaque Extrait

Tableau 20 : Détermination de la CMI pour chaque Extrait de la spiruline (mm)

	Extrait 1			Extrait 2			Extrait 3			Extrait 4			Extrait 5		
	E.coli	Staph	Pseudo	E.coli	Staph	Pseudo	E.coli	Staph	Pseudo	E.coli	Staph	Pseudo	E.coli	Staph	Pseudo
DIL 1/1	24	24,5	23	21	24	22,5	21,5	25,5	24	25,5	24,5	23,5	24,5	23	23,5
DIL 1/2	22	23	23	19	23	18	19	23	21	20	22	22	22	22	22
DIL 1/4	18	21	22	18	22	17	17	22	20	19	21	21	21	20	21
DIL 1/8	17	20	21	15	21	16	16	19	19	16	20	20	18	17	18
DIL 1/16	16	19	20	14	20	15	14	18	18	14	19	18	16	15	17
DIL 1/32	11	18	21	12	19	14	12	17	16	12	18	17	14	14	15
DIL 1/64	8	16	19	11	15	12	10	16	10	9	16	16	13	12	13
DIL 1/128	-	15	14	10	12	10	9	15	9	8	14	14	12	10	13
DIL 1/256	-	13	12	10	10	10	8	14	-	-	12	12	10	10	12
DIL 1/512	-	10	9	-	8	-	-	10	-	-	9	10	9	9	12
DIL 1/1024	-	8	8	-	-	-	-	7	-	-	8	-	9	-	10
DIL 1/2048	-	7	7	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-

Les résultats obtenus ont montré que chaque extrait une CMI spécifiques vis-à-vis des bactéries pathogènes testées.

La CMI de l'extrait 1 vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 est 312,5 µg/mL , et 19,531 µg/mL vis-à-vis du *S. aureus* ATCC 25923 et 19,531 µg/mL vis-à-vis de *Pseudomonase aerogénosa* ATCC 27853.

La CMI de l'extrait 2 est 39,063 µg/mL vis à vies les trois bactéries pathogènes, Extrait 3 a enregistré une CMI importante de 19,531 µg/mL Vis-à-vis du *S. aureus* ATCC 25923, et une CMI de 78,125 µg/mL vis-à-vis *E.coli* ATCC 25922 et *P. aerogenosa* ATCC 27853.

L'extrait 4 a enregistré une CMI de 19,531 µg/mL vis-à-vis de *P. aerogenosa* ATCC27853 et *S. aureus* ATCC 25923, et une CMI de 156,25 µg/mL vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922.

Les meilleures valeurs de CMI ont été enregistrées par l'extrait 5 où nous avons enregistré une CMI de 9,766 µg/mL vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 et *P. aerogenosa* ATCC 27853 et une CMI de 19,531 µg/mL vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923.

Cette activité antimicrobienne due à la richesse de la spiruline par les pigments et les polyphénols qui ont un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries pathogènes.

### 2.3.9. Analyses microbiologiques de la spiruline

**Tableau 21** : Résultats des analyses microbiologiques de la spiruline

Germes recherchés	Nombres de germes trouvés / g	
	Poudre de spiruline	Tolérances
GAMT à 30°C	1400	5 10 <sup>4</sup>
Coliformes totaux à 30°C	00	1/0,01g
Coliformes fécaux à 44,5°C	00	1/0,01g
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46°C	00	1/0,1g
<i>Staphylococcus aureus</i> à 37°C	00	1
Levures et moisissures à 25°C	00	3 10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i> à 37°C	00	Abs

Les résultats des analyses microbiologiques de la poudre de spiruline ont été interprétés par rapport aux critères microbiologiques des produits déshydratés ou instantanés à

consommer après adjonction de liquide du journal officiel de la république Algérienne n°35 du 25Mai 1998.

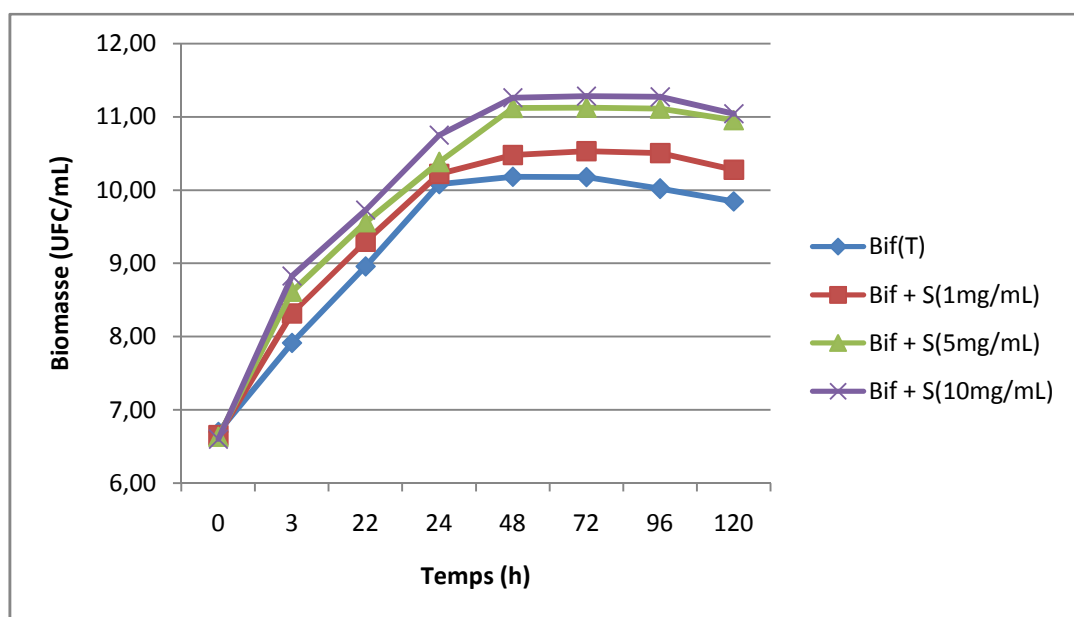
De ce fait, les analyses microbiologiques effectuées sur la poudre de spiruline ont montré qu'elle ne contient pas de *coliformes fécaux et totaux*, ni de *levures et moisissures*, de meme que pour les *staphylococcus aureus* et *salmonella*. Elle ne présente donc aucun danger en raison de sa conformité aux normes établies dans le journal officiel de la république algérienne N° 35. Aussi la présence des GAMT est tolérable selon le journal officiel, les résultats indiquent qu'elle est fabriquée dans de bonnes conditions d'hygiène.

#### 2.4. Effet de la concentration de *Spirulina platensis* sur la croissance des *Bifidobacterium breve*

Les quatre cultures on été réalisées :(cultures témoin cultures mixte associé avec de la spiruline) Nous avons suivi pour chacune d'entre elles la cinétique de croissance de *Bifidobacterium breve* à travers l'évolution de trois paramètres : Biomasse, pH, Acidité.

##### 2.4.1. Evolution de la biomasse de *Bifidobacterium breve* avec les différentes concentrations de *Spirulina platensis*

La figure (25) représente l'évolution de *Bf. breve* dans la culture témoin et les cultures mixtes :



**Figure 25** : Evolution de la biomasse de la souche *Bifidobacterium breve* dans les quatre cultures réalisées

D'après la figure 25, nous avons observé les différentes phases de croissance de *Bf. breve* dans les quatre cultures. la phase de latence semble absente.

En effet la cinétique de croissance des cultures réalisées présente une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire.

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 24h pour la culture seul Bif(T), 48h pour les cultures mixtes *Bf. breve* associé avec *Spirulina platensis* Bif+S(10mg/mL) Bif+S(5mg/mL) et Bif+S(1mg/mL).

La phase de stationnaire dure également 24h pour la culture seul Bif(T), 48h pour les cultures mixte. La phase de déclin est observée après 72h d'incubation pour la culture seul et après 96h pour les cultures associé avec *Spirulina platensis*.

D'après les analyses bactériologiques, nous avons remarqué une augmentation du nombres des biomasse 7,83 à 11,20 UFC/mL après 48h dans la culture Bif+S(10mg/mL); 7,84 à 11,16 UFC/mL pour Bif+S(5mg/mL) et 7,81 à 11,09 UFC/mL pour Bif+S(1mg/mL) et 7,80 à 11 UFC/mL après 24h pour Bif (T).

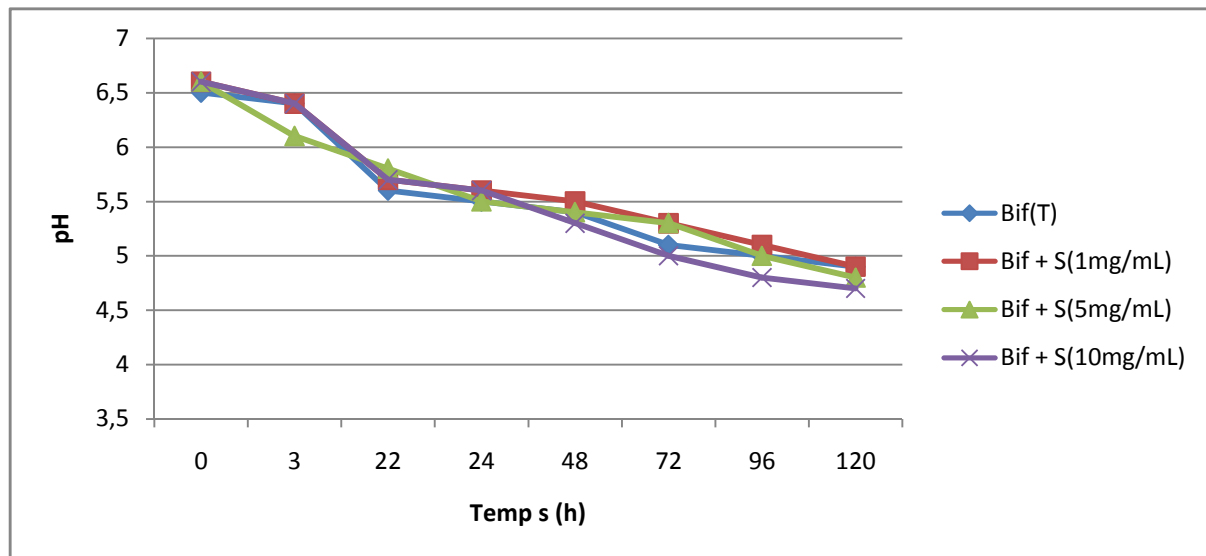
Pour évaluer l'effet de la spiruline sur les trois cultures nous avons estimé les vitesses de croissance pour chaque culture.

Nous avons observé une vitesse de 0,133 UFC/h par la culture témoin, 0,831UFC/h pour la culture Bif+S(1mg/mL) , 0,0691 UFC/h pour la culture Bif+S(5mg/mL) et 0,702 UFC/h pour la culture Bif+S(10mg.mL).

Ces résultats montrent que l'ajout de la spiruline dans les cultures avec différentes concentration a influencé la vitesse de croissance. En parallèle, nous avons remarqué que la durée de la croissances des cultures mixtes a été plus grande que celle de la culture témoin de *Bf. breve*, ceci est probablement due à la richesse du milieu par les facteurs de croissance de la spiruline dans les cultures mixtes utilisées (Husain et *al.*, 1972).

### 2.4.2. Evolution du pH de *Bifidobacterium breve* avec les différentes concentrations de *Spirulina platensis*

La figure 26 représente l'évolution du pH dans la culture témoin et les cultures mixtes



**Figure 26:** Evolution du pH de la souche *Bifidobacterium breve* dans les quatre cultures

Les valeurs du pH indiquent un bon déroulement de la fermentation lactique et donc la croissance des *Bf. breve*.

Le pH initial des cultures est 6,4 le pH est diminué après 12h d'incubation du fait du caractère principale du *Bifidobacterium* qui est la production de l'acide lactique et de l'acide acétique avec un rapport de 3/2. Les principaux dérivés de la fermentation des sucres traduisent l'abaissement du pH.

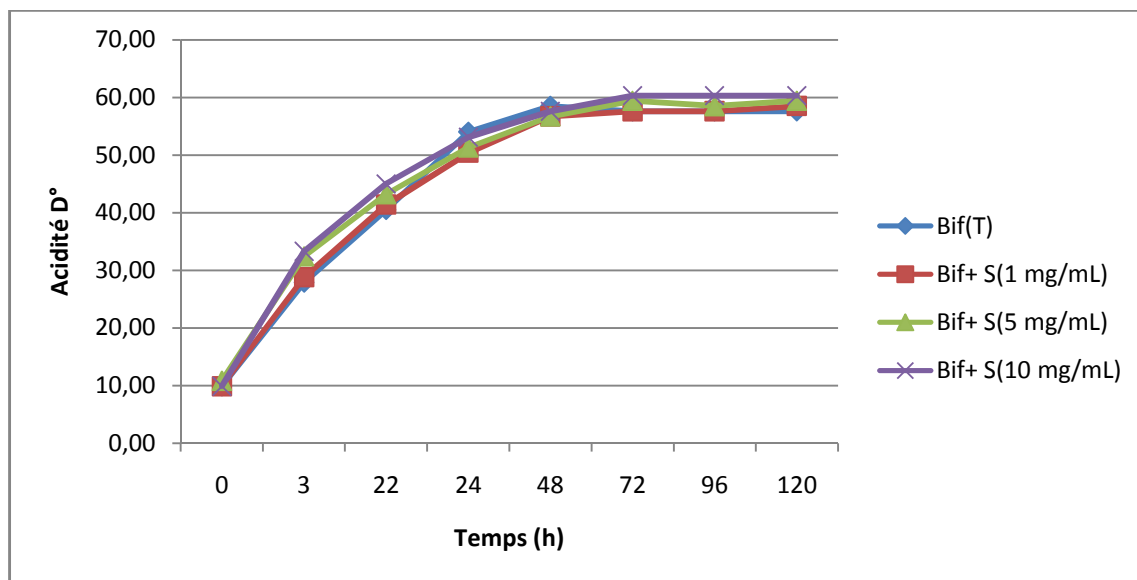
Nous avons remarqué que la diminution du pH est arrivée respectivement à 4,54, 4,51 et 4,42 dans les cultures de Bif+S(10mg/mL), Bif+S(5mg/mL), Bif+S(1mg/mL) alors que dans le lait seul le pH a baissé jusqu'à atteindre la valeur de 4,2 .

Cet abaissement est dû à la production d'acides qui rend le milieu acide.

Le pH des cultures mixte est supérieur à celle de la culture témoin, ceci est dû à l'ajout de la spiruline dont le pH est alcalin.

### 2.4.3. Evolution de l'acidité dornic de *Bifidobacterium breve* avec les différentes concentrations de *Spirulina platensis*

La figure 27 représente l'évolution de la production d'acide lactique dans quatre cultures (culture témoin et culture mixtes) :



**Figure 27:** Evolution d'acidité en degré dornic de la souche *Bifidobacterium breve* dans les quatre cultures

La diminution du pH est due à la production d'acide lactique et l'acide acétique dont nous avons enregistré une production de 60,30 °D pour la culture Bif+S(10mg/mL), 59,40 °D pour Bif+S(5mg/mL), 58,50°D Bif+S(1mg/mL) et 57,60 °D pour Bif(T).

L'acidification du milieu de culture se fait par la fermentation du lactose en acides acétique et lactique avec un rapport moléculaire 3/2 (Doumandji, 2007).

Les hexoses sont dégradés par une voie métabolique particulière, la voie du fructose-6-phosphate «bifid shunt».

La fermentation de deux moles de glucose produit approximativement trois moles d'acide acétique, deux moles d' et 2,5 moles d'ATP (Ventura et al., 2004).

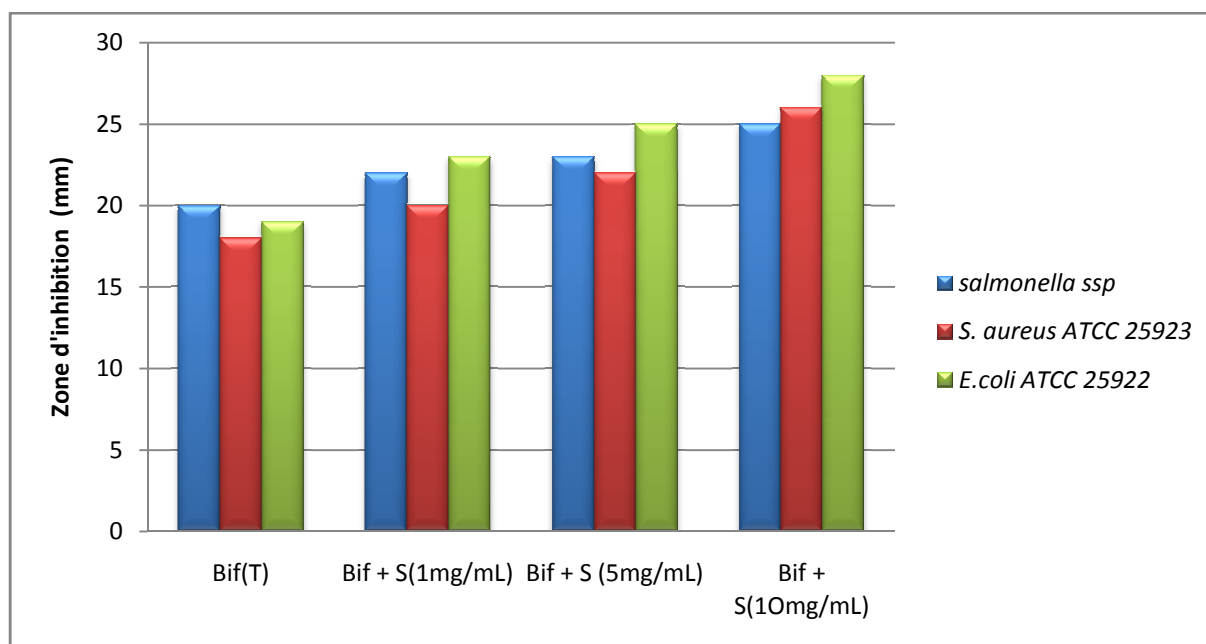
La voie métabolique du fructose-6-phosphate phosphocétolase produit de l'acide lactique et de l'acide acétique comme métabolites primaires avec un apport de 2/3 (De-Vries et al., 1967 ; Pavan et al., 2003).

Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide lactique. Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par la suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (De-Vries et Stouthamer, 1968; Lauer et Kandler, 1976).

L'ajout de la spiruline a influencé sur la production d'acide (Dola *et al.*, 2009), nous avons remarqué qu'une acidité dornic dans les cultures mixtes supérieur à celle de la culture témoin, ceci est du à la richesse des milieux en éléments nutritifs de la spiruline qui permet de produire les acides dans le milieu en favorisant l'abaissement du pH.

#### 2.4.4. Détermination de l'effet antimicrobien de *Bifidobacterium breve* avec les différentes concentrations de *Spirulina platensis*

Après le suivi de la croissance de *Bifidobacterium breve* dans les différentes cultures. Nous avons étudié l'effet antimicrobien sur trois (03) bactéries pathogène : *Salmonella ssp.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figure 28)



**Figure 28:** Effet inhibiteur des cultures vis-à-vis de *Salmonella ssp.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922

Les résultats concernant les tests de l'antagonisme révèlent l'inhibition de *Salmonella ssp.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 par les quatre cultures.



Nous avons enregistré des diamètres d'inhibition des quatre cultures vis-à-vis des bactéries pathogènes utilisées.

En effet, les diamètres d'inhibitions enregistrées sont pour la cultures Bif+S(10 mg/mL) Vis-à-vis du *S. ssp.* ( $Z_i = 25\text{mm}$ ), *S. aureus* ATCC25923 ( $Z_i = 26\text{mm}$ ) et *E. coli* ATCC 25922 ( $Z_i = 28\text{mm}$ ).

Pour la culture Bif+S(5 mg/mL) nous avons enregistré des diamètres inhibiteurs Vis-à-vis du *S. ssp.* ( $Z_i = 23\text{mm}$ ), *S. aureus* ATCC 25923 ( $Z_i = 22\text{mm}$ ) et *E. coli* ATCC 25922 ( $Z_i = 25\text{mm}$ ).

Pour la culture Bif+S(1 mg/mL) des diamètres inhibitions Vis-à-vis du *S. ssp.* ( $Z_i = 22\text{mm}$ ), *S. aureus* ATCC 25923 ( $Z_i = 20\text{mm}$ ), et *E. coli* ATCC 25922 ( $Z_i = 23\text{mm}$ ) ont été notés.

En parallèle Les diamètres d'inhibition mesuré dans la culture témoin de *Bf. breve* Bif(T) sont: Vis-à-vis de *S. ssp.* ( $Z_i = 20\text{mm}$ ), de *S. aureus* ATCC25923 ( $Z_i = 18\text{mm}$ ) et de *E. coli* ATCC 25922 ( $Z_i = 19\text{mm}$ ).

Les Bifidobacteries, ont un rôle fondamental dans l'inhibition des flores non lactiques, dont certaines sont préjudiciables à la qualité des produits alimentaires. Cette action est due à l'abaissement du pH (qui inhibe la croissance de la plupart des germes non lactiques), à la toxicité des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et du diacétyle, mais aussi à la sécrétion de bactériocines (composés bactéricides) et des substances antifongiques (Desmazeaud, 1998), ces substances ont été caractérisées par d'autres chercheurs comme étant des molécules de nature protéiques (Delvis-Broughton, 1990; Yildirim et Johnson, 1998).

*Bifidobacterium breve* peut naturellement produire plus qu'un bactériocine. Des résultats similaires ont été trouvés par Zinedine et Faïd (2007) qui confirment l'effet antimicrobien sur *Salmonella ssp.* et *Staphylococcus aureus*,

L'ajout de la spiruline a influencé sur l'effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries pathogènes utilisées. la spiruline a une activité antimicrobienne dus aux différents pigments (phycocyanine, Xanthophylle, caroténoïdes et la chlorophylle) sur *Staphylococcus aureus* ( $Z_i = 14\text{mm}$ ) *Salmonella typhi* ( $Z_i = 7\text{mm}$ ) (Rahal, 2005).

### **2.5. Essai *In vivo* sur l'effet antioxydant de *Spirulina platensis* en association avec *bifidobacterium breve* sur le diabète**

Quarante huit heures après l'injection de 120 mg/kg de l'alloxane aux rats, les observations suivantes ont été faites: Polyurie importante, Polydipsie et Polyphagie.

La mesure de la glycémie a montre un taux de glucose sanguin supérieur à 2 mg/L chez tous les rats ayant reçu une injection d'alloxane (Calop et *al.*, 2008).

Disque le diabète s'est installé chez les animaux considérés, nous avons introduit le régime approprié pour les différents lots.

Le 1<sup>er</sup> essai du traitement effectué a été fait pour déterminer la concentration optimale qui donnerait un bon résultat sur la diminution de la glycémie des rats .

#### **2.5.1. Dosage de la glycémie**

Les rats ont été traités par injection sous-cutané de monohydrate d'alloxane avec une dose de 120mg/kg du Poids Corporelle en solution dans du sérum physiologique. Ce dernier entraine la destruction des cellules  $\beta$  pancréatique, responsable d'une hyperglycémie permanente dans les jours qui suivant l'administration (Diatewa et *al.*, 2004).

Quarante huit heures après administration de l'alloxane, la glycémie des rates a été mesurée à l'aide d'un glucomètre On-Call-Plus ACON.

Selon Diatewa et *al.* (2004), les rats dont le glucose sanguin serait à hauteur de 2g/L sont considérés diabétiques.

**Tableau 22** : Effet de différentes doses de *Spirulina platensis* et *Bifidobacterium breve* sur les niveaux de glucose (g/L) chez les rats diabétiques.

	t0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
GI	1,19±0,03	1,22±0,03	1,36±0,02	1,27±0,03	1,09±0,02	1,16±0,04	1,20±0,02	1,23±0,03
GII	2,32±0,02	2,23±0,02	2,76±0,05	2,68±0,08	3,01±0,08	2,88±0,12	3,21±0,04	2,99±0,11
GIIIa	2,09±0,03	1,82±0,02	1,79±0,05	1,70±0,02	1,70±0,02	1,66±0,03	1,50±0,06	1,49±0,03
GIIIb	2,22±0,02	2,10±0,02	1,95±0,04	1,71±0,02	1,49±0,02	1,32±0,02	1,26±0,03	1,18±0,02
GIIIc	2,20±0,04	2,01±0,02	1,54±0,02	1,42±0,02	1,32±0,03	1,22±0,03	1,19±0,03	1,15±0,02
GIII d	2,23±0,03	1,80±0,08	1,36±0,03	1,26±0,04	1,18±0,01	1,16±0,03	1,11±0,03	1,02±0,04
GIIIe	2,21±0,01	2,14±0,03	1,96±0,03	1,86±0,03	1,66±0,03	1,46±0,05	1,38±0,02	1,21±0,02
GIII f	2,23±0,04	2,09±0,02	1,86±0,03	1,70±0,05	1,58±0,04	1,25±0,04	1,23±0,04	1,18±0,02
GIII g	2,19±0,03	1,80±0,05	1,55±0,03	1,44±0,05	1,33±0,04	1,20±0,03	1,15±0,04	1,10±0,03

GI-group témoin, GII- group diabétique, GIIIa : des rats diabétique traités par *Bf. breve* ; GIIIb : des rats diabétique traités par *Bf. breve avec* 1mg/mL de *S. platensis*; GIIIc: des rats diabétique traités par *Bf. breve avec* 5mg/mL de *S. platensis* ; GIIId : des rats diabétique traités par *B. breve* 10mg/mL de *S. platensis* ;GIIIe: des rats diabétique traités par 1mg/mL de *S. platensis*; GIIIf: des rat diabétique traités par 5mg/mL de *S. platensis*; GIIIg: des rats diabétique traités par 10mg/mL de *S. platensis*.

Les réponses de glucose sanguin après la prise des différents traitements chez les rats diabétiques alloxane - induite sont présentées dans le tableau 22.

Les rats diabétiques (GII) présentaient des niveaux significativement plus élevés de glucose par rapport aux témoins (GI) ( $p < 0,001$ ).

Les groupes des rats (GIIIe et GIIIf) ont diminué les niveaux de glucose par rapport à GII du 2<sup>ème</sup> jours et le groupe des rat (GIIIg) a diminué le niveau de glucose diminué par rapport à GII du 1<sup>er</sup> jour. Les résultats semble être très significatifs  $p < 0,001$ .

Ainsi, l'ajout de la spiruline a donné des résultats différents en fonction de la concentration et le meilleur effet a été enregistré dans le groupe GIIIg (10 mg/mL de spiruline)  $p < 0,001$  par rapport au GII.

*Bf. breve* (GIIIa) a diminué de façon significative les niveaux de glucose à tous les points considérés par rapport à GII ( $p < 0,001$ ). Cependant au bout de 6 jours nous notons que les niveaux de glucose ne sont pas différents par rapport aux témoins (GI).

La spiruline est une source importante de composés naturels pour l'alimentation humaine, elle est caractérisée par une haute qualité nutritionnelle (Simpore et al., 2006; Azabji-Kenfack et al., 2011) et pourrait avoir un effet protecteur contre le diabète (Narmadha et al., 2012).

Dans une étude réalisée par Joventino et al. (2012), le traitement avec la spiruline (25, 50 ou 100 mg/kg par poids corporel), a commencé 48 heures après l'injection d'alloxane et pendant 5 à 10 jours, une diminution de la glycémie a été observée après un traitement de 5 jours.

Dans notre étude, les doses de la spiruline ont diminué les niveaux de glucose après 6, 5 et 2 jours pour la dose 1 mg/mL, 5 mg/mL et 10 mg/mL, respectivement.

Aussi nos résultats montrent que *Bf. breve* a diminué les niveaux du glucose des rat diabétiques. Nos résultats sont similaires à celle de Yu et al., (2013). qui annonçaient que *Bf. breve* diminuait les taux sériques de glucose chez les rats obèses induits par l'alimentation riche en graisses

Nous avons également pu observer un effet synergique de *Bf. breve* et de *S. platensis*. Ce dernier est plus évident avec la dose de 5 mg/mL de spiruline.

Nos résultats suggèrent que l'association de *Bifidobacterium breve* –*Spirulina platensis* pourrait être un aliment fonctionnel prometteur pour les patients diabétiques.

L'interaction entre les nutriments est bien connue (Peluso et al., 2014). Dans ce contexte, il a été rapporté que la spiruline favorise la croissance *in vitro* des probiotiques (Parada et al., 1998; Varga et al., 2002 ; Rasmussen et al., 2009 ).

**2.5.2. Effet du lait infantile 1<sup>er</sup> âge (GUIGOZ I) enrichi par *Spirulina platensis* et *Bifidobacterium breve***

Le dosage de quelques paramètres sanguins à la fin de l'expérimentation a révélé les résultats suivants :

**2.5.2.1. Evolution de la glycémie chez les rats diabétiques et témoins**

L'évolution de la glycémie chez les rats diabétiques et non diabétiques durant l'expérimentation est représentée en tant que la moyenne des valeurs des différents lots pour chaque semaine exprimées en (g/L) dans le tableau 23

**Tableau 23** : L'évolution de la glycémie chez les rats étudiés (g/L)

	D1	D4	D7	D10	D13
Lot T	0,97±0,02	1,01±0,02	0,98±0,03	0,87±0,03	0,95±0,03
Lot DT	3,01±0,02	3,15±0,02	3,21±0,02	3,51±0,05	3,23±0,01
Lot Dtm	2,84±0,04	1,38±0,02	1,20±0,03	1,13±0,02	1,11±0,06
Lot DBf	2,18±0,02	1,50±0,04	1,41±0,03	1,22±0,07	1,19±0,04
Lot DS10	2,25±0,02	1,31±0,05	1,24±0,02	1,16±0,04	1,13±0,03
LotDBf+S10	2,26±0,03	1,21±0,06	1,11±0,08	1,09±0,02	1,04±0,08

Lot T: Lot témoin; Lot TD: Rats témoin diabétique,; Lot Dtm: Rats témoin diabétique, traités par glibenclamide (100mg/kg); Lot DBf: Rat diabétiques traités par lait infantil inoculé par *Bf. breve* (per os 10 jours); Lot DS10: Rats diabétiques traité pat lait infantil enrichi par la spiruline à une concentration de 10 mg/ml (per os 10 jours); Lot DBf+S10: Rat diabétiques traités par lait infantil inoculé par *Bf. breve* et enrichi par la spiruline à une concentration de 10mg/ml (per os 10 jours).

L'administration de *Bf. breve* et *S platensis* (Lot DBf ; Lot DS10 et Lot DBf+S10) et le glibenclamide (Lot DTM) a permis la diminution de façon significative des niveaux de glucose chez les rats diabétiques induits par alloxane (p<0,001) par rapport au Lot témoin diabétique Lot DT.

Plusieurs études ont été réalisées pour expliquer l'effet hypoglycémiant de *S. platensis*. Une théorie attribue cet effet à la teneur en fibres de *Spirulina platensis*, qui permettrait à une absorption réduite du glucose (Mani et al., 1996 ; Henrikson et al., 1997).

**2.5.2.2. Dosage des paramètres biochimiques chez les rats diabétiques et témoins**

Les paramètres biochimiques ont été dosés après le sacrifice des rats de différents lots. Le tableau 24 montre les différents résultats obtenus :

**Tableau 24** : Les résultats des paramètres biochimiques chez les rats diabétiques et témoins

	Proteins g/L	Creatinine mg/mL	TG mg/dL	TC mg/dL	LDL-C mg/dL	HDL-C mg/dL
Lot T	82,03±0,18	0,54±0,04	63,10±0,06	80,13±0,12	26,60±0,39	45,23±0,11
Lot DT	75,92±0,11	0,92±0,06	192,40±1,53	112,05±0,43	91,53±0,19	22,34±0,21
Lot Dtm	79,87±0,21	0,88±0,03	89,12±0,10	89,22±0,12	27,30±0,06	48,13±0,15
Lot DBf	80,30±0,61	0,78±0,03	92,11±0,12	85,10±0,07	31,21±0,16	49,43±0,36
Lot S10	80,50±0,17	0,76±0,02	84,05±0,05	77,20±0,17	30,12±0,11	47,43±0,07
Lot DBf+S10	81,65±0,13	0,75±0,04	82,09±0,05	79,13±0,14	29,10±0,10	46,02±0,17

TG: triglycérides; TC: cholestérol totale ; LDL-C: lipoprotéines de petite densité; HDL-C: lipoprotéines de haute densité; Lot T: Lot témoin; Lot TD: Rats diabétiques; Lot Dtm: Rats diabétiques traités par glibenclamide (100mg/kg); Lot DBf: Rats diabétiques traités par lait infantile inoculé par *Bf. breve*; Lot DS10: Rats diabétiques traités par lait infantile enrichi avec 10 mg/mL de spiruline; Lot DBf+S10: Rats diabétiques traités par lait infantile inoculé par *Bf. breve* et enrichi par 10 mg/mL de spiruline. Les valeurs sont exprimées : significative  $p < 0,05$  ; hautement significative  $p < 0,01$  ; très hautement significative  $p < 0,001$ .

Les protéines et les niveaux de créatinine ont diminué pour les rats diabétiques témoins (Lot DT) en comparaison avec les rats normaux (Lot T)  $p < 0,001$

Les résultats obtenus avec *S. platensis* (Lot DS10) démentent un impact sur les protéines et la créatinine (tableau 24). Ils sont significatifs par rapport au témoin Lot T  $p < 0,01$  ;  $p < 0,001$  respectivement, de même pour que *Bf. breve* (Lot DBf), les résultats sont très significatif  $p < 0,001$  ;  $p < 0,01$  par rapport au lot T.

En outre, nous notons que le profil lipidique a été amélioré de manière différentielle par les traitements utilisés.

Les Rats diabétiques (Lot DT) ont présentés un faible taux de HDL- C et un taux élevé TG, TC et de LDL- C par rapport aux rats normaux (Lot T). Les résultats semblent significatifs par rapport au lot témoin diabétiques  $p < 0,001$ .

L'administration de la glibenclamide diminué LDL et augmenté l'HDL.

L'administration de la *S. platensis* avec *Bf. breve* (Lot DBf+ S10) a amélioré de façon significative tous les paramètres lipidiques (TG, TC, LDL -C et de C-HDL)  $p < 0,001$  par rapport au lot DT.

Les résultats de notre étude ont montré que, *S. platensis*, seul ou en combinaison avec *Bf. breve* permet de diminuer la moyenne du taux de cholestérol total sérique, les triglycérides, le LDL-C et augmenté la moyenne de sérum de HDL par rapport au groupe diabétique témoin (Lot DT)  $p < 0,001$ .

Des études récentes portant sur des sujets infectés par le VIH, ont montré qu'il y a une augmentation significative du taux de cholestérol HDL et une diminution significative du cholestérol total, de LDL- cholestérol et de triglycérides chez le groupe de patients ayant consommé la spiruline (Ngo-Matip et al., 2014).

D'autre part, l'analyse phytochimique de *S. platensis* a confirmé la présence de constituants qui sont connus par leur activité médicinale.

La détection de flavonoïdes dans l'extrait peut être liée à la propriété de réduction de la glycémie. Les flavonoïdes inhibent l'activité 6 - phosphatase glucose dans le foie et réduit par conséquent l'hyperglycémie (Chen et al., 1998b ; Julies et Christin, 2002).

*S. platensis* est riche en minéraux ( $6,88 \pm 0,05$  %). et est l'une des meilleures sources naturelles de sélénium et de magnésium selon Fox (1999). Ce dernier possède des propriétés antioxydantes, et une fonction de protection cellulaire lorsque les niveaux de glucose dans le sang sont élevés. Ainsi, des niveaux élevés de sélénium dans le corps peuvent prévenir le diabète (Anderson et al., 2002).

Le magnésium est l'un des principaux minéraux impliqués dans le métabolisme des glucides et des matières grasses (Rajasekaran et al., 2005). Zinc module état diabétique soit en agissant comme un cofacteur de l'insuline ou un composant de l'enzyme cytosolique dismutase superoxyde (Coulston et Dandona, 1998).

## Conclusion

Notre étude a porté sur l'évaluation de la valeur alimentaire et l'effet antidiabétique d'une cyanobactérie *Spirulina platensis* provenant du sud Algérien (région de Tamanrasset au niveau de la Guelta du Palmier situé à 1824 m d'altitude), associée ou non à un probiotique.

Pour cela, vingt souches d'espèce différentes de *Bifidobacterium* ont été isolées à partir de nouveau-nés de 1 -6 mois allaités au lait maternel exclusivement puis identifiées par les tests biochimiques et leurs fermentations des sucres.

Une confirmation du genre *Bifidobacterium* a été réalisée en nous basant sur la méthode de Biavati et al., 1992 et Mitsuoka 1969..

Pour ce qui est de la sélection de la souche étudiée de *Bifidobacterium*, nous l'avons effectué selon leur vitesse d'acidification et leur effet inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922.

Les meilleurs résultats ont été enregistrés par la souche *Bf8* ( $\Delta\text{pH}= 2,23$  ;  $\Delta\text{V}=0,53$  mU pH/min ;  $Z_i= 24\text{mm}$ ), *Bf1* ( $\Delta\text{pH}=2,2$  ;  $\Delta\text{V}= 0,52$  et  $Z_i= 23\text{mm}$ ), dont les deux espèces sont *Bifidobacterium breve* selon l'identification Biavati et al., (1992) et Mitsuoka (1969).

Pour ce qui est de *Spirulina platensis*, des essais de culture ont été réalisés dans un milieu contenant les facteurs qui favorisent sa croissance. Cette dernière a été estimée par la mesure pH, du poids sec, de la phycocyanine et de la biomasse (Doumandji et al., 2012).

Aussi, l'évaluation de la valeur alimentaire de *Spirulina platensis* nous a permis de connaître ses différents constituants microbiologiques et physico- chimiques présents.

En effet, la poudre de spiruline considérée présente une teneur initiale en eau de 8% qui lui conféré une certaine stabilité microbiologique. D'autres constituants ont été mis en évidence tel que les glucides 17,63%, les lipides 7,28%, les minéraux 6,88 % et les protéines 60,32 % qui en font un aliment fonctionnel intéressant.

Des analyses chimiques supplémentaires ont été réalisées sur *S. platensis* où nous avons identifié le profil des acides gras dans sa fraction lipidique par la chromatographie en phase gazeuse. Nous avons également identifié les éléments minéraux (Fe, Zn, Ca, K, Na) par spectrométrie d'absorption atomique.



Les résultats obtenus par CPG ont montré que notre souche algale renferme une forte concentration en acides gras essentiels qui inclue des oméga-3 et des oméga-6 qualifiés d'essentiels pour l'organisme humain.

La micro algue *Spirulina platensis* présente des valeurs relativement élevées en éléments essentiels pour l'organisme : 27 mg/g pour le sodium et 20 mg/g de matière sèche pour le potassium.

Différentes extractions sur *S. platensis* ont été réalisées par des solvants afin d'étudier l'activité antioxydante des composés phénoliques contenus dans cette souche algale. L'analyse s'est faite par chromatographie liquide de haute performance.

L'extraction des polyphénols a montré une richesse de la spiruline en polyphénols totaux. Les composés phénoliques s'avèrent avoir un pouvoir antiradicalaire important comparé à la vitamine C et le BHT.

L'activité antimicrobienne des extraits de *S. platensis* a été réalisée avec quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* ssp.) et les résultats ont permis de confirmer le pouvoir antibactérien des composés phénoliques de la micro-algue.

Notre étude a porté sur l'effet de la concentration de *S. platensis* sur la croissance de *Bf. breve*. Nous avons opté pour l'étude de trois (03) concentrations de spiruline (1mg/ml, 5mg/ml et 10mg/ml) (Bhowmik et al., 2009) et nous avons suivi l'évolution de la biomasse, pH, l'acidité dornic et l'effet antimicrobien.

Nous avons observé une vitesse de 0,133 UFC/h par la culture témoin, 0,831UFC/h pour la culture Bif+S (1mg/ml), 0,0691 UFC/h pour la culture Bif+S(5mg/ml) et 0,702 UFC/h pour la culture Bif+S(10mg.ml). Les résultats font ressortir que l'ajout de la spiruline dans les cultures avec différentes concentration influence la vitesse de croissance. Ceci est probablement due à la richesse du milieu par les facteurs de croissance de la spiruline dans les cultures mixtes utilisées (Husain et al., 1972).

Une étude *in Vivo* a été réalisée pour nous permettre d'étudier les effets suivant:

- L'effet de la souche *Bf. breve* sur le diabète alloxanique provoqué chez le rat ;

- L'effet de la concentration de *S. platensis* sur le diabète alloxanique provoqué chez le rat ;
- L'effet de l'association *S. platensis* avec *B. breve* sur le diabète alloxanique provoqué chez le rat.

Les résultats obtenus ont montré que le groupe traité par *Bf. breve* avec 10mg/ml de *S. platensis* (Lot DBf+S10) a diminué de façon significative les niveaux de glucose chez les rats diabétiques induit par alloxane par rapport aux autres groupes de traitement. L'effet synergique est semblable - il est plus évident avec la dose de 5 mg/ml de spiruline.

Nos résultats ont montré que *S. platensis*, seul ou en combinaison avec *Bf. breve* a diminué la moyenne du taux de cholestérol total sérique, les triglycérides, le LDL et augmenté la moyenne de sérum de HDL- C par rapport à les groupes de contrôle.

Enfin, en terme de perspectives et de recommandations, nous considérons qu'il serait intéressant et même judicieux de considérer que *Bifidobacterium* et *Spirulina platensis* puissent être utilisés comme compléments alimentaires.

Notre travail a engendré plusieurs investigations qui pourraient être poursuivies, entre autre :

- Etude de l'effet hypocholestérolémiant de *S. platensis* en association avec d'autres espèces de bifidobactérie ;
- Caractérisations génétique de la souche algale autochtone ;
- Caractérisation de la fraction protéique par une électrophorèse en SDS-PAGE ;
- Identification génétique des souches étudiées de *Bifidobacterium* ;
- Etude des mécanismes de synergie entre *spirulina* et *Bifidobacterium*.

## Les références bibliographiques

- Abbott A. (2004). "Microbiology: gut reaction". *Nature*. 427: 284-286.
- Abriouel H., Herrmann A., Starke J., Yousif N.M., Wijaya, A., Tauscher, B. (2004). "Cloning and heterologous expression of hematin-dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228". *Appl Environ Microbiol.*, 70: 603-606.
- Akhtara N., Ahmeda M.M., Sarkerb N, Mahbub K.R., Sarkera A.M. (2012). "Growth response of *Spirulina platensis* in papaya skin extract and antimicrobial activities of *Spirulina* extracts in different culture media". *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 47, 2: 147-152.
- Akkus I., Kalak S., Vural H., Caglayan O., Meneke E., Can G., Durmus B. (1996). "Leukocyte lipid peroxidation, su-peroxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus". *Clin Chim Acta.*, 244: 221-227.
- Alp B. (2009). "Relationship between the resistance to bile salts and low Ph with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk". *Anaerobe*, 16, 2: 101-105
- Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 78: 6858-6862.
- Amzal H., Alaoui K., Tok S., Errachidi A., Charof R., Cherrah Y., Benjouad A. (2008) . "Protective effect of saponins from *Argania spinosa* against free radical-induced oxidative haemolysis". *Fitoterapia.* , 79, 5: 337-44
- Anbarasan V., Kishor Kumar V., Satheesh Kumar P., Venkatachalam, T. (2011). "In vitro evaluation of antioxidant activity of blue green algae *Spirulina platensis*". *International Journal of Pharmacological Science Research*, 2, 10: 2616-2618.
- Anderson J.W., Gowri M.S, Turner J., Nichols L., Diwadkar V.A., Chow C.K., Oeltgen P.R. (1999). "Antioxidant supplementation effects on low-density lipoprotein oxidation for individuals with type 2 diabetes mellitus". *J Am Coll Nutr*, 18: 451 - 461.
- Anderson R.A., Cheng N., Bryden N.A., Polansky M.M. (2002). "Beneficial effects of chromium for people with diabetes mellitus", *Diabetes*, 1786-1791.
- André J.M., Catala M., Poirier J. (2002). "L'appareil digestif". <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/histop2.pdf>. consulté le 20/02/2013.

- Arboleya S., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Solis G., Salminen S. (2010). “Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* Strains isolated from breast-milk”. *Int J Food Microbiol*, 149:28–36.
- Archibald F.S., Fridovich I. (1981). “Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria”. *J Bacteriol*, 146 : 928-936.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), (1990). “Officinal methods of analysis chemists”. 15th, 2 AOAC Arlington, Virginia. USA.
- Auzias D., Labourdette J-P. (2009). “Le Petit Futé République centrafricaine”. 2eme édition. 15p. Paris.
- Azabji-Kenfack M., Dikosso S-E., Loni E-G., Onana E-A., Sobngwi E., Gbaguidi E., Ngouni Kana A-L., Nguéfack-Tsague G., Von der Weid D., Njoya O., Ngogang J. (2011). “Potential of *Spirulina Platensis* as a Nutritional Supplement in Malnourished HIV-Infected Adults in Sub-Saharan Africa: A Randomised, Single-Blind Study”. *Nutr Metab Insights.*, 4: 29-37.
- Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjema B., Henni D.E., Tornadijo M.E. Kihal M. (2004). “Identification of cultivable of lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat’s milk and evaluation of their technological properties”. *Food Microbiol*, 3: 72-78.
- Balasundram, N., Agar N.S., Sundram K., Samman S. (2004). “Palm fruit extracts protect against oxidative damage in human red blood cells”. *Asia Pac.J.Clin.Nutr.*, 13, S75.
- Ballongue J. (1993). “*Bifidobacteria* and probiotic action. In: Lactic Acid Bacteria (Salminen, A. & Von Wreight, A., eds.), 428p. Marcel Dekker, New York, NY.
- Batello C., Marzot M., Tour H. (2006). “Le futur est un ancien lac: savoirs traditionnels, biodiversité et ressources génétiques pour l’agriculture et l’alimentation dans les écosystèmes du bassin du lac Tchad”. Edition Food & Agriculture, 280 p. Italie.
- Beerens H., Romond C., Neut C. (1980). “Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine”. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33: 2434-2439.
- Belen A.F., Lopez-Diaz M.C., Alvarez-Martin P., Mayo B. (2006). “Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pate persillée fromage de cabrales : identification des dominantes des bactéries lactiques”. *Eur.Res. Technol. Aliment.*, 223 : 503-508.
- Benahmed Djilali A., Saidi N., Mekssoud A., Benamara S. (2013). “Pharmacological and biological proprieties of a mixture of date of powders (Mech-Degla and *Spirulina*)”. *The Macrotheme Review*. 2, 1: 117-128.

- Bencheqroun H.K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A. Chanouch A. (2012). “Activité antimicrobienne des huiles essentielles d’*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc”. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 81 : 4 – 21
- Benedetti S., Benvenuti F., Pagliarani S., Francogli S., Scoglio S., Canestrari F. (2004). “Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*”. *Life Sci*, 75: 2353-2362.
- Bergendi L., Benes L., Durackova Z., and Ferencik M. (1999). “Chemistry Physiology and Pathology of free Radicals”. *Life Sci*, 65:1865-1874.
- Bergonzelli G.E., Blum S., Brussow H., Corthesy-Theulaz I. (2005). “Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases?”. *Digestion*, 72: 57-68.
- Bermejo R., Talavera E.-M., Alvarez-Pez J.-M., Orte J.-C. (1997). “Chromatographic purification of phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. High-performance liquid chromatographic separation of their alfa and beta subunits”. *J. Chromatogr. A.*, 778: 441-50.
- Bezkorovainy A., Miller-Catchpole R., (1989). “Biochemistry and physiology of *bifidobacteria*”. *Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.* 226p. USA.
- Biavati B., Mattarelli P. (1991). “*Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle”. *Int J Syst Bacteriol.*, 41, 1: 163-8.
- Biavati B., Mattarelli P., Crociani F. (1992). “Identification of *bifidobacteria* from fermented milk product”. *Microbiologica.*, 15, 1: 7-13.
- Biavati B., Scardovi V., Moore W.E.C. (1982). “Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species”. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 368-373.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. (2000). “*Bifidobacteria* : history, ecology, physiology and applications”. *Ann. Microbiol*, 50: 117-131.
- Bielski B.H., Richter H.W., Chan P. C. (1975). “Some properties of the ascorbate free radical”. *Ann N Y Acad Sci.* 258: 231-7.
- Boitard C. (2002). “THE origin of type 1 diabetes: an autoimmune disease?”. *Diabetes Metab*, 28: 263 - 265.
- Boldyrev A.A. (2005). “Protection of proteins from oxidative stress: a new illusion or a novel strategy?”. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1057: 193-205.
- Bujard E., Braco U., Mauron J., Mottu F., Nabholz A., Wuhrmann J.J., Clément-G. (1970). “Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use

in Food Formulations.” 3rd.international Congress of Food Science and Technology, Washington.

- Burk R.F. (2002). “Selenium, an antioxidant nutrient”. *Nutr. Clin.*, 5, 47-49.
- Burton G.W., and Ingold K.U. (1984). “Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant”. *Science*, 224 : 569-573.
- Butel M-J., Collignon A. (2004). “Etablissement et composition de la flore microbienne intestinale”. In *Flore microbienne intestinale. Physiologie et pathologie digestives*. pp. 19-35.
- BVA/FRAME/RSPCA/UFAW (1993). Removal of Blood from Laboratory Mammals and Birds. *Laboratory Animals* 27: 1-22
- Calop J., Limat S., Frnandez C. (2008). “Pharmacie Clinique et Thérapeutique”. *3eme ED. Masson , Elsevier Masson*, 17-427. Paris
- Capeau J., Bouteloup V., Katlama C., Bastard JP., Guiyedi V. (2012). “ANRS CO8 APROCO-COPILOTE Cohort Study Group. Ten-year diabetes incidence in 1046 HIV-infected patients started on a combination antiretroviral treatment”. *AIDS.*, 26: 303–314
- Castenholz RW., Rippka R., Herdman M., Wilmotte A. (2001). “Form-genus I. *Arthrospira* Stizenberger 1852”. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (D. R. Boone & R.W. Castenholz, eds.)* 1: 542-543.
- Chader S., Mila T., Rabhi A., Chegrane A., Rahmoun H., Chibane N. (2009). “Sélection des Souches locales de microalgue d'intérêt industriel”. Rapport interne projet 6/7 CNRPDA / MPRH. Algérie.
- Challem J., (1999). “Spirulina”. McGraw-Hill Professional. USA. P24.
- Champagne C.P., Roy D., Garner N. (2005). “Challenges in the addition of probiotic cultures to foods”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 1 : 61-84.
- Chariemagne D. (2008). “La spiruline : aliment santé ?Dijon”.  
[http://www.spirulineaquitaine.com/References/memoire\\_diu.pdf](http://www.spirulineaquitaine.com/References/memoire_diu.pdf) . consulté le 20/09/2012.
- 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.
- Chen J., Schenker S., Frosto T.A., Henderson G.I. (1998b). “Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits”. *Biochim Biophys Acta.*, 1380:336-344.

- Chen P.Y., Csutora P., Veyna-Burke N.A., Marchase R.B. (1998a) “Glucose-6 phosphate and Ca<sup>2+</sup> sequestration are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart”, *Diabetes*, 47: 874-881.
- Chopra K., Bishnoi M. (2007). “Antioxydant Profile of Spirulina” : A Blue-Green Microalga in *Spirulina* In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina. Human Nutrition and Health*. 101-118.
- Ciferri O. (1983). “*Spirulina*, the edible microorganism”. *Microbiological Reviews*, 47: 551-578.
- Clément G. (1975a). “Production and characteristic constituents of the algae *Spirulina platensis* and *maxima*. Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*”. *Ann. Nutr. Alim*, 29 : 477-488.
- Clément G. (1975b). “Spirulina, a protein-rich food alga, conférence du Caire avril. institut français du Pétrole, division Applications”. pp1-18
- Clément G., Giddey C. et Menzi R. (1967). “Amino Acid Composition and Nutritive Value of the Alga *Spirulina Maxima*”. *J. Sci. Fd. Agric*. 18: 497-501.
- Cohen Z., Reungjitchachawali M., Siangdung W., Tanticharoen M. (1993). “Production and partial purification of gamma-linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*”. *Journal of Applied Phycology*, 5: 109-115.
- Colado-Simao, A.N., Suzukawa A.A., Casado M.F., Oliveira R. D, Guarnier F.A., and Cecchini R. (2006). “Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane)”. *Life Sci.*, 78: 1202-1210.
- Colla L.M., Reinehr C.O., Reichert C., Alberto J., Costa V. (2007). “Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes”. *Bioresource Technology*, 98, 7: 1489– 1493.
- Collado M.C., Sanz, Y. (2007). “Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains”. *J Appl Microbiol*, 103: 1147-1157.
- Coulston L., Dandona P. (1998). “Insulin-like effect of zinc on adipocytes” *Diabetes*, 29: 665–667.
- Cruchot H. (2008). “La spiruline « bilan et perspectives »”. France. P 353.
- Curk K.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J P., Le Bourgeois P., Renault P., de Roissart H., Rouvier C. (1994). “Méthodes d'identification des bactéries

- lactiques”. In : Bactéries lactiques. Vol I. De Roissart H., et Luquet F. M., Ed. Loriga : Uriage. 141-168.
- Dagogo-Jack S., Santiago JV. (1997). “Physiopathology of type 2 diabetes and modes of action of therapeutic interventions”. *Arch intern med.*, 157: 1802 - 1817.
  - Danone (2008). Rapport économique et sociale.  
[http://www.danone.com/uploads/tx\\_bidanonepublications/Danone-RA2013-FR.pdf](http://www.danone.com/uploads/tx_bidanonepublications/Danone-RA2013-FR.pdf).  
Consulté le 12/03/2012.
  - Dardoize V. (2010). “Le Petit Futé Pyrénées Orientales”. 7<sup>ème</sup> Edition. Paris. P 217.
  - Das KT., Rina Wati M., Kaneez F-S. (2015). “Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer’s Disease”. *Arch Neurosci.* 2, 2, e20078
  - De Vries W., Stouthamer A.H. (1969). “Sensitivity of *bifidobacteria* to oxygen”. *J Gen Microbiol.*, 55: 33: 13.
  - Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). “Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques”. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales.* 405p. Paris.
  - Delgado S., O'Sullivan E., Fitzgerald G., Mayo B. (2008). “In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates”. *J Appl Microbiol*, 104 : 1119-1127.
  - Dellaglio H., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D. (1994). “Caractéristique générales des bactéries lactique”. In : De Roissart H., Luquet F.M. Eds., Les bactéries lactiques: aspect fondamentaux et technologiques, *Loriga, Uriage*, 25-116. Paris.
  - Delpuech F., Joseph A., Cavelier C. (1976). “Consommation alimentaire et apport nutritionnel des algues bleues (*Oscillatoria Platensis*) chez quelques populations du Kanem (Tchad)”. *Ann. Nutr. Alim.*, 29 : 497-516
  - Delvis-Broughton. J. (1990). “Nisine an dits uses afood preservative”. *Food Technol.*, 44: 100-117.
  - De-Mattia G., Bravi MC., Laurenti O., Cassone-Faldetta M., Proietti A., De luca O., Armiento A., Ferri C. (1998). “Reduction of oxidative stress by oral N-acetylcysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentration in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive patients with non-insulin-dependent diabetes”. *Diabetologia*, 41: 1392 - 1396.



- Desjardins M.L., Roy D., Goulet J. (1990). "Growth of *bifidobacteria* and their enzyme profile". *J. Dairy Sci.*; 73 : 299-307.
- Desmazeaud M. (1998). "Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherches laitières". INRA, France.
- De-Vries W., Gerbarndy S.H., Stouthamer A.H. (1967). "Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*". *Biochem. Biophys. Acta.*n 136: 415-425.
- De-Vries W., Stouthamer A.H. (1967). "Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by *bifidobacteria*". *Journal of Bacteriology*, 96, 472-478.
- De-Vries W., Stouthamer A.H. (1968). "Fermentation of glucose, lactose, mannitol and xylose by *bifidobacteria*". *J. Bacteriol.*; 96: 472-479.
- Dey lucey MD., Anoja S., Attele DDS., Chun-Su Yuan MD. (2002). "Alternative therapies for type 2 diabetes". *Alternative medicine Review.*, 7, 1: 45-58.
- Diatewa M., Samba C.B., Assah T.C., Abena A.A. (2004). "Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats". *Journal of Ethnopharmacology*, ;92, (2-3) : 229-3.
- Dillon JC., Phuc AP., Dubacq JP. (1995). "Nutritional value of the alga *Spirulina*". *World Review of Nutrition and Dietetics*, 77: 32-46.
- Dola B., Jaishree D., Sandeep M., (2009). "Probiotic Efficiency of *Spirulina platensis* - Stimulating Growth of Lactic Acid Bacteria". *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4, 2: 160-163
- Dong X., Cheng G., Jian W. (2000a). "Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers". *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 386-390.
- Dong X., Xian Y., Jian W., Liu X., Lind D. (2000b). "*Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester". *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 ,1: 119-625.
- Donon M.B. (1998). "Tchad 1998". *Editions L'Harmattan*, 45p. Tchad.
- Doumandji A. (2007). "Effet de l'association de *Bbifidobacterium bifidum* avec *Sreptococcus thermophilus* sur l'activité antagoniste envers *Escherichia coli* enteropathogène". *Sciences & Technologie*, 25 : 65-70.
- Doumandji A., Boutekrabt L., Saidi N. A., Doumandji S., Hamerouch D., Haouari S. (2012). "Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés

- nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal”. *Revue « Nature & Technologie »*, 6: 40 - 50
- Downham A., Collins P. (2000). “Colouring our foods in the last and next millennium”, *J.Food Sci.Technol.*, 35: 5-22.
  - Dringen R., Hamprecht B. (1997). “Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells”. *Brain Res.* 759: 67-75.
  - Dubey U.K., Mistry V. (1996). “Effetc of bifidogenic factors on the growth characteristics of the *Bifidobacteria* in infant formulas”. *Journal of Dairy Science*, 76 : 1156-1163.
  - Ducluzeau R. (1993). « Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né”. *Ann. Pédiat*, 40 : 13-22.
  - Ducluzeau R. (2002). “Le concept de probiotique : historique, définition et principales caractéristiques = Concept of probiotic: history, definition and main characteristics”. *Antibiotiques*, 4: 234-238.
  - Durand J. R., Lévêque C. (1980). “Flore et faune aquatiques de l'Afrique sahélo-soudanienne”. *Volume 1. IRD édition.* 60p. Paris.
  - Ellenberg H. (1973). “Die Okosysteme der Erde: Versuch einer Klassifikation der Okosysteme nach funktionalen Gesichtspunkten”. In: Ellenberg, H. (ed) *Okosystemforschung Springer-Verlag*, -265p. Berlin
  - Espiard E. (2002). “Introduction to the industrial processing of fruits”. *Tech and Doc Lavoisier*. pp147-155.
  - Evans JL, Goldfine ID, Maddux B, Grosky GM. (2003). “Are oxidative stressactivated signaling pathways mediators of insulin resistance and bêta-cell dysfunction?”. *Diabetes.*, 52: 1-8.
  - Faidallah HM. Khan K. (2012). “Synthesis and biological evaluation of new barbituric and thiobarbituric acid fluoro analogs of benzenesulfoamides as antidiabetic and antibacterial agents”. *J Fluorine Chem.*, 142 : 96-104.
  - Falquet J. (2007). “Spiruline : aspects nutritionnels.: Antenna Technologies” <http://www.technap-spiruline.org/datas/Aspects%20nutritionnels1.doc> . Consulté le 21/09/2013.
  - Falquet J., Hurni JP. (2006). Spiruline, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies: 41 p. (<http://www.antenna.ch/malnutrition/aspects-nutritionnels.html>. Consulté le : 18/09/2013.

- FAO. (1995). “Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine”. *Ed. Food & Agriculture Org.*, 14p. Rome (Italie).
- FAO/ WHO. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/ WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, October 1-4, 2001. [www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html). Consulté le 3 avril 2012
- Fedkovic Y., Astre C., Pinguet F., Gerber M., Ychou M., Pujol H. (1993). “*Spirulina* and cancer”. *Bull. Inst. Oceano.*, 12: 117-120.
- Felis G.E., Dellaglio F. (2007). "Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*". *Curr Issues Intest Microbiol*, 8, 2: 44-61.
- Feng C., Yue J. (2013). “Algae and their Biotechnological Potential”. *Springer Science & Business Media*, 306 p. Hong Kong.
- Ferrannini E., Gastaldelli A., Miyazaki Y. (2005). “Betacell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis”. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 : 493 – 500.
- Féry F., Paquot N. (2005). “Étiopathogénie et physiopathologie du diabète de type 2”. *La revue de médecine interne*, 24 730 - 737.
- Fox R.D. (1986). “Algoculture : la spirulina, un espoir pour le monde de la faim”, Edisud, Aix En Provence.
- Fox R.D. (1996). “*Spirulina*, production & potential”. Aix en Provence : Edisud.
- Fox R.D. (1999). “Spiruline Technique, pratique et promesse”. *Edisud*, Aix-en-Provence p246.
- Frick JS., Schenk K., Quitadamo M., Kahl F., Koberle M., (2007). “*Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia Enterocolitica* on human epithelial cells”. *Inflamm Bowel Dis*, 13: 83–90.
- Fuller R. (1989). “Probiotics in man and animals”. *J. Appl. Bact.*, 66: 365-378.
- Gabby K.H. (1975). “Hyperglycemia, Polyol Metabolism, and Complications of Diabetes Mellitus”. *Annual Review of Medicine*. 26: 521-536.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003). “Espèces réactives de l’oxygène Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ?. Mécanismes

biochimiques”’. [http://www.helioxplongee.fr/cariboost\\_files/Radicaux\\_20Libres.pdf](http://www.helioxplongee.fr/cariboost_files/Radicaux_20Libres.pdf).

Consulté le 20/02/2013.

- Gaudez F. (2007). “Sociologie des arts, sociologie des sciences: actes du colloque international de Toulouse (Toulouse 2004)”. Editions L'Harmattan. Paris. P61.
- Geitler L. (1932). “Cyanophyceae. In : Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz”. Leipzig Germany: Ed. 2. Volume:14: 673-1196,
- Gibson G. R., Wang X. (1994). “Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria”. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:412-420.
- Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S. (2006). “Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome”. *Science*, 312 : 1355-1359.
- Gillery P. (2006). “Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré”. *Annales de Biologie Clinique.*, 64, 4 : 309-314.
- Gilliland S.E., Morelli L., Reid G. (2001). "Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. "FAO / WHO, <http://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398f.pdf>. Consulté le 12/02.2012.
- Girardin C., Schwitzgebel V. (2007). “Diabète de type 2 en pédiatrie : diagnostic et prise en charge”. *Rev Med Suisse.*, 3: 1001 - 1006.
- Girardin-Andréani C. (2011). “Algues et cyanobactéries”. Paris XIII. P 4.
- Glick M.C., Sall T., Zilliken F., Mudd F. (1960). “Morphological changes of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor”. *Biochem. Biophys. Acta.*, 37, 2: 361-363.
- Gomes, A.M.P., Malcata F.X. (1999). "*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics". *Trends in Food Science & Technology* 10,(4-5): 139-157.
- Gorbach S.L., Plaut A.G., Nahas L., Weinston L., Spanknebel G., Levitan R. (1967). “Studies of intestinal microflora. Microorganisms of the small intestine and their relation to oral and fecal flora”. *Gastroenterology*, 53: 856-867.
- Grabmann J., Hippeli S., Spitzenberger R., Elstner E.F. (2005). “The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* in concert with a-tocopherol and b-carotene effectively prevent oxidation of LDL”. *Phytomedicine*, 12 : 416-423.
- Grimaldi (2001). “Guide pratique du diabète”, édition Masson, 415p. Paris.

- Grosogeat H., (2009). ‘‘Ma promesse anti-âge. « Ralentir le vieillissement, Maigrir durablement, Combattre les maladies modernes »’’*.Ed Odile Jacobe, 212p .Paris*
- Gueimonde M., Garrigues C., van Sinderen D., Reyes-Gavilan C.G., and Margolles A. (2009). ‘‘Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance’’. *Appl Environ Microbiol*, 75: 3153-3160.
- Guglielmetti S., Tamagnini I., Minuzzo M., Arioli S., Parini C., Comelli, E., and Mora, D. (2009). ‘‘Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines’’. *Curr Microbiol*, 59 : 167-172.
- Guiraud (1998). ‘‘Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques’’. *Dunod. 652p. Paris.*
- Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000). ‘‘Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future’’. *Ann N Y Acad Sci.*, 899: 136-147.
- Gutteridge J.M., Wilkins S. (1983). ‘‘Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants’’. *Biochim Biophys Acta.*, 759: 38-41.
- Gutteridge, J.M., Rowley D.A., Halliwell B. (1982). ‘‘Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids’’. *Biochem J.* ,206: 605-609.
- Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A., Benmansour A. (2009). ‘‘Etude physicochimique et microbiologique de l’huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut’’. *Afrique SCIENCE*, 05,2, 246 – 259 ISSN 1813-548X
- Hagerman A.E., Butler L.G. (1978). ‘‘Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins’’. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 4: 809-812.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. (1995). ‘‘The definition and measurement of antioxidants in biological systems’’. *Free Radic Biol Med.*, 18: 125-126.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. (1990). ‘‘The antioxidants of human extracellular fluids’’. *Arch Biochem Biophys.*, 280: 1-8.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). ‘‘Free Radicals in Biology and Medicine’’. *3rd ed.*,888p.
- Hamadi N., Mansour A., Hassan M.H., Khalifi-Touhami F., Badary O. (2012). Ameliorative effects of resveratrol on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem Mol Toxicol.*, 26, 10:384-392

- Handelman G.J., van Kuijk F.J., Chatterjee A., Krinsky N.I. (1991). "Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene". *Free Radic Biol Med.*, 10: 427-437.
- Hassan A., Deschamps N., Richard J. (1989). "Précision des mesures de vitesse de croissance des streptocoques lactiques dans le lait basées sur la méthode de dénombrement microbien par formation de colonies. Étude de référence avec *Lactococcus lactis*". *Lait*, 69 : 433-447.
- Hayashi T. (1996). "Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina*". *Journal of Natural Products*, 59, 1: 83-87.
- Henrikson R. (1997). "*Earth Food: Spirulina*", ed 4. Ronore Enterprises Inc., Kenwood, california. <http://www.spirulinaresource.com/PDF.cfm/EarthFoodSpirulina.pdf>. Consulté 20/09/2012
- Holland D. (1920). "Generic index of the commoner forms of bacteria". *J. Bacteriol.*, 5: 191-229.
- Hooper L.V., Stappenbeck T.S., Hong, C.V., Gordon J.I. (2003). "Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity". *Nat Immunol*, 4: 269-273.
- Hoyles L., Inganas E., Falsen E., Drancourt M., Weiss N., McCartney AL., Collins MD. (2002). "*Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources". *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 3: 995-9.
- Hudson B.J.F., Karis I.G. (1974). "The lipids of the alga *Spirulina*". *J. Sci. Food Agric.*, 25: 759-763
- Hughes D. B., Hoover D.G., (1995). "Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk". *Journal of Dairy Sciences*, 78: 268-276.
- Humbert F., Sautra L., Federighi M., Jouve J-L. (1998), "Les salmonelles", In: Manuel de bacteriologie alimentaire. 27-52.Paris.
- Husain I., Poupard J. A., Norris R. F. (1972). "Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*". *J. Bact.*, 111:841-844.
- Hwang D. (1989). "Essential fatty acids and immune response". *FASEB J.*, 3:2052-2061.
- Jacquet J. (1974). "Utilisations biologiques des Spirulines". *Bull. Acad. Vét.* XLVII
- Jain SK., Palmer M. (1997). "The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins,. In Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales*, 376p. Paris.

- Jakuš V., Rietbrock N. (2004). “Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications”. *Physiol. Res.*, 53: 131 - 142.
- Janet Y., Uriu Adamsa T., Robert B., Ruckera J.F., Commissoa C.L.K. (2005). “Diabetes and dietary copper alter <sup>67</sup>Cu metabolism and oxidant defense in the rat”. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 : 312– 320.
- Jian W., Zhu L., Dong X. (2001). “New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences”. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51, 5: 1633-8.
- Jiang W., Dong X. (2002). “Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. Nov., and *Paracardovia denticolens* gen. nov., comb. nom., respectively”. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 3: 809-12.
- Johnson I.S. (1983). “Human insulin from recombinant DNA technology. American Association for the Advancement of Science”. *Science*, 219, 4585: 632-637.
- Johnson P., Schubert E. (1986). “Availability of iron to rats from *Spirulina*, blue – green algae”. *Nutrition and Research*, 6: 85-94.
- Joseph L., Evans I.D., Goldfine B.A., Maddu G., Grodsky M. (2002). “Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes”. *Endocrine Reviews*, 23 : 599-622.
- Jourdan J. P. (2012). “Cultivez votre spiruline », manuel de culture artisanale”. [http://www.antenna.ch/medias/Manuel\\_Cultivez\\_votre\\_spiruline\\_REVISION\\_2013.pdf](http://www.antenna.ch/medias/Manuel_Cultivez_votre_spiruline_REVISION_2013.pdf). Consulté le 20/10/2012.
- Jourdan J.P. (2007).” Manuel de culture de la Spiruline”. Antenna Technologies. Disponible sur : <http://www.antenna.ch/documents/manuelJourdan2061.pdf> . consulté le 20/10/2012.
- Jourdan J.P., (1997). “Cultivez votre spiruline, manuel de culture artisanale de la spiruline”. Disponible sur le site <http://www.antenna.ch/publications.htm> . Remis à jour le 08 juin 2002. consulté le 01/08/2012.
- Joventino I-P., Alves H-G., Neves L-C., Pinheiro-Joventino F., Leal L-K., Neves S-A., Ferreira F-V., Brito G-A., Viana G-B. (2012). “The microalga *Spirulina platensis* presents anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypolipidemic properties in diabetic rats”. *J Complement Integr Med.* 10, 9: 17.
- Julies A., Christin M. (2002). “Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety”. *Annual Review of Nutrition*, 22: 19-44.

- Jung D.M., de Ropp J.S., Ebeler S.E. (2000). “Study of interactions between food phenolics and aromatic flavors using one-and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2: 407-412.
- Kandler O. (1970). “Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*”. *Int. J. Syst Bacterio*, 20: 491-507.
- Kaneko T., Saito K., Kawamura Y., Takahashi S. (2001). “Molecular cloning of acid-stable glucose isomerase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a simple two-step PCR method, and its expression in *Echerichia coli*”. *Biosci Biotechgnol Biochem*, 65, 5: 1054-62.
- Kang J., Liu Y., Xie M.X., Li S., Jiang M., Wang Y.D. (2004). “Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid”. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1674, 2: 205-214.
- Kaufmann P., Pfefferkorn A., Teuber M., Meile. (1997). “Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR”. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1268-1273.
- Kebieche M., Lakroun Z., Lahouel M., Bouayed J., Meraihi Z., Soulimani R. (2009). “Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration”. *Exp Toxicol Pathol.*, 61, 2 :161-170
- Keegan A., Cotter MA., Cameron NE. (1999). “Effect of diabetes and treatment with the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats”. *Diabetologia*, 42: 343 - 350.
- Kerckhoffs A.P., Samsom M., van der Rest M.E., de Vogel J., Knol J., Ben-Amor K., Akkermans L.M. (2009). “Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosaassociated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients”. *World J Gastroenterol*, 15: 2887-2892.
- Ketan P.M., Santosh L.V., Ramesh K.G., Parloop A.B. (2007). “Effects of Coenzyme Q10 On Lipid Levels And Antioxidant Defenses In Rats With Fructose Induced Hyperlipidemia And Hyperinsulinaemia”. *The Internet Journal of Pharmacogy*, 5: 1531-2976.
- Kiet PQ, Durand-Chastel H. (2006). “*Spirulina* rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids”. In Charpy et al. (ed.) International Symposium on Cyanobacteria for Health, *Science and Development*, p111-117.



- Kihal M., Prevost H., Lhotte ME., Huang DQ., Diviès C. (1996). “Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*”. *J. Appl. Microbiol.*, 22: 219-223.
- Kikugawa K., Beppu M. (1987). “Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins”. *Chem Phys Lipids.*, 44: 277-296.
- Kitagawa S., Sakamoto H., Tano H. (2004). “Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin”. *Chem.Pharm.Bull.*, 52: 999-1001.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. (1998). “Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria”. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 103-125.
- Klijn A., Mercenier A., Arigoni F. (2005). “Lessons from the genomes of bifidobacteria”. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 491-509.
- Kocak G., Aktan F., Canbolat O., Ozogul C., Elbeg S., Yildizoglu-Ari N., Karasu C. (2000). “The ADIC study group- antioxidants in diabetes- induced complication. Alpha lipoic acid ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes”. *Diabetes*, 13: 308-318.
- Kojima M., Suda S., Hotta S., Hamada K. (1970). “Introduction of pleomorphology and calcium on deficiency in *Lactobacillus bifidus*”. *J. Bact*, 102: 217-220.
- Koll P., Mandar R., Marcotte H., Leibur E., Mikelsaar M., and Hammarstrom L. (2008). “Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health”. *Oral Microbiol Immunol*, 23: 139-147.
- Konan F.K., Guessennd N.K, Oussou K.R., Bahi C., Coulibaly A., DJAMAN A.J. Dosso M. (2014). “Effet antibactérien de l’extrait aqueux de l’écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance in vitro des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE)”. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8, 3 : 1192-1201.
- König C. (2007). “Les algues : première lignée végétale”. [http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/lesalgues-premiere-lignee-vegetale\\_523/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/lesalgues-premiere-lignee-vegetale_523/c3/221/p2/). Consulté le 30/12/2012
- Kono Y., Fridovich I. (1983). “Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*”. *J Biol Chem*, 258: 6015-6019.
- Korshunov SS., Skulachev VP., Starakov AA. (1997). “High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria”. *FEBS letters*. 416: 15-18.

- Krinsky N.I. (1992). "Mechanism of action of biological antioxidants". *Proc Soc Exp Biol Med.*, 200: 248-254.
- Lann K.L., Ferret C., VanMee L., Spagnol C., Lhuillery M., Payri C., Stiger-Pouvreau V., 2012. "Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability". *Phycological Research*, 60, 1: 37–50.
- Laparra J-M., Sanz Y., (2010). "Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals". *Pharmacol Res.*, 61: 219–225.
- Lauer E. (1990). "*Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces". *Int J Syst Bacteriol.*, 40, 1: 100-2.
- Lauer E., Kandler O. (1976). "Mechanismus der variation des Verhältnisses Acetat/Lactat bei Vergärung von Glucose durch Bifidobacterien". *Arch. Mikrobiol.*, 2, 110, 23 271–277.
- Lauer E., Kandler O. (1983). "DNA-DNA homology, murein type and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*". *Systematic and Applied Microbiology*, 4: 42-64.
- Lay C., Rigottier-Gois L., Holmstrom K., Rajilic M., Vaughan E.E., de Vos W.M. (2005). "Colonic microbiota signatures across five northern European countries". *Appl Environ Microbiol* 71: 4153-4155.
- Le-Bail D. (2014.) "Les compléments alimentaires qui guérissent. Editions Mosaique Santé". Germany. [http://www.narayana-verlag.com/homeopathy/pdf/Les-complements-alimentaires-qui-guerissent-Didier-Le-Bail.17329\\_2Diab%C3%A8te\\_de\\_type\\_2.pdf](http://www.narayana-verlag.com/homeopathy/pdf/Les-complements-alimentaires-qui-guerissent-Didier-Le-Bail.17329_2Diab%C3%A8te_de_type_2.pdf). Consulté le 23/01/2015.
- Le Borgne Y. (1986). "La culture des micro- algues". In: *Aquaculture I Technique et Documentation* , 192p. Paris.
- Leclerc V., Floc'h J-Y. (2010). "Les secrets des algues". *Ed. Quae*, 19p. Paris.
- Lee JB., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U., Maeda M., Nemoto T., Nakanishi H. (1998). "Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*". *Journal of natural products*, 9 : 1101-1104
- Lee JB., Srisomporn P., Hayashi K., Tanaka T., Sankawa U., Hayashi T. (2001). "Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity". *Chemical And Pharmaceutical Bulletin*, 1, 49: 108-110

- Lee Y.K., Salminen S. (1995). "The coming of age of probiotics". *Food Science and Technology*, 6: 241-244.
- Legeard E. (2005). "Force: entraînement & musculation". *Editions Amphora*, 194p. France.
- Le-Mestre M., Simatos D., Lorient D. (2002). "L'eau dans les aliments". *Edition Technique et Documentation*, 674p. Paris
- Leonard J., Compere P. (1967). "Spirulina platensis (Gom.) Geiltler, algue bleu de grand valeur alimentaire par sa richesse en proteines". *Bull. Nat. Platentuin Belg*, 37, 1 : 23p
- Li B., Gao MH., Zhang XC., Chu XM. (2006). "Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro". *Biotechnology And Applied Biochemistry*. 43, 3 : 155-164.
- Lievin V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D., Neeser JR., Servin AL. (2000). "Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal will microflora exert antimicrobial activity". *Gut*, 47, 5: 646-52.
- Lindblad P., Oxelfelt F., Tamagnini P., Troshina O. (1998). "Cyanobacterial Biotechnology Nostoc PCC 73102 and H2 : Knowledge, Research and Biotechnological Challenges Cyanobacterial biotechnology : proceedings of the International Symposium". *Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD*. 11-13.
- Lynch J. (2001). "Physicochemical analysis of Industrial Catalysts Characterization practice manual". *TECHNIP Editions*. 31p. France.
- Macfarlane G.T., Macfarlane S. (2007). « Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut ». *Curr Opin Biotechnol*, 18: 156-162.
- Macpherson A.J., Harris N.L. (2004). "Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system". *Nat Rev Immunol*, 4: 478-485.
- Mani U.V., Sangeeta S., Iyer U.M., Subramanian S.R. (1996). "Studies on the effect of *Spirulina* supplementation in Control of Diabetes Mellitus » Cyanobacterial biotechnology : proceedings of the International Symposium". *Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD*. P301-304.
- Manoj G, Venkataraman LV, Srinivas L. (1992). "Antioxidant properties of *Spirulina* (*Spirulina platensis*)". *Seshadri and Bai.Spirulina. MCRC*. 48-154.
- Mares A., Neyts K., Debevere J. (1994). "Influence of pH, salt and nitrite on the heme-dependent catalase activity of lactic acid bacteria". *Int J Food Microbiol*, 24: 191-198.

- Marles R.J., Farnsworth N.R. (1994). “Plants as sources of antidiabetic agents”. *Econ Med Plant Res.*, 6: 149-187.
- Martins F.S., Silva A.A., Vieira A.T., Barbosa F.H., Arantes R.M., Teixeira M.M., and Nicoli J.R. (2009). “Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties”. *Arch Microbiol*, 191: 623-630.
- Masco L., Crockaert C., Van Hoorde K., Swings J., Huys G. (2007). “In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*”. *J Dairy Sci*, 90: 3572-3578.
- Matteuzzi D., Crociani F., Zani G., Trovatelli L. D., (1971). “*Bifidobacterium suis* n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces”. *Z Allg Mikrobiol.* 11, 5: 387-95.
- Matto J., Malinen E., Suihko M L., Alander M., Palva A., Saarelait M. (2004). “Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria”. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 459-470.
- Mayrhofer S, Mair C., Kneifel W., Domig K. J. (2011). “Susceptibility of Bifidobacteria of Animal Origin to Selected Antimicrobial Agents”. *Hindawi Publishing Corporation Chemotherapy Research and Practice*, 2011:989520. doi: 10.1155/2011/989520.
- Meile L., Ludwig W., Rueger U., GutC., Kauffmann P., Dasen G., Wenger S., et Teuber M., (1997). “*Bifidobacterium lactis* sp. Nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk”. *Systematic and applied Microbiology*, 20, 1:57-64.
- Meile L., Rohr L. M., Geissmann T. A., Herensperger M., Teuber M. (2001). “Characterization of the D- xylulose 5 phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (xfp) from *Bifidobacterium lactis*”. *Journal of Bacteriology*, 183 : 2929-2936.
- Merck Man., (1994). “Manuel de Diagnostic et Thérapeutique”. 2<sup>eme</sup> ed. française, éditions d'Après De planzy, 244p. Paris.
- Merdan Ngattai-Lam. (2009). “Étude des projets d'investissement en Afrique Centrale : 24 études de cas”. *Editions L'Harmattan*, 267p. Paris.
- Miquel J. (2002). “Can antioxidant diet supplementation protect against age-related mitochondrial damage?”. *Ann NY Acad Sci.*, 959 : 508-516.
- Misra A.K., Kuila R.K. (1992). “Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity”. *Lait*, 72: 213-220.

- Mitsuoka T. (1969). "Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec. and *Bifidobacterium pseudolongum* nov". spec. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, 210: 52-64.
- Mitsuoka T. (1984). "Taxonomy and ecology of bifidobacteria". *Bifidobacteria Microflora* 3: 11-28
- Mitsuoka T. (1996). "Intestinal flora and human health. *Asia Pacific J Clin Nutr.*, 5: 2-9.
- Modler H.W., Mckellar R.C. Yaguchi M. (1990). "Bifidobacteria and bifidogenic factors". *Canadian institut of Food Science and Technology Journal*, 23: 29-41.
- Molyneux P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26: 211-219.
- Monnier V.M., Taneda S. (1989). "ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens". *Clinical chemistry* ., 40: 1797-1861.
- Morist A., Montesinos J.L., Cusido J.A., Goclia F. (2001). "Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in acontinuous photobioreactor to be used as food". *Process Biochemistry*, 37: 535-547.
- Moshe Z., Abraham Z., Reznick R., Obeid Z., Rafael M.N. (2007). "Relationship of Flow Rate, Uric Acid, Peroxidase, and Superoxide Dismutase Activity Levels with Complications in Diabetic Patients: Can Saliva Be Used to Diagnose Diabetes?". *Antioxidants and Redox Signaling*. 9: 765-773.
- Muhling M, Harris N., Belay A. and Whitton BA. (2003). "Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*". *Journal of Phycology*. 39: 360-367.
- Mutlib A.E., Abbott F.S. (1992). "Isolation and characterization of carbinolamide and phenolic glucuronide conjugates of (+)-N-methyl-N-(1-methyl-3, 3- diphenylpropyl) formamide and N-formylmethamphetamine by FAB/MS, LC/MS/MS, and NMR". *Drug Metabolism and Disposition*, 20, 3: 451-460.
- Naczki M., Shahidi F. (2006). "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 5: 1523-1542.
- Narmadha T., Sivakami V., Ravikumar M., Mukeshkumar D. (2012). "Effect of *Spirulina* on lipid profile of hyperlipidemics". *World Journal of Science and Technology*, 2:19-22.
- Neu J., Caicedo R. (2005). "Probiotics: protecting the intestinal ecosystem?" *J Pediatr*, 147: 143-146.

- Ngo-Matip M.-E., Pieme C.-A., Azabji-Kenfack M., Biapa P.-C., Germaine N., Heike E., Moukette B.-M., Emmanuel K., Philippe S., Mbofung C.-M., Ngogang J.-Y. (2014). "Effects of *Spirulina platensis* supplementation on lipid profile in HIV-infected antiretroviral naïve patients in Yaounde - Cameroon: a randomized trial study". *Lipids Health Dis.*, 13, 1:191. doi: 10.1186/1476-511X-13-191.
- O'Hara A.M., Shanahan F. (2006). "The gut flora as a forgotten organ". *EMBO Rep* 7: 688-693.
- 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
- OMS, Série Rapports technique, No. 646, 1980 (Comité OMS d'expert du diabète sucré, deuxième rapport).
- ORLA-JENSEN S. (1927). "La classification des bactéries lactiques". *Lait* , 4: 468-474.
- Oshiro S., Nakajima H. (1988). "Intrahepatocellular site of the catabolism of heme and globin moiety of hemoglobin-haptoglobin after intravenous administration to rats". *J Biol Chem.*, 263: 16032-16038.
- Osman HF., Eshak MG., El-Sherbiny EM., Bayoumi MM. (2012). "Biochemical and Genetical Evaluation of Pomegranate Impact on Diabetes Mellitus Induced by Alloxan in Female Rats". *Life Science Journal*, 9: 1543-53.
- Ostrakhovitch E.A., Afanas'ev I.B. (2001). "Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators". *Biochem.Pharmacol.*, 62: 743-746.
- Otles S., Pire R. (2001). "Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species". *JAOAC Int.* 84, 6:1708-14.
- Otten J., Pitz Hellwig J.D., Meyers L. (2007). "Les apports nutritionnels de référence: le guide essentiel des besoins en nutriments". [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/reference/cons\\_info-guide\\_cons\\_fr.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/reference/cons_info-guide_cons_fr.html). consulté le 04/05/2013.
- Ou Y., Lin L., Pan Q., Yang X., Cheng X., (2012). "Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice". *Environ Toxicol Pharmacol.*, 34, 3:721-6.
- Oyaizu M. (1986). "Studies on products of browning reaction Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine". *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.

- Packer J E., Mahood J.S., Mora-Arellano V.O., Slater T.F., Willson R.L., Wolfenden B. S. (1981). "Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy-radical with beta-carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)- octane". *Biochem Biophys Res Commun.*, 98: 901-906.
- PAG: Protein Advisory Group of U.N. (1974). "Recent Developments in *Spirulina*". *PAG Bulletin*, 3, 4: 4-7.
- Pang QS., Guo BJ., Ruan JH. (1988). "Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis*". *Chuan Hsueh Pao*, 15,5: 374-381.
- Paolisso G., D'Amore A., Galzerano D., Varriccho M., D'Onofrio F. (1993). "Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type 1-2 diabetic patents". *Diabetes Care*, 16 : 1433 - 1437.
- Parada., J-L., Zulpa de Caire G., Zaccaro de Mulé M-C., Storni de Cano M-M., (1998). "Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*". *Int J Food Microbiol.*, 45, 3: 225-8.
- Pascaud M., Brouard C. (1991). "Acides gras polyinsaturés essentiels w6 w3. Besoins nutritionnels, équilibres alimentaires". *Cah. Nutr. Diet.* XXV, 13:185-190.
- Pascaud M., Doumenge F., Durand-Chastel H., Toulemont A. (1993). "The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response". *Bull. Inst. océanogr.*,12: 49-57.
- Pastre J., (2007). "Interêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques". *Revue Méd. Vét.*, 158, 4: 180-189.
- Pavan S., Desreumaux P., Mercenie, A. (2003). "Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria". *Clin Diagn Lab Immunol.*, 10: 696-701.
- Peltier C., Fort J-M. (2009). "Histoire Géographie Bac technologique STAV: Espaces, temps et durabilité". *ED Educagri*, 255p. Paris.
- Peluso I., Romanelli L., Palmery M., (2014). "Interactions between prebiotics, probiotics, polyunsaturated fatty acids and polyphenols: diet or supplementation for metabolic syndrome prevention?". *Int J Food Sci Nutr.*, 65, 3:259-67.
- Perez M.B., Calderon N.L and Croci C.A. (2007). "Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)". *Food Chemistry*, 104, 2 : 585-592.

- PEREZ R. (1997). "Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture". *IFREMER*. P16-23. [http://data0.eklablog.com/acdnm/perso/doc%20a%20telecharger/26\\_biblio\\_spiruline.pdf](http://data0.eklablog.com/acdnm/perso/doc%20a%20telecharger/26_biblio_spiruline.pdf) consulté le 12/08/2013.
- Peter-Riesch B., Philippe J., Stalder H. (2002). "Découverte d'un diabète sucré". *PrimaryCare*, 2 : 284 - 290.
- Pierlovisi C. (2007). "L'Homme et la Spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques". *Paris V- René Descartes, Sciences Pharmaceutiques et Biologiques*, 162p, Paris.
- Pierlovisi C. (2008). "Composition chimique de la spiruline. colloque international sur la spiruline- Toliara Sud – Ouest de Madagascar.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., et Defraigne JO., (1999). "Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. Cancérologie". [http://www.amessi.org/IMG/pdf/methodes\\_d\\_evaluation\\_du\\_stress\\_oxydatif\\_chez\\_l\\_homme.pdf](http://www.amessi.org/IMG/pdf/methodes_d_evaluation_du_stress_oxydatif_chez_l_homme.pdf). Consulté le 21/04/2012.
- Ponce AG, Fritz R, Del Alle C. Roura SI. (2003). "Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard". *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 36 : 679-684.
- Poortmans JR., Boisseau N. (2009). "Biochimie des activités physiques et sportives". *Groupe de Boeck*. 638p. France.
- Poupard JA., Husain I., Norris RF. (1973). "Biology of the bifidobacteria". *Bacteriol Rev*. 37, 2: 136-65.
- Powell S.R. (2000). "The antioxidant properties of zinc". *Nutr*. 130: 1447-1454.
- Prescott ML, Harly J., Kleind A. (2003). "Microbiologie". *Ed.Boock et larcien*, 113p. bruxell..
- Proulx M., Gauthier S.F., Roy D. (1992). "Utilisation d'hydrolysats enzymatique de caséine pour la croissance des bifidobactéries". *le lait*, 72, 4 :393-404.
- Puyfoulhoux G., Rouanet JM., Besançon P., Baroux B., Baccou JC., Caporiccio B. (2001). "Iron availability from iron-fortified *spirulina* by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model". *J Agric Food Chem.*, 49:1625-9
- Quillet M. (1975). "Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les Spirulines". *Ann. Nutr. Alim.*, 29 : 553-561.



- Rahal K. (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème Ed, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Rajasekaran S., Sivagnanam K., et Subramanian K. (2005). "Mineral contents of Aloe vera leaf gel and their role on Streptozotocin induced diabetic rats". *Biol. Trace Elements*, 107:1–11.
- Ramamoorthy A, Premakumari S. (1996). "Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients". *J Food Sci Technol.*, 33: 124–127
- Rangsayatorn N., Pokethitiyook P., Upatham ES., Lanza GR. (2004). "Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel". *Environ Int.*, 30, 1:57-63.
- Rasic J.L., Kurmann J.A. (1983). "Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography". *Experientia Suppl*, 39:1-295.
- Rasmussen, H.-E., Martínez, I., Lee, J.-Y., Walter, J., (2009). "Alteration of the gastrointestinal microbiota of mice by edible blue-green algae". *J Appl Microbiol.*, 107, 4:1108-1118.
- Reid G., Sanders ME., Gaskins HR., Gibson GR., Mercenier A.,(2003). "New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics". *J Clin Gastroenterol*, 37: 105–118.
- Requena T., Burton J., Matsuki T., Munro K., Simon MA., Tanaka R., Watanabe K., Tannock WG. (2002). "Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the translocase gene". *Appl. Environ. Microbiol*, 2420-2427.
- Reuter G. (1963). "Comparative studies on the bifidus flora in the feces of infants and adults with a contribution to classification and nomenclature of bifidus strains". *Zentralbl Bakteriol.*, 191: 486-507.
- Reyed M. (2007). The Role of *Bifidobacteria* in Health". *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2, 1: 14-24.
- Reyed R. (2006). "Isolation, Identification Of Human Autochthonous *Bifidobacteria* And Comparison Of Its Growth On Different Natural Food Products". *The internet Journal of Microbiology*. Vol 3. N° 2.

- Richmond A. (1986). "Handbook of microalgal mass culture". *CRC Press*, 301p. New York.
- Robert F.R. (2009). "Survival of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* DSMZ 10140 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC25527 during manufacture and storage of ice cream". [http://forms.gradsch.psu.edu/diversity/mcnair/mcnair\\_jrnl2009/files/Freeman.pdf](http://forms.gradsch.psu.edu/diversity/mcnair/mcnair_jrnl2009/files/Freeman.pdf). consulté le 20/10/2012.
- Rodier M. (2001). "Définition et classification du diabète". *Médecine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25, 2 : 91-93.
- Rogosa M. (1974). "Genus III, *Bifidobacterium*". Orla-Jensen. In : Buchanan R., Gibbons N., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn., , Williams and Wilkins : Baltimore, 669-676.
- Rollan S. (1997). "L'intestin grêle le reflet de notre image santé". [http://www.symbiotec.fr/documentation/L\\_intestin\\_et\\_sante.pdf](http://www.symbiotec.fr/documentation/L_intestin_et_sante.pdf). consulté le 20/02/2013.
- Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Remirez D., Rimbau V. (2003). "C Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects". *Current Protein and Peptide Science*, 4: 207-16.
- Romond C., Beerens H., Neut C., Montreuil J. (1980). "Humanization of milk, "in vitro" influences of human milk, cow milk and infant formulae on the growth of "*Bifidobacterium*". *Annals Microbiology*, 131, 3 :309-314.
- Romond M.B., Romond C. (1987). "*Bifidobacterium* : leur écologie et leur importance en santé humaine". *Médecine et Chirurgie Digestives*, 16 : 2-5.
- Rosaria-D'Aimmo M., Modesto M., Biavati B. (2006). "Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products". *International Journal of Food Microbiology*, 115: 35–42
- Roy D., Ward P. (1992). "Rapid detection of *Bifidobacterium dentium* by enzymatic hydrolysis of  $\beta$ -glucuronide substrates". *J. Food Prot.*; 55, 29: 1-295.
- Saavedra JM., Bauman NA., Oung I., Perman JA., Yolken RH. (1994). "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus". *Lancet*, 344 : 1046–1049.
- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni DE., Prevost H., Kihal M. (2002). "Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides". *J. Alg. Reg. Arides*, 1:01-11.

- Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M., Hayashi H., Fukuyama M., Benno Y. (2002). “Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*”. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 6 : 1945-1951.
- Sakhon M., Crouzet J. (2009). “Transformation, conservation et qualité des aliments. Edition des archives contemporaines”, 102p. Paris.
- Samaan C., Klip A. (2008). “L’obésité, l’insulinorésistance et le diabète de type 2 : l’interaction entre les cellules adipeuses et les cellules musculaires”. *Endocrinologie*, 8: 7-13.
- Samona A., Robinson R.K., Marakis S. (1996). “Acid production by *bifidobacteria* and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk”. *Food Microbiology*, 13: 275–280.
- Samuels R., Mani UV., Iyer UM., Nayak US. (2002). “Hypocholesterolemic effect of *Spirulina* in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome”. *Journal of Medicinal Food*, 5: 91-96.
- Sanchez B., Champomier-Verges M.C., Anglade P., Baraige F., de Los Reyes- Gavilan C.G., Margolles A., Zagorec M. (2005). “Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809”. *J Bacteriol*, 187 : 5799-5808.
- Sanchez-Miron A., Ceron Garcia M-C., Contreras Gomez A. (2003). “Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi-steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors”. *Biochem. Eng.*, 16: 287–297.
- Sandoval M., Okuhama N. N., Jang X. J., Condezo L. A., Lao J., Angeles F. M., Musah R. A., Brobowski P., Miller M. J. S. (2002). “Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guinasensis*) are independant of their alkaloid content”. *Phytomedicine*, 9: 325-337.
- Santillan C. (1974). “Cultivation of the *Spirulina* for Human Consumption and for Animal Feed”. International Congress of Food Science and Technology. Madrid Spain.
- Satokari RM., Vaughan EE., Akkermans AD., Saarela M., De Vos WM. (2001). “Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal *bifidobacterium* population in a prebiotic and probiotic feeding trial”. *Syst Appe Microbiol.* 24, 2: 227-31.
- Savage D.C., (1977). “Microbial ecology of the gastrointestinal tract”. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 107-133.

- Scardovi V. (1984). “Genus *Bifidobacterium*”. Orla-jensen. In Bergy’s Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Ed. Kreig, N.R. and Holt, J.G. pp. 1418-1434. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Scardovi V. (1986). “Genus *Bifidobacterium*”. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holte JG, Eds. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology 2: 1418-1434. Williams&Wilkins, Baltimore.
- Scardovi V., Crociani F. (1974). “*Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships”. *Int. J. Bacteriol.*, 24: 6-20.
- Scardovi V., Trovatelli L.D. (1965). “The fructose-6- phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*”. *Ann. Microbiol. Enzymol.*, 15: 19-29.
- Scardovi V., Trovatelli L.D. (1969). “New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*”. *Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. ABT.*, 2, 123, 64-88.
- Scardovi V., Trovatelli L.D. (1974). “*Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the ‘minimum’ and ‘subtile’ groups of new bifidobacteria found in sewage”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24: 21-28.
- Scardovi V., Trovatelli L.D., Biavati B., Zani G. (1979). “*Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships”. *Int. T. Syst. Bacteriol.*, 29: 291-311.
- Scardovi V., Zani G. (1974). “*Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit faeces”. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24 : 29-34.
- Schaller C-T., Razanamahay J. (2002). “L'alimentation plaisir. Se nourrir et se régénérer agréablement et naturellement”. *Editions Vivez Soleil*, 221p, Suisse.
- Schleifer K. H., Ludwig W. (1995). “Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera”. *System Appl Microbiol*, 18: 461-467.
- Schmidt A.M., Hori O., Cao R., Yan S.D., Brett J., Wautier J.L., Ogawa S., Kuwabara K., Matsumoto M., Stern D. (1996). “RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products”. *Diabets*, 3: 77-80.
- Scholz R.W., Minicucci L. A., Reddy C. C. (1997). “Effects of vitamin E and selenium on antioxidant defense in rat heart”. *Biochem Mol Biol Int.*, 42,997-1006.

- Sharma B., Viswanath G., Salunke R., Roy P. (2008). "Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice". *Food Chemistry*, 110: 697–705.
- Sheehan V.M., Sleator R.D., Hill C., Fitzgerald G.F. (2007). "Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003". *Microbiology*, 153: 3563-3571.
- Shekharam KM., Venkataraman LV., Salimath PV. (1987). "Carbohydrate Composition and Characterization of Two Unusual Sugars from the Blue Green Alga *Spirulina-Platensis*". *Phytochemistry*, 26: 2267-2270.
- Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., Miyakawa H., Yaeshima T., Araya T., Tomita M. (1992). "Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species". *J Dairy Sci.*, 75, 12: 3296-3306.
- Sies H. (1991). "Oxidative stress: from basic research to clinical application". *Am J Med*, 91: 31-38.
- Simpoire J., Kabore F., Zongo F., Dansou D., Bere A., Pignatelli S., Biondi D., Ruberto G., Musumeci S. (2006). "Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing *Spirulina* and *Misola*". *Nut. J.*, 5,3, doi: 10.1186/1475-2891-5-3
- Simpson PJ., Stanton C., Fitzgerald GF., Ross RP. (2003). "Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum". *J Bacteriol.*, 185, 8: 2571-2581.
- Singh J., Kakkar P. (2009). "Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats". *J. Ethnopharmacol.*, 4,123, 1:22-6.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent". *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Solisio C., Lodi A., Torre P., Converti A., Del Borghi M. (2006). "Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*". *Bioresour Technol.*, 97, 14: 1756-60.
- Solzbach U., Hornig B., Jeserich M., Just H. (1997). "Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients". *Circulation*, 96: 1513-1519.
- Stappenbeck T.S., Hooper L.V., Gordon J.I. (2002). "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 15451-15455.

- Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N. (1987). “Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance”. *Science*, 235: 1043- 1046.
- Tamime A.Y., Marshall V.M.E., Robinson Richard K. (1995). “Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria”. *J. Dairy Res.*, 62: 151-187.
- Tamura Z. (1983). “Nutrition of *bifidobacteria*”. *Bifidobacteria Microflora*, 2:3-16.
- Tanaka N., Yonekura H., Yamagishi S., Fujimori S., Fujimori H., Yamamoto Y.Y., Yamamoto H. (2000). “The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor through nuclear factor-B, and by 17-estradiol through Sp1 in human vascular endothelial cells”. *J Biol Chem*. 275: 25781–25790.
- Tannock G.W., Munro K., Bibiloni R., Simon M.A., Hargreaves P., Gopal P., Harmsen H., Welling G. (2004). “Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans”. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 2129-2136.
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.P. (2009). “Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core”. *Environ Microbiol* 11 2574- 2584.
- Tato-Rocha R.E., Cardenas V.E., Herrero H.E. (1994). “Selenium: the physiopathological and clinical implications”. *An.Med Interna.*, 11: 457-463.
- Tedesco I., Russo M., Russo P., Iacomino G., Russo G. L., Carraturo A., Faruolo C., Moio L., Palumbo R. (2000). “Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells”. *J.Nutr.Biochem*. 11:114-119.
- Terada A., Hara H., Kataoka M., Mitsuoka T. (1992). “Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal flora”. *Microbiol. Ecology in Health and Disease*, 5, 1: 43-50.
- Thibault C., Levasseur M-L. (2001). “La reproduction chez les mammifères et l'homme”. *Ed. Quae*. 595p. Paris.
- Thompson J.K., Collins M.A., Mercer W.D. (1996). “Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450”. *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 3 : 338 - 348.
- Tissier H. (1900). “Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Thèse Univ Paris, France.
- Tissier H. (1906). “Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin”. *Critical Review of the Society for Biology*, 60: 359-361.

- Tissier MH. (1899). “La réaction chromophile d'Escherichel et le Bacterium coli”. *CR Acad Sei*, 51: 943-945.
- Tojo M., Oikawa T., Morikawa Y., Yamashita N., Iwata S., Satoh Y. (1987). “The effects of *Bifidobacterium breve* administration on *Campylobacter enteritis*”. *Acta Pediatr Jpn.*, 29: 160–167.
- Trebichavsky I., Rada V., Splichalova A., Splichal, I. (2009). “Cross-talk of human gut with bifidobacteria”. *Nutr Rev*, 67 : 77-82.
- Treki A.S., Merghem R., Dehimat L. (2009). “Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: *Thymus hirtus*”. *Sciences & Technologie*, 29: 25-29.
- Trovatelli L.D., Crociani F., Pedinotti M., Scardovi V. (1974). “*Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken faeces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit faeces”. *Aech. Microbiol.*, 9: 187-198.
- Uesugi I., Yajima M. (1978). “Oxygen and “strictly anaerobic” intestinal bacteria. I. Effects of dissolved oxygen on growth”. *ZAllg MiKrobiol.*, 18, 4: 287-95.
- Umesh B. V. (2002). “Spirulina”. *Unicorn Books*. New delhi. P32.
- Van Der Werf M.J.a.V.K. (2001). “*Bifidobacteria*: genetic modification and the study of their role in the colon”. *journal of agricultural and food chemistry*, 49: 378-383.
- Varga L., Szigeti J., Kovács R., Földes T., Buti S. (2002). “Influence of a *Spirulina platensis* biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1)”. *J Dairy Sci.*, 85, 5:1031-8.
- Vautrin D. (2006). “Programme anti-âge: Un guide pratique pour tous ceux qui veulent rester jeunes”. Alpen Editions s.a.m.Italie. P 87.
- Ventura M., van Sinderen D., Fitzgerald D.F., Zink R. (2004). “Insights into the taxonomy, genetics and physiology of *bifidobacteria*”. *Antonie van leeuwenhoek*, 86 : 205-223.
- Vergès B. (2007). “Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2”. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21 : 9-16.
- Vermeil G., Arsan A., Du Fraysseix M., Dartois A-M. (2003). “Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans”. 4eme Ed. *Editions Doin*, 34p. France
- Vesa T., Pochart P., Marteau P. (2000). “Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract”. *Aliment Pharmacol Ther.*, 14: 823-828.

- Villarreal M.R. (2006). "Digestive system diagram". <http://cnx.org/contents/0ed33468-0de9-4336-9b45-bd1b03d7bd93@1/anatomy-of-the-digestive-system>. Consulté le 01/01/2012.
- Wang J., Wang Y., Wang ZX., Li L., Qin J., Lai WQ., Fu Y., Suter PM., Russell RM., Grusak MA., Tang GW., Yin SA. (2008). "Vitamin A equivalence of *Spirulina* beta-carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method". *American Journal of Clinical Nutrition*, 87:1730-1737.
- Watabe J., Benno Y., Mitsuoka T. (1983). "*Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from ceca of chickens". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33 :127-132.
- Watanabe Y., de la Noue J., Hall D.O. (1995). "Photosynthetic performance of an helical tubular photobioreactor incorporating the Cyanobacterium *Spirulina platensis*". *Biotechnology and bioengineering*, 47, 2: 261-269.
- Watterlot L. (2010). "Analyse des effets des souches probiotiques anti-inflammatoires". *Agro Paris Tech. INRA*, 207p. Paris.
- Weaber G. (2007). "Diabétologie expérimentale". *Revue médicale de la Suisse Romande*. 120 : 907-913.
- Wefers H., Sies H. (1988). "The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E". *Eur J Biochem*. 174: 353-357.
- Weiss J.E., Rettger L.F. (1943). "*Lactobacillus bifidus* Tissier and its biological position in the group of aciduric organisms". *J. Bact.*, 27: 39-40.
- Wijsman M.R., Johanna L.P., Herejgers M., Groote J.M. (1989). "Selective enumeration of bifidobacteria in fermented dairy product". *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43:395-405.
- Winslow C., Broadhurst J., Buchanan R., Krumwiede C., Rogers L., Smith G. (1917). "The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial types". *J. Bacteriol.*, 2: 505-566.
- Wolff SP. (1993). "Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications". *British Medical Bulletin*, 49, 3: 642 - 632.
- Wong J.L., Wessel Gary M. (2005). "Reactive oxygen species and Udx1 during early sea urchin development". *Developmental Biology*, 288: 317 – 333.



- Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A., Jenkins D.J. (2006). “Colonic health: fermentation and short chain fatty acids”. *J Clin Gastroenterol.*, 40: 235-243.
- Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs AB. (2002). “Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*”. *Food Chemistry*, 77: 9–13.
- Yaeshima T., Fujisawa T., Mitsuka T. (1992). “*Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *Pseudolongum* comb. nov and *Bifidobacterium pseudolongum* subs. *Globosum* comb. nov”. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 380-385.
- Yan S.D., Ster D., Schmidt A.M. (1997). “What's the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose”. *European Journal Of Clinical Investigation*, 27: 179-181.
- Yazawa K., Imai K., Tamura Z. (1978). “Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria”. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 26, 11: 3306-3311.
- Yazawa K., Nacajima A., Tamura Z. (1984). “Growth of bifidobacteria in adult intestines on oral administration of sugar sources phathetin and riboflavine”. *Bifidobacteria Microflora*, 3, 1: 43-49.
- Yildirim Z., Johnson M.G. (1998). “Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454”. *Journal of Food Protection*, 61: 47-51.
- Youdim K.A., Shukitt-Hale B., MacKinnon S., Kalt W., Joseph. J.A. 2000. “Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in vivo”. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1523 :117-122.
- Yu R-Q., Yuan J-L., Ma L-Y., Qin Q-X., Wu X-Y., (2013). “Probiotics improve obesity-associated dyslipidemia and insulin resistance in high-fat diet-fed rats”. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.*, 15, 12:1123-7.
- Zarate S., Lopez-Leiva M.H. (1990). “Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: a literature review”. *Journal of Food Protection*, 53: 262-268.
- Zhang C-W (1994). “Effect of polysaccharide and phycocyanin from *Spirulina* on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice”. *Proceeding of 2nd Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, China*: 58.

- Zhi-gang Z, Zhi-li L, Xue-xian L. (1997). “Study on the isolation, purification and antioxidation properties of polysaccharides from *Spirulina maxima*”. *Acta Botanica Sinica.*, 39: 77-81.
- Zhou I., Zhou S., Tang J., Zhang K., Guang L., Huang Y., Xu Y., Ying Y., Zhang L., Li D. (2009). “Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/ high-fat diet-induced diabetic rats”. *European Journal of Pharmacology*, 606 : 262–268.
- Zinedine A., Faid M. (2007). “Isolation and Characterization of Strains of *Bifidobacteria* with Probiotic Proprieties In vitro”. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2, 1 : 28-34.
- Zourari A., Desmazeaud M.J. (1991). “Caractirisation des bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisaaux grecs. II souches de *Lactobacillus delberueckii* subsp *bulgaricus* et cultures mixte avec *streptococcus salivarius thermophilus*”. *Lait*, 71 : 463-482.

## Annexe I : Composition des milieux de cultures

### Eau physiologique peptonée cystéiné g/L

Peptone	1
Cystine	2
NaCl	9
Eau distillée	1000 mL
pH 6.4 Autoclaver 20 min à 120 °C	

### Gélose MRS cystéiné g/L

Extrait de viande	8
Peptone	5
Extrait de levure	3
Acétate de sodium	5
Phosphate bi potassique	2
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	1
Sulfate de manganèse	0,05
Glucose	20
Carbonate de sodium	2
Chlorure de calcium	1
Cystéine chlorhydrate	0,5
Gentamycin	32-64 µg/ml
Agar	15
Eau distillée	1000 mL
pH 6.4 Autoclaver 20 min à 120 °C	

### Liquification de la gélatine g/L

Extrait de viande	10
Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Gélatine	150
pH 7,4- 7,6 Autoclaver à 112-115 °C/30min	

### Lait écrémé cystéiné g/L

Lait écrémé en poudre	120
Cystéine	0,5
pH 6,4 Autoclaver à 110 °C/10min	

### Composition du milieu N1

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	2 g
pH ajusté à 10	

### **Composition du milieu N2**

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	8 g
pH ajusté à 10	

### **Composition du milieu N3**

Eau distillée	100 mL ;
Bicarbonate de sodium :	15 g
pH ajusté à 10	

### **Composition du milieu solide pour isoler la spiruline**

Eau distillé :	1000 mL
Agar agar :	20 mg
Nitrate de sodium :	2,5 g
Glucose :	1g
Peptone :	1g
Le pH est ajusté à 10.	

### **Composition du milieu de Hiri (pour 1 L d'eau distillée)**

Bicarbonate de soude (NaHCO <sub>3</sub> )	16
Chlorure de sodium (NaCl)	1
Phosphate d'ammonium (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,1
Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> )	0,01
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	0,1
Sulfate de potassium (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,5
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	0,1
Urée azotée CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,1

## **Annexe II : Les tests d'identification**

### **Etude macroscopique**

Ce test consiste à une observation directe à l'œil nu des colonies obtenues sur milieu MRSc. Il permet de renseigner sur la forme, la taille, l'aspect, la consistance, l'opacité, le contour et la couleur des colonies étudiées.

Les colonies blanchâtres, rondes ou lenticulaires à contour régulier sont retenues.

### **Etude microscopique**

L'examen microscopique apparait comme la première étape de l'étude d'une bactérie. (Guiraud, 1998), il comprend :

#### **Etat frais**

Cet examen permet d'apprécier la forme et la mobilité des germes étudiés. Il faut éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec les mouvements de convection susceptibles de l'entraîner.

Il consiste à examiner les microorganismes vivants entre lame et lamelle. Une goutte de suspension bactérienne est déposée au centre de la lame, puis une lamelle déposée au-dessus en évitant la création des bulles d'air.

L'observation se fait par microscope optique aux grossissements (Gr : 100 .1,25 . 10 . 0,25)

### **Etude des caractères morphologiques (Coloration de Gram)**

#### **Coloration de Gram**

1. Réaliser un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne. on agite la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en le passant sous le bec benzène), on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de l'anse dans le tube à essai.
2. Déposer ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
3. La fixation du frottis soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.

4. La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.
5. Etaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
6. Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
7. Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

## **Etude des caractères biochimiques et physiologiques**

### **Recherche de la catalase**

La technique consiste à prélever une colonie fraîche et la déposer sur une lame propre, puis déposer sur cette colonie une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

### **Etude du type respiratoire**

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie préalablement régénérée au bain-marie bouillant pendant 20 minutes et lorsque la température est redescendue à 40 – 45 °C. Cet ensemencement est effectué soit à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale, soit en déposant à la surface du tube maintenu à 40°C la suspension de la bactérie à étudier.

Puis nous mélangeons, en faisant subir au tube, tenu verticalement, des mouvements en forme de 8.

Les tubes sont après 24h, refroidis à 37°C. La lecture consiste à étudier le niveau du tube où une croissance bactérienne est visible.

### **Le caractère homo ou hétérofermentaire**

Ce test consiste à différencier les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaire suite à la production de gaz (CO<sub>2</sub>).

La technique est basée sur l'utilisation d'une cloche de DURHAM ou une gélose blanche sur le bouillon MRS :

Des colonies fraîches sontensemencées sur le bouillon MRSc. Après inoculation, 4 mL de gélose blanche sont ajoutés dans chaque tube. Après refroidissement de la gélose, l'incubation est réalisée à 37°C pendant 48h.

Les homofermentaires se développent dans le milieu en utilisant le sucre sans production de gaz. Au contraire, les hétérofermentaires se manifestent par la montée du bouchon de la gélose.

Il également est possible d'utiliser le bouillon MRS muni d'une cloche de DURHAMensemencé par les cultures bactériennes. L'incubation est réalisée pendant 48 heures à 37°C.

Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas l'accumulation du gaz dans la cloche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire s'accumule au contraire, dans la cloche qui monte un peu plus haut.

### **Test mannitol mobilité**

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autre du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'ensemencement est effectué par pique centrale. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé.

Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la pique centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la pique centrale.

### **Test ONPG**

Il s'agit de la recherche d'une  $\beta$ -galactosidase qui dégrade le lactose en galactose et glucose. En pratique, ce test utilise l'ortho-nitro-phényl-galacto-pyranosie (ONPG). L'ONPG diffuse spontanément dans la bactérie et est dégradé par la  $\beta$ -galactosidase en galactose et

orthonitrophénol respectivement, qui sont des composés jaunes. Ce test est réalisé en mettant en contact une suspension bactérienne avec un disque d'ONPG, après mise à l'étuve à 37°C en anaérobiose pendant 18 heures.

### **Test Voges Proskrover Production d'acétoïne**

La voie Butylène –Glycol est identifiée indirectement par la recherche du métabolite intermédiaire, l'Acétoïne. Ce métabolite en présence de KOH est oxydé en diacétyl.

Une colonie est ensemencée sur le bouillon Clark et Lubs. Après une incubation pendant 24 h, deux réactifs VPI et VPII sont ajoutés dans chaque tube, et d'une agitation intense est réalisée.

#### **Lecture**

- Une coloration rouge violacée apparaît en surface : la réaction est VP +.

-Aucune réaction n'apparaît : la réaction est VP-

Après un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l' $\alpha$ -naphtol (VPI) en donnant un complexe rouge.

### **Test Rouge de méthyle (RM)**

Ce test Permet de mettre en évidence les grandes quantités d'acides produites par les bactéries qui n'empruntent pas la voie Butylène-Glycol. L'acidification du milieu est révélée par l'addition d'un indicateur de pH (le rouge de méthyle) au milieu où auraient poussé les bactéries.

Le milieu utilisé est celui de CLARK et LUBS, qui permet de mettre en évidence la dégradation de l'Acide pyruvique par la formation d'acide acétique et formique en aérobiose et en anaérobiose : réaction au rouge méthyle.

En fait, 1 mL de milieu de culture est ensemencé sur bouillon Clark et Lubs et est incubé à 37°C en anaérobiose pendant 24h. Après incubation, quelques gouttes du réactif RM sont ajoutées.

#### **Lecture :**



- Si le milieu prend une coloration rouge, son pH est <4,4 : la réaction est RM +.
- Si le milieu reste jaune, son pH est > 6 : la réaction est RM -.

### **Test Indole (recherche de l'uréase)**

La recherche de l'uréase est un élément important pour les germes qui utilisent l'urée comme source d'azote.

La recherche de l'uréase s'effectue par culture sur milieu Urée- Indole qui contient, en plus du tryptophane, de l'urée et un indicateur de pH : le rouge de phénol (rouge à pH alcalin et jaune à pH acide).

Une colonie Ensemencée par une anse de platine dans le milieu Urée-Indole est incubée à 37°C en anaérobiose pendant 24 h.

#### **Lecture :**

Si la bactérie possède une uréase et hydrolyse l'urée contenue dans le milieu, la production de NH<sub>3</sub> alcalinise le milieu et fait virer l'indicateur au rouge violacé.

### **Recherche de la citratase**

Le milieu utilisé est le Citrate de Simmons, ne contenant qu'une seule source de carbone (citrate). Seules les bactéries possédant un citrate perméase sont capables de se développer.

L'utilisation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu lorsque la dégradation est complète et en aérobiose, suivant la réaction suivante :



L'alcalinisation est observée par le virage de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol, du vert au bleu « lagon ».

La pente de la gélose est ensemencée selon une strie longitudinale à l'aide d'une anse de suspension bactérienne réalisée en eau stérile ou, en stries serrées à l'aide d'une pipette Pasteur trompée dans la même suspension, jusque dans le culot, suite à une incubation à 37°C en anaérobiose.

## **Etude de l'activité protéolytique "test de fermentation du lait écrémé"**

L'aptitude à la protéolyse des caséines du lait des différentes espèces est recherchée sur lait écrémé.

L'appréciation de l'activité protéolytique se fait par l'apparition d'un coagulum de à l'hydrolyse de la caséine (Badis et *al.*, 2004).

La technique consiste à prélever une colonie dans 6 mL du lait écrémé avec une incubation à 37°C pendant 48h en anaérobiose et cela avec une couche d'huile de paraffine.

### **Recherche de la Décarboxylase**

La décarboxylase des acides aminés libère le groupe carboxyle sous forme de CO<sub>2</sub> et une amine.

La fermentation du glucose entraîne une importante baisse de pH. La production, ainsi que l'activité des décarboxylases et de l'ADH seront favorisées par un pH acide.

D'autre part la lecture de l'alcalinisation nécessite une anaérobiose relative :

-Une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac

-Une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu.

La technique consiste àensemencer le milieu de Moeller avec une goutte de suspension, agiter, recouvrir par vaseline stérile, fermer le tube entièrement afin de créer une anaérobiose relative. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

### **Liquéfaction de la gélatine**

Ensemencement par piqure centrale d'un tube contenant de la gélatine (annexe I) et incubation à 37°C pendant 48h en anaérobiose.

### **Fermentation des sucres**

Les tests de fermentation sont réalisés en utilisant le MRSc sans sucre, additionné de 0,4% d'un indicateur de coloration, le bleu de bromotémol. Les sucres sous forme de

solutions stériles sont ajoutés aseptiquement au milieu de culture à raison de 1%. Ce dernier estensemencé avec 1% de la suspension bactérienne.

Les sucres utilisés pour l'identification des espèces sont les suivants : Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Mannitol, Galactose, Maltose, Mannose, Cellobiose, Levulose, Salicine, Glycine, Xylose, Sorbose, Rhamnose, . La fermentation des sucres se manifeste par un virage de couleur du rouge au jaune.

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'ajout d'une couche d'huile de paraffine à la surface et l'incubation se fait dans des conditions optimales 37°C, pendant 48h.

Le milieu vire au jaune suite à l'acidification du milieu qui traduit la fermentation du sucre testé.

## **Les analyses microbiologiques sur la spiruline**

### **La préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique (N° 01.98.51)**

Préparation de la suspension-mère de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.

Préparation, si nécessaire de dilutions décimales qui permettent, après ensemencement et incubation des milieux de culture :

**Dans le cas des boîtes**, il faut effectuer un dénombrement valable des colonies (existence de boîtes comportant entre 30 et 300 colonies et pour certains groupes, tels les coliformes, entre 15 et 150 colonies).

**Dans le cas des tubes**, il faut disposer d'un nombre suffisant de tubes montrant un développement bactérien et des tubes sans culture, de manière à ce que le calcul du nombre le plus probable à l'aide des tables, puisse être réalisé.

Les prises d'essai sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de deux facteurs essentiels à savoir :

- Le nombre de pièces soumises à l'analyse
- Les opérations analytiques à conduire

## **Suspension mère et dilutions décimales**

Introduire aseptiquement 10 grammes de produit à analyser dans un sachet stérile de type « Stomacher » contenant au préalable 90 mL de diluant soit le TSE (tryptone sel eau),- Homogénéiser. Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/10 ou  $10^{-1}$ .

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la DM dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant. Cette dilution est alors au 1/100 ou  $10^{-2}$ .

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la dilution  $10^{-2}$  dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant ; cette dilution est alors au 1/1000 ou  $10^{-3}$ .

## **Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (NF V 08-051, 2003)**

La Flore Mésophile Aérobie Totale est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit. Ce dénombrement se fait en milieu solide (PCA) après incubation en aérobiose à 30 °C.

### **❖ Principe**

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture (PCA), coulé dans une boîte de pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres boîtes avec des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère. Incubation des boîtes s'effectue à 30°C, en aérobiose pendant 72h.

A partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de pétri retenues, nous calculons le nombre de microorganismes par mL ou par gramme de l'échantillon analysé.

### ❖ **Lecture et dénombrement**

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse. Il s'agit de compter les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.

### **Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux-méthode par comptage des colonies (ISO 4832, 2006)**

#### ❖ *Principe*

Préparation de trois boîtes de Pétri, en utilisant un milieu VRBL et une quantité spécifiée de suspension mère.

Incubation des boîtes à 30 °C ou 37 °C pendant 24 h et Comptage des colonies caractéristiques.

Le calcul du nombre de coliformes par millilitre est réalisé à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boîte de Pétri.

#### ❖ **Dénombrement**

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes de Pétri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies.

Procéder au comptage des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0,5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

### **Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices (XPV 08-601, 2005)**

#### ❖ **Principe**

Ensemencement en profondeur du milieu gélosé tryptose sulfite à la cyclosérine exempt de jaune d'œuf, coulé dans une boîte de Pétri ou dans un tube, avec une quantité déterminée de la suspension-mère.

Recouvrement avec une couche du même milieu lorsque l'essai est effectué en boîte de Pétri.

L'incubation des boîtes se fait à 46 °C en anaérobiose pendant 20 h ± 2 h suivie à dénombrement des colonies caractéristiques (entourées d'un halo noir).

#### ❖ **Comptage des colonies**

Choisir la ou les tubes contenant moins de 30 colonies caractéristiques et moins de 100 colonies au total et compter les colonies caractéristiques.

#### **Recherche des *Staphylococcus aureus* (NF V 08-052)**

Ensemencement en surface d'un milieu de culture gélose sélectif Chapman, coulé dans une boîte de Pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

L'incubation des boîtes est à 37 °C, en aérobiose pendant 24h à 48h.

Le calcul du nombre de staphylocoques par mL ou par gramme d'échantillon se fait à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilutions donnant un résultat significatif.

#### ❖ **Lecture**

Seront considérés comme positives, les boîtes contenant des colonies caractéristiques à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide.

#### **Dénombrement des levures et moisissures ; technique par comptage des colonies à 25°C (C.A.C.Q.E. N° 01-97-61)**

#### ❖ **Principe**

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif déterminé sabouraud, coulé dans trois boîtes de Pétri, avec une quantité définie de l'échantillon pour essai, si le produit est liquide, ou de la suspension mère pour les autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales des autres boîtes, obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère. Incubation de ces boîtes en aérobiose à 25° C pendant 3, 4 ou 5 jours.

Calcul du nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif.

#### ❖ Lecture

Compter les colonies sur chaque boîte après 3,4 et 5 jours d'incubation. Après 5 jours, retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, retenir les comptages obtenus après 4, ou même 3 jours d'incubation.

#### ❖ Expression des résultats

Le nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre est égal à :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

**C** : est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées;

**n<sub>1</sub>** : est le nombre de boîtes comptées à la première dilution;

**n<sub>2</sub>** : est le nombre de boîtes comptées à la seconde dilution;

**d** : est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus.

Le résultat doit être exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10<sup>x</sup>, x étant la puissance appropriée de 10.

### **Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (ISO 6579, 2002)**

#### ❖ Principe

La recherche de *Salmonella* nécessite trois phases successives.

- *Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide*

Ensemencement de la prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée à température ambiante, puis incubation à 37<sup>0</sup>C ± 1<sup>0</sup>C pendant 18 h ± 2 h.

- *Enrichissement en milieux sélectifs liquides*

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) et d'un bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture obtenue ci-dessus. Incubation du bouillon RVS à  $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  et du bouillon MKTTn à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

- *Isolement et identification*

A partir des cultures obtenues, ensemencement de deux milieux sélectifs solides :

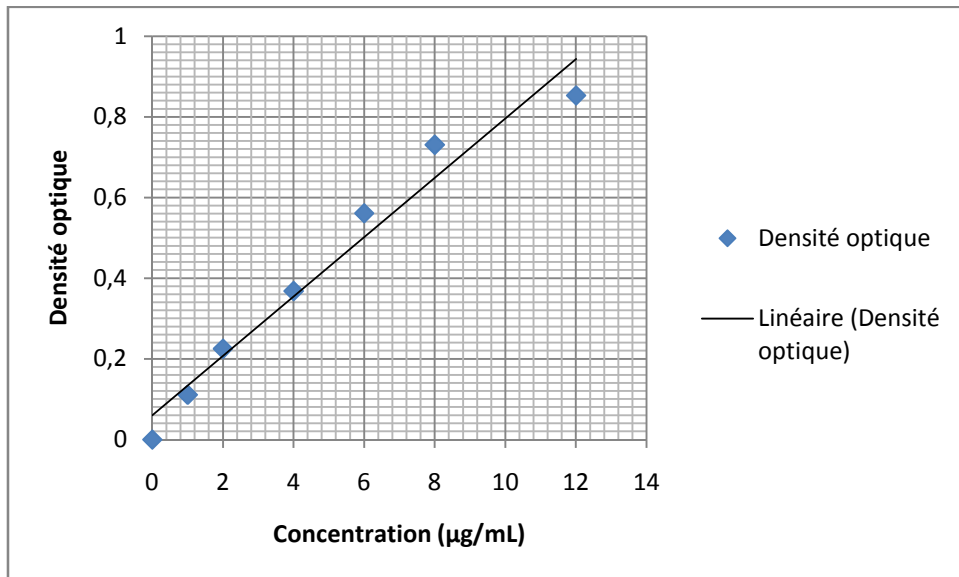
- Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD).
- Un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélose XLD permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

Incubation du milieu gélose XLD à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  puis examen après  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

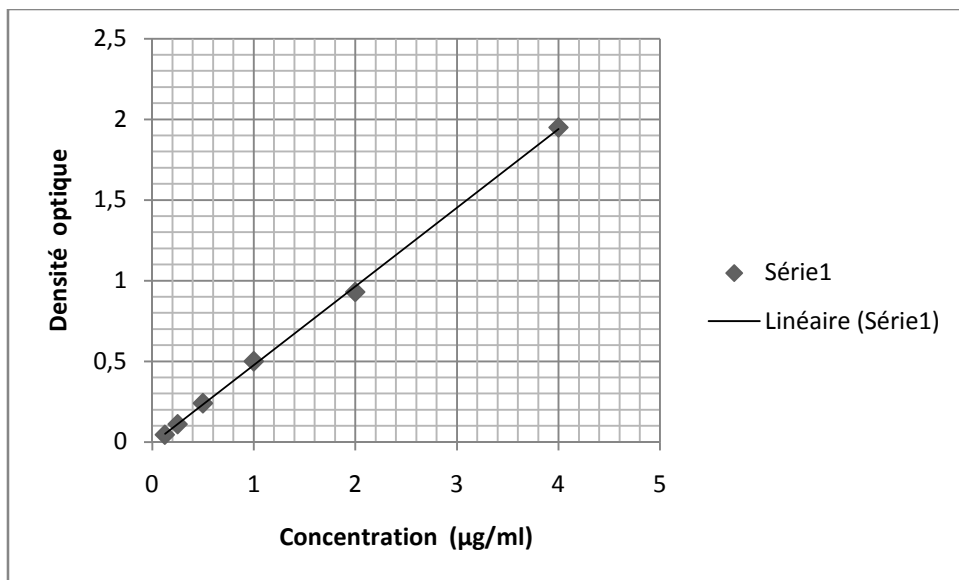
Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.



### Annexe III : Courbe d'étalonnage des sucres pour dosage de glucose (anthron)



### Annexe IV : Courbe d'étalonnage acide gallique



## **Annexe V : Titrage (acidité Dornic )**

Le matériel nécessaire est le suivant : un statif avec noix et pince, une fiole conique de 100 mL, une solution de NaOH N/9, une burette de 25 mL, une solution de phénolphthaléine à 1% dans éthanol. Remplir la burette de la solution de NaOH N/9. Régler le niveau au du liquide à zéro. Prélever 1 mL de la culture testé et transférer dans un bécher. Ajoute quelque goutte de phénolphthaléine et titrer jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante. Noter le volume de solution titrant utilisé en dixièmes de millilitres. Nombre de dixièmes de millilitre de NaOH=1°D.

Les résultats sont exprimés selon la relation :

$$\text{Acidité} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

$V_{\text{NaOH}}$  : Volume de la souche coulé pour neutraliser l'acidité (Bourgeois et al., 1996).

## **Annexe VI : Les paramètres biochimiques**

### **Dosage des protéines**

En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur violette/bleue en présence de sels de cuivre; ces sels contiennent du iodure qui agit comme un antioxydant.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé

### **Dosage du cholestérol total**

Principe du test : Le cholestérol est présent dans le sérum sous la forme d'esters de cholestérol et de cholestérol libre. Les esters de cholestérol présents dans le sérum sont hydrolysés par la cholestérol-esterase puis le cholestérol est mesuré en l'oxydant avec la cholestérol-oxydase pour produire du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène à son tour réagit avec le phénol et le 4-amino-antipyrine en présence de la peroxydase pour produire la quinoneimine à coloration rouge. L'intensité de la coloration produite est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon.

### **Dosage du HDL-cholestérol**

Principe du test : Les LDL sont précipités par addition de l'acide phosphotungstique en présence des ions magnésium. La fraction HDL reste dans le surnageant et est déterminée par le dosage du cholestérol.

### **Dosage des triglycérides**

Principe du test : Les triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase pour donner le glycérol et des acides gras. Puis, par l'action successive de la glycérol kinase en présence de  $Mg^{2+}$  et de la glycérol phosphatase en présence d'ATP, le glycérol est convertit en dihydroxyacétone phosphate et peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène à son tour réagit avec le chlorophénol et le 4-amino-antipyrine en présence de la peroxydase pour produire le 4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone coloré. L'intensité de la coloration produite est directement proportionnelle à la concentration de triglycérides dans l'échantillon.

### **Dosage de la créatinine**

Principe du test : La créatinine réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin pour former un complexe jaune intense. La quantité de complexe formé est directement proportionnelle au taux de créatine dans l'échantillon.

## Annexe VII : les résultats statistiques

### Rendement des extraits de *Spirulina platensis* par différents solvant

Rendement= (poids d'extrait /poids prise d'essai) \*100

	blon vide	prise d'essai	ballon avec l'extrait	Extrait g	Rendement %
Extrait 1	165,119	2	165,92	0,801	40,05
Extrait 2	143,718	2	144,304	0,586	29,3
Extrait 3	151,831	2	152,104	0,273	13,65
Extrait 4	145,877	2	146,15	0,273	13,65
Extrait 5	142,2	2	142,52	0,320	16

### Détermination de la teneur des polyphénols par Mg AG/g d'extrait sec

	Essai1	Essai2	Essai3	y= 0,4835x			g AG/g	Variance	Ecart type
Extrait 1	1,5	1,5	1,493	1,4075	1,4075	1,401655	1,406	0,002	0,003
Extrait 2	2,16	1,97	1,896	1,9586	1,79995	1,73816	1,832	0,126	0,089
Extrait 3	1,982	2,023	2,018	1,80997	1,844205	1,84003	1,831	-0,021	0,015
Extrait 4	1,882	1,743	1,871	1,72647	1,610405	1,717285	1,685	0,042	0,053
Extrait 5	1,46	1,89	1,98	1,3741	1,73315	1,8083	1,639	-0,264	0,187

### Activités antioxydantes du BHT et du Vitamine C

BHT	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai 1	0,168	0,191	0,286	0,37
Essai 2	0,17	0,195	0,28	0,369
Essai 3	0,166	0,196	0,285	0,371
N	3	3	3	3
Moyenne	0,168	0,194	0,284	0,37
Variance	4E-06	7E-06	1,05E-05	0,000001
Ecart type	0,002000	0,002646	0,003240	0,001000
Vit C	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai 1	0,213	0,247	0,341	0,446
Essai 2	0,212	0,234	0,336	0,447
Essai 3	0,215	0,249	0,334	0,448
N	3	3	3	3
Moyenne	0,213	0,243	0,337	0,447
Variance	0,031501944	6,6333E-05	0,000013	0,000001
Ecart type	0,177488	0,008145	0,003606	0,001000

### Activités antioxydantes des différents extraits de *Spirulina platensis*

Extrait 1	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai 1	0,329	0,398	0,415	0,459
Essai 2	0,331	0,402	0,408	0,426
Essai 3	0,333	0,407	0,417	0,434
N	3	3	3	3
Moyenne	0,331	0,402	0,413	0,440
Variance	4E-06	2,0333E-05	2,23333E-05	0,000296333
Ecart type	0,002000	0,004509	0,004726	0,017214
Extrait 2	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai 1	0,302	0,366	0,413	0,471
Essai 2	0,304	0,356	0,421	0,475
Essai 3	0,309	0,381	0,46	0,468
n	3	3	3	3
Moyenne	0,305	0,368	0,431	0,471
Variance	0,000013	0,000158333	0,000632333	1,23333E-05
Ecart type	0,003606	0,012583	0,025146	0,003512
Extrait 3	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai1	0,304	0,374	0,37	0,417
Essai 2	0,305	0,367	0,38	0,419
Essai 3	0,292	0,369	0,388	0,416
n	3	3	3	3
Moyenne	0,300	0,370	0,379	0,417
Variance	5,2333E-05	0,000013	8,13333E-05	2,3333E-06
Ecart type	0,007234	0,003606	0,009018	0,001528
Extrait 4	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai 1	0,39	0,4	0,405	0,399
Essai 2	0,389	0,394	0,403	0,407
Essai 3	0,388	0,385	0,402	0,414
N	3	3	3	3
Moyenne	0,389	0,393	0,403	0,407
Variance	0,000001	5,7E-05	2,33333E-06	5,6333E-05
Ecart type	0,001000	0,007550	0,001528	0,007506
Extrait 5	100µg/ml	75µg/mL	50µg/ml	25µg/mL
Essai 1	0,349	0,417	0,425	0,44
Essai 2	0,342	0,409	0,413	0,42
Essai 3	0,33	0,4112	0,412	0,43
N	3	3	3	3
Moyenne	0,340	0,412	0,417	0,430
Variance	9,2333E-05	0,00001708	5,2333E-05	0,0001
Ecart type	0,009609	0,004133	0,007234	0,010000

**Résultats de l'effet antimicrobiens des extraits de *S. platensis* vis-à-vis des bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853**

					les écarts type de l'extrait 1 à concentration de 10mg/ml				
	E.coli	Staph	Pseudo		N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Extrait 1	25	25	24	E.coli	2	24,0	23,0	25	1,414
	23	24	22	Staph	2	24,5	24,0	25	0,707
				Pseudo	2	23,0	20,0	22	1,414
	E.coli	Staph	Pseudo		N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Extrait 2	22	25	23	E.coli	2	21,0	20,0	22,0	1,414
	20	23	22	Staph	2	24,0	23,0	25,0	1,414
				Pseudo	2	22,5	22,0	23,0	0,707
	E.coli	Staph	Pseudo		N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Extrait 3	21	26	24	E.coli	2	21,50000	21,00000	22,00000	0,707107
	22	25	23	Staph	2	25,50000	25,00000	26,00000	0,707107
				Pseudo	2	23,50000	23,00000	24,00000	0,707107
	E.coli	Staph	Pseudo		N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Extrait 4	26	25	23	E.coli	2	25,50000	25,00000	26,00000	0,707107
	25	24	24	Staph	2	24,50000	24,00000	25,00000	0,707107
				Pseudo	2	23,50000	23,00000	24,00000	0,707107
	E.coli	Staph	Pseudo		N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Extrait 5	24	24	23	E.coli	2	24,5	24,00000	25,00000	0,707107
	25	22	24	Staph	2	23	22,00000	24,00000	0,707107
				Pseudo	2	23,5	23,00000	24,00000	0,707107

**Essai *In vivo* sur l'effet antioxydant de *Spirulina platensis* en association avec *bifidobacterium breve* sur le diabète**

**Dosage de la glycémie**

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
1,25	26	26	0	26	1,399	0,599

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	0,998
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	0,997
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,995
SCR	0,031

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables (H0 = Y=Moy(Y)) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	8	8,945	1,118	613,482	< 0,0001
Résidus	17	0,031	0,002		
Total	25	8,976			

Paramètre du modèle

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	1,215	0,030	40,249	< 0,0001	1,151	1,279
GI-GI	0,000	-	-	-	-	-
GI-GII	1,772	0,039	45,460	< 0,0001	1,689	1,854
GI-GIIIa	0,278	0,039	7,142	< 0,0001	0,196	0,361
GI-GIIIb	-0,035	0,039	-0,898	0,382	-0,117	0,047
GI-GIIIc	-0,065	0,039	-1,668	0,114	-0,147	0,017
GI-GIIId	-0,198	0,039	-5,089	< 0,0001	-0,281	-0,116
GI-GIIIe	-0,002	0,039	-0,043	0,966	-0,084	0,081
GI-GIIIf	-0,038	0,039	-0,984	0,339	-0,121	0,044
GI-GIIIg	-0,115	0,039	-2,951	0,009	-0,197	-0,033

**Effet du lait infantile 1<sup>er</sup> âge (GUIGOZ I) enrichi par *Spirulina platensis* et *Bifidobacterium breve***

**Evolution de la glycémie chez les rats diabétiques et témoins**

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
0,97	17	17	0	17	1,470	0,844

Coefficients d'ajustement

R (coefficient de corrélation)	0,999
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	0,998
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,997
SCR	0,026

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables (H0 = Y=Moy(Y))

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	11,374	2,275	973,009	< 0,0001
Résidus	11	0,026	0,002		
Total	16	11,400			

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	0,935	0,034	27,347	< 0,0001	0,860	1,010
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	2,295	0,044	51,995	< 0,0001	2,198	2,392
Lot T-Lot Dtm	0,178	0,044	4,040	0,002	0,081	0,275
Lot T-Lot DBf	0,252	0,044	5,702	0,000	0,155	0,349
Lot T-Lot DS10	0,198	0,044	4,493	0,001	0,101	0,295
Lot T-Lot DBf+S10	0,108	0,044	2,454	0,032	0,011	0,205



## Dosage des paramètres biochimiques chez les rats diabétiques et témoins

### Protéines

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
82,22	17	17	0	17	79,918	2,052

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	0,993
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	0,986
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,979
SCR	0,958

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables (H0 = Y=Moy(Y)) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	66,445	13,289	152,601	< 0,0001
Résidus	11	0,958	0,087		
Total	16	67,403			

Paramètres du modèle

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	81,935	0,209	392,660	< 0,0001	81,476	82,394
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	-6,012	0,269	-22,316	< 0,0001	-6,605	-5,419
Lot T-Lot Dtm	-2,062	0,269	-7,653	< 0,0001	-2,655	-1,469
Lot T-Lot DBf	-1,635	0,269	-6,069	< 0,0001	-2,228	-1,042
Lot T-Lot DS10	-1,432	0,269	-5,315	0,000	-2,025	-0,839
Lot T-Lot DBf+S10	-0,288	0,269	-1,070	0,307	-0,881	0,305

### Créatinine

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
0,58	17	17	0	17	0,782	0,124

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	0,972
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	0,945
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	0,920
SCR	0,014

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ( $H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$ ) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	0,234	0,047	37,877	< 0,0001
Résidus	11	0,014	0,001		
Total	16	0,247			

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	0,515	0,025	20,726	< 0,0001	0,460	0,570
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	0,408	0,032	12,729	< 0,0001	0,338	0,479
Lot T-Lot Dtm	0,362	0,032	11,274	< 0,0001	0,291	0,432
Lot T-Lot DBf	0,262	0,032	8,157	< 0,0001	0,191	0,332
Lot T-Lot DS10	0,242	0,032	7,534	< 0,0001	0,171	0,312
Lot T-Lot DBf+S10	0,238	0,032	7,430	< 0,0001	0,168	0,309

## Triglycérides

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
63,17	17	17	0	17	102,675	43,654

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	1,000
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	1,000
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	1,000
SCR	4,746

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ( $H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$ ) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	30486,335	6097,267	14130,944	< 0,0001
Résidus	11	4,746	0,431		
Total	16	30491,081			

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	63,065	0,464	135,775	< 0,0001	62,043	64,087
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	129,335	0,600	215,687	< 0,0001	128,015	130,655
Lot T-Lot Dtm	26,058	0,600	43,457	< 0,0001	24,739	27,378
Lot T-Lot DBf	29,048	0,600	48,443	< 0,0001	27,729	30,368
Lot T-Lot DS10	20,988	0,600	35,001	< 0,0001	19,669	22,308
Lot T-Lot DBf+S10	19,028	0,600	31,733	< 0,0001	17,709	20,348

## Cholestérol totale

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
79,99	17	17	0	17	87,559	12,424

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	1,000
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	1,000
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	1,000
SCR	0,500

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables (H0 = Y=Moy(Y)) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	2469,317	493,863	10858,120	< 0,0001
Résidus	11	0,500	0,045		
Total	16	2469,818			

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	80,195	0,151	531,785	< 0,0001	79,863	80,527
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	31,855	0,195	163,622	< 0,0001	31,426	32,284
Lot T-Lot Dtm	9,028	0,195	46,374	< 0,0001	8,600	9,457
Lot T-Lot DBf	4,908	0,195	25,211	< 0,0001	4,480	5,337
Lot T-Lot DS10	-2,992	0,195	-15,367	< 0,0001	-3,420	-2,563
Lot T-Lot DBf+S10	-1,068	0,195	-5,487	0,000	-1,497	-0,640

## LDL

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
26,73	17	17	0	17	40,048	24,614

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	1,000
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	1,000
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	1,000
SCR	0,446

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ( $H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$ ) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	9692,946	1938,589	47819,885	< 0,0001
Résidus	11	0,446	0,041		
Total	16	9693,392			

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	26,530	0,142	186,343	< 0,0001	26,217	26,843
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	64,997	0,184	353,625	< 0,0001	64,592	65,401
Lot T-Lot Dtm	0,770	0,184	4,189	0,002	0,365	1,175
Lot T-Lot DBf	4,677	0,184	25,444	< 0,0001	4,272	5,081
Lot T-Lot DS10	3,590	0,184	19,532	< 0,0001	3,185	3,995
Lot T-Lot DBf+S10	2,570	0,184	13,983	< 0,0001	2,165	2,975

HDL

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Nbr. de valeurs ignorées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
45,33	17	17	0	17	42,966	9,937

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	1,000
R <sup>2</sup> (coefficient de détermination)	1,000
R <sup>2</sup> aj. (coefficient de détermination ajusté)	1,000
SCR	0,462

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ( $H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$ ) :

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	1579,319	315,864	7527,354	< 0,0001
Résidus	11	0,462	0,042		
Total	16	1579,780			

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	t de Student	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	45,175	0,145	311,878	< 0,0001	44,856	45,494
Lot T-Lot T	0,000	-	-	-	-	-
Lot T-Lot DT	22,835	0,187	-122,113	< 0,0001	-23,247	-22,423
Lot T-Lot Dtm	2,955	0,187	15,802	< 0,0001	2,543	3,367
Lot T-Lot DBf	4,255	0,187	22,754	< 0,0001	3,843	4,667
Lot T-Lot DS10	2,258	0,187	12,077	< 0,0001	1,847	2,670
Lot T-Lot DBf+S10	0,848	0,187	4,537	0,001	0,437	1,260