

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires**

Département des Sciences Agronomiques

**MEMOIRE DE MAGISTER**

en Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

ETUDE DE LA SPIRULINE COMME ALIMENT FONCTIONNEL, NOURRISSANT  
LA FLORE INTESTINALE : INFLUENCE *IN VITRO* DE LA SPIRULINE SUR LA  
CROISSANCE DES BIFIDOBACTERIES

Par

**Imene HAMOUDA HAMOUDA ALI**

Devant le jury composé de:

Mme BEN RIMA A.	Prof. U.S.D. Blida	Présidente
Mme DOUMANDJI A.	MCA. U.S.D. Blida	Promotrice
Mme BENHADJA L.	MCA. U.S.D. Blida	Co-Promotrice
Mme HADJ ZIANE A.	MCA U.S.D. Blida	Examinatrice
M. HADJ SADOK T.	MCB U.S.D. Blida	Examineur

Blida, Février 2012

## REMERCIEMENTS

Ce travail est l'œuvre non seulement de mon effort mais aussi le fruit de la volonté et l'amour de notre Dieu tout Puissant envers qui j exprime ma grande reconnaissance du souffle de vie qu'il m a donné et la grâce de passer mes études à l'USB.

Je ne peux pas passer sans dire grand merci a ma chère maman qui malgré ses tâches a été a même de se sacrifier pour que je puisse finir mes études en bon terme malgré mes caprices grandissantes.

Au terme de cette initiation a l'écriture scientifique, je tiens à remercier tous mes formateurs tant du primaire, du secondaire que du supérieur en général et du département d'agronomie de l'université de Blida en particulier.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de mémoire Dr. DOUMANDJI Amel, qui a su me faire bénéficier de son expérience et de sa compétence. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée en m'accordant une grande autonomie. Merci pour vos bons conseils et votre grande disponibilité tout au long de mes expérimentations

Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements au Dr. BOUTEKRABT L., pour son aide, ses conseils et son soutien moral.

J'exprime mes respectueux dévouements au Prof. GUENDOZ A., du Département d'Agronomie de l'Université de Blida, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider la commission d'examen de cette thèse.

Que Dr. HADJ SADOK T. et Dr. HADJ ZIANE A., trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer au jugement de cette thèse.

Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements à Monsieur OUELD HOSSIN Kamel, Chef laboratoire des fraudes de la wilaya de Tissemsilt, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire.

Je tiens à remercier tous mes collègues de laboratoire pour avoir su m'écouter, m'encourager et me soutenir tout au long de cette grande aventure.

A Monsieur NOUANI Abdelouahab Université de M. Mammeri de Tizi Ouzou, j'adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude pour son aide.

Je voudrai remercier du plus profond de mon cœur, ma collègue Melle HAMDANI Samia pour son soutien moral.

Je remercie de tout mon cœur ma famille pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études

Enfin, que tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de ma profonde sympathie.

## **DEDICACE**

**A tous ceux qui me sont chers en ce monde, je dédie ce travail:**

**Avec une attention particulière à mon père disparu trop tôt, tu n as pu me voir grandir mais tu restes toujours dans mon cœur. J'espère que là ou tu es, fier de moi,**

**A ma mère**

**Merci de m'avoir offert ton lait pendant des très nombreux mois, qui en plus des bienfaits qu'il m'apporte à renforcé mes biens. Tu m'as toujours encouragé et cru en moi.**

**À ma grand-mère, pour sa gentillesse, son affection, sa douceur, sa tendresse, ses encouragements éternels.**

**A toute ma famille**

**A tout mes amies de la promo Nutrition et transformation d'aliment 2009 – 2011**

## Résumé

La spiruline confirme son rôle d'alicament, sa valeur nutritive exceptionnelle présente un intérêt thérapeutique non négligeable. Elle possède un effet sur la flore intestinale. Cette étude a pour but de démontrer l'influence de la spiruline sur la croissance des bifidobactéries.

Après une enquête préliminaire conduit, auprès d'une quatorzaine de nourrissons hospitalisés à l'hôpital de Tissemsilt, qui a permis d'étudier l'évolution de la microflore colique aux différentes étapes de l'allaitement du nourrisson. Une dominance des bifidobactéries de l'ordre de  $9,32 \pm 0,45$  Log UFC/ mL chez les nourrissons sous allaitement maternel, alors que chez les nourrissons sous allaitement mixte et artificiel sont présentes en moins nombre ( $8,81 \pm 0,99$  Log UFC /mL) et ( $8,45 \pm 0,36$  Log UFC /mL) respectivement. Les enfants étaient âgés de 56,6 jours, avec une prédominance féminine de la flore colique. Le type d'accouchement influe aussi sur l'évolution de la flore colique, avec une prédominance de bifidobactéries chez les nourrissons nés par voie basse ( $8,98 \pm 0,20$  Log UFC/mL) alors que chez les nourrissons nés par césarienne les bifidobactéries représentent  $8,07 \pm 0,35$  Log UFC / mL. La population la plus diarrhéique est leur âge moyen est inférieur à 04 mois.

14 souches bifides ont été isolées à partir des selles de nourrissons sous différents types d'allaitement. Grâce à l'identification biochimique et l'activité antimicrobienne nous avons retenue deux souches bifides. La spiruline a révélé un taux de protéines important soit  $56,2 \pm 0,54$  g/L, au terme de l'étude l'enrichissement du lait infantile 1<sup>er</sup> âge avec la spiruline en raison de 3 g /L a amélioré significativement le pouvoir acidifiant de la souche bifide B16 ( $\Delta$  pH = 1,68) après 24 h de fermentation, accélère son taux de croissance de 0,56 à 1,82 h<sup>-1</sup> et réduit le temps de génération de 1,79 à 0,55 h. alors que la souche bifide B1 présente un pouvoir acidifiant de 1,86 après 24 de fermentation lorsqu'elle est ensemencé sur le lait infantile 1<sup>er</sup> âge avec un taux de croissance de 1,82 h<sup>-1</sup> et un temps de génération de 0,16 h.

**Mots clés:** *Bifidobacterium* sp, spiruline, lait infantile, croissance, pouvoir acidifiant.

## Abstract

*Spirulina* confirms its role as a nutrient, its exceptional nutritional value has a significant therapeutic interest. It has an effect on the intestinal flora. This study is intended to demonstrate the influence of *Spirulina* on the growth of *Bifidobacterium*.

After a preliminary inquiry with fourteen hospitalized infants, at Tissemsilt hospital, which was used to study the evolution of the colic microflora at different stages of infant feeding. With a dominant of *Bifidobacteria* in the range of ( $9,32 \pm 0,45$  Log UFC/ mL) at the infants under breast feeding, while infants in the mixed feeding and artificial are present in less number ( $8,81 \pm 0,99$  Log UFC /mL) and ( $8,45 \pm 0,36$  Log UFC /mL) respectively. The average age of the population, it was 56,5 days, with a female predominance of the colic flora. The type of birth also affects the evolution of the colic flora. With a predominance of bifidobacteria in infants born with vaginally way ( $8,98 \pm 0,20$  Log UFC / mL), while in infants born by caesarean, the bifidobacteria represent  $8,07 \pm 0,35$  Log UFC / mL.

Fourteen strains of *Bifidobacteria* were isolated from the stools of infants from different types of feeding. Using biochemical identification and antimicrobial activity we selected two strains bifid. The *Spirulina* has a protein levels revealed a significant  $56,2$  g/L  $\pm 0,54$ , at the end of the study, the enrichment of the first age infant formula with *Spirulina* due to  $3$  g/L significantly improved the acidifying power of the strain B16 bifid ( $\Delta$  pH = 1,68) after 24 h of fermentation, accelerating its growth rate from  $0,56$  to  $1,82$  h<sup>-1</sup> and reduces the generation time from 1,79 to 0,55 h. while strain B1 shows a bifid acidifying power of 1,86 after 24 of fermentation when it inoculated into the first age infant formula with a growth rate of  $1,82$  h<sup>-1</sup> and a generation time of 0,16 h.

**Keywords:** *Bifidobacterium* sp, *Spirulina*, infant formula, growth, acidifying power.

## ملخص

السيبرولينا تؤكد دورها بوصفها أليكمينت ، ذات قيمة غذائية استثنائية لديها مصلحة كبيرة علاجية .لديها ايضا تأثير على الجراثيم المعوية.تهدف هذه الدراسة إلى إظهار تأثير السيبرولينا على نمو bifidobacteria

بعد التحقيق الأولي على اربعة عشر رضيع في مستشفى تيسمسيلت ، والتي كانت تستخدم لدراسة تطور البكتيريا القولونية في مراحل مختلفة من تغذية الرضع. وقد الى غلبة bifidobacteria في حدود واصطناعية موجودة بنسبة اقل (8,45 ± 0,36 Log UFC /mL) et (8,81 ± 0,99 Log UFC /mL) على التوالي .كان متوسط عمر الأطفال 56.6 يوما ، مع غلبة bifidobacteria عند جنس الإناث للبكتيريا القولونية. وقد تم عزل اربعة عشر (14) سلالة bifide من براز الرضع ذو أنواع مختلفة من الترضيع .وبفضل الاختبارات البيوكيميائية و دراسة الأنشطة المضادة للميكروبات قد تم الاحتفاظ بسلالتين B<sub>16</sub> و B<sub>1</sub> bifide .

وقد أظهرت التحليلات الفيزيائية والكيميائية لسيبرولينا بأنها البروتينات تمثل نسبة معتبرة 56,2 غرام / لتر 0.54 ±. في نهاية هذه الدراسة في اثناء حليب الاطفال لسن الاولي بالسيبرولينا بمقدار 3 جرام/ل قد حسن بشكل ملحوظ قدرة الحموضة لسلسلة B16 bifide (Δ pH = 1,68), بعد 24 ساعة من التخمر وايضا قد سرع في معدل النمو من 0,56 الى 1,82 سا<sup>-1</sup> , وقد خفض من وقت الجيل من 1,97 الى 0,55 سا. بينما السلالة B1 اظهرت قدرة حموضة ب 1,86 بعد 24 ساعة من التخمر عند زراعتها على حليب الرضع مع نعدل نمو 1,82 سا<sup>-1</sup> ووقت جيل ب 0,16 سا.

**الكلمات المفتاحية:** Bifidobacterium, السيبرولينا, حليب الرضع, النمو, قدرة الحموضة

## TABLE DES MATIERES

RESUME	3
REMERCIEMENTS	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	18
CHAPITRE I : LA SPIRULINE	
1.1 Généralité sur la spiruline	20
1.1.1 Définition	20
1.1.2 Historique	21
1.1.3 Description (Qu'est ce que la spiruline)	22
1.1.4 Taxonomie	23
1.1.5 Morphologie et cytologie	23
1.1.6 Ultra-structure	25
1.2 Écologie et répartition géographique	27
1.3 Cycle biologique	27
1.4 La croissance de la spiruline	28
1.4.1 Conditions physiques et chimiques de croissance	28
1.4.2 Les réactions lumineuses	31
1.4.3 Les réactions obscures	31
1.5 Aspect nutritionnel de la spiruline	33
1.5.1 composition chimique de la spiruline	33
1.5.1.1 Composition en protéines et acides aminés	34
1.5.1.2 Composition en lipides	36

1.5.1.3 Composition en glucides	38
1.5.1.4 Composition en acides nucléiques	40
1.5.1.5 Teneur en vitamines, minéraux et pigments	41
1.6 Valeur thérapeutique	47
1.7 Toxines des cyanobactéries	49
1.8 Réactions allergiques	50
1.9 Précaution d'emploi	51
1.10 Législation	51
CHAPITRE II : LE GENRE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	53
2.1 Historique	53
2.2 Définition	54
2.3 Propriétés phénotypiques	54
2.3.1 Morphologie	54
2.3.2 Les caractéristiques taxonomiques	55
2.3.3 Spécificités biochimiques et culturales	57
2.3.4 Structure de la paroi et de la membrane cellulaire	59
2.4 Physiologie	61
2.4.1 Croissance bactérienne	61
2.4.2 Métabolisme des hydrates de carbonnes	64
2.4.3 Écologie du genre <i>Bifidobacterium</i>	66
2.4.4 Besoins nutritionnels	71
2.5 Les facteurs bifidigènes	74
2.6 Intérêt des bifidobactéries chez les nourrissons	76
2.6.1 Intérêt thérapeutique	77
2.6.2 Action nutritionnelle	80
2.6.3 Adaptation des laits infantiles aux bifidobactéries	82
CHAPITRE III : ALIMENTATION ET MODIFICATION DE LA FLORE INTETINALE	
3.1 Établissement de l'écosystème intestinal	83
3.1.1 Chez le nouveau-né	83

3.1.2 A la fin du premier mois	84
3.1.3 Le tube digestif de l'adulte	84
3.2 Composition de la microflore intestinale	85
3.3 Prébiotiques, probiotiques et symbiotiques : définitions, utilité, modes d'actions	87
3.3.1 Aliments fonctionnel	87
3.3.2 Probiotique	88
3.3.2.1 Définition	88
3.3.2.2 Le mécanisme d'action	89
3.3.2.3 Les effets bénéfiques	93
3.3.3 Prébiotique	97
3.3.3.1 Définition	97
3.3.3.2 Les galacto oligosaccharide	98
3.3.3.3 Le lactulose et le lactitol	98
3.3.3.4 Les fructo- oligosaccharide	98
3.3.3.5 L'effet bifidogène des prébiotiques	99
3.3.4 Le synbiotique	99
CHAPITRE 4 : MATERIEL ET METHODES	100
4.1 Matériel	100
4.1.1 Matériel biologiques	100
4.1.1.1 Souches bifides	100
4.1.1.2 Souche <i>Escherichia coli</i>	100
4.1.1.3 Souche spiruline	100
4.1.1.4 Le lait infantile 1 <sup>er</sup> âge	101
4.1.1.5 Les enzymes protéolytiques	101
4.1.2 Milieux de culture	101
4.1.3 Appareillages et verreries	101
4.1.3.1 Appareillages	101
4.1.3.2 Verreries	102
4.2 Méthodes	102
4.2.1 Enquête sur les diarrhées infantiles dans l'hôpital de Tissemsilt	102

4.2.1.1	Objectif de l'étude	102
4.2.1.2	Méthodologie	102
4.2.2	Isolement de bifidobactéries et des coliformes à partir des selles de nourrissons	103
4.2.3	Contrôle de pureté de la souche bifidobactérie	106
4.2.4	Identification biochimique de la souche bifide	106
4.2.5	Criblage des souches bifides	106
4.2.6	Sélection des souches bifide selon leur aptitude technologique	109
4.2.7	Contrôle de pureté du lait infantile et de la spiruline	110
4.2.7.1	Les analyses physico-chimiques	110
4.2.7.1.1	Détermination de la teneur en eau	110
4.2.7.1.2	Détermination de la teneur en matière grasse	111
4.2.7.1.3	Détermination de la teneur en protéines	112
4.2.7.1.4	Détermination des cendres	113
4.2.7.1.5	Détermination de la teneur en lactose	113
4.2.7.1.6	Détermination de la teneur en sucre totaux dans la spiruline	114
4.2.7.1.7	Détermination de l'acidité titrable	115
4.2.7.1.8	Mesurage du potentiel d'hydrogène (pH)	115
4.2.7.2	Analyses microbiologiques	115
4.2.7.2.1	Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales	116
4.2.7.2.2	Contrôle microbiologique de la qualité	116
4.2.7.2.2.1	Dénombrement des germes aérobies à 30 °C	118
4.2.7.2.2.2	Dénombrement des coliformes totaux et fécaux	118
4.2.7.2.2.3	Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	119
4.2.7.2.2.4	Recherche de <i>Salmonella</i>	119
4.2.7.2.2.5	Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs à 46 °C	120
4.2.8	Suivi de la flore bifide <i>in vitro</i> dans le lait infantile seul et enrichi avec de la spiruline	120

4.2.8.1	La reconstitution du lait infantile adapté 1 <sup>er</sup> âge	120
4.2.8.2	La mise au point du lait infantile seul ou enrichi fermenté avec la flore bifide	121
4.2.8.3	Réactivation de la souche	121
4.2.8.4	Tests biochimiques par galerie API 20 E des deux souches bifides sélectionnées	122
5.2.8.5	Étude de la sensibilité des souches bifides B <sub>1</sub> et B <sub>16</sub> aux antibiotiques	124
4.2.9	Criblage des souches bifides par la spiruline	125
4.2.10	Étude de la digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes protéolytique	126
4.2.11	Analyse statistique	126
4.2.11.1	Le principe de l'analyse de l'ANOVA	126
4.2.11.2	Le plan expérimental	126
 CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION		 128
5.1	Résultats de l'enquête	128
5.1.1	Répartition selon le type d'allaitement	128
5.1.2	Répartition selon le sexe	130
5.1.3	Répartition selon le type d'accouchement	131
5.1.4	Répartition selon l'âge	132
5.1.5	Répartition des nourrissons par diagnostic	133
5.2	Isolement et dénombrement des bifidobactéries et Coliformes à partir des selles de nourrissons sous différents types d'allaitement	136
5.2.1	Isolement et identification des espèces d'intérêt	136
5.2.1.1	Les bifidobactéries	136
5.2.1.2	Les coliformes	136
5.2.2	La purification et contrôle de pureté des souches bifides	141
5.3	Criblage des souches bifides	141
5.4	Activité métabolique des souches bifides sélectionnées	142
5.5	Contrôle de pureté du lait infantile et de la spiruline	144
5.5.1	Les résultats des analyses physico-chimiques	144
5.5.2	Les résultats des analyses microbiologiques	146

5.5.3 Réactivation de la spiruline	148
5.6 Résultats de suivi de la flore bifides <i>in vitro</i> sur le lait infantile et le lait enrichi en spiruline	148
5.6.1 Résultats des tests biochimiques par galerie API 20 E des deux souches bifides sélectionnées	148
5.6.2 Résultats de suivi du pH des deux souches bifides sélectionnées	151
5.6.3 Résultats de suivi de cinétique de croissance des deux souches bifides sélectionnées	153
5.6.4 Résultats de suivi de l'effet antagoniste des deux souches bifides sélectionnées	156
5.6.5 Résultats de la sensibilité des deux souches bifides B <sub>1</sub> et B <sub>16</sub> aux antibiotiques	157
5.6.6 Résultats de criblage des souches bifides par la spiruline	160
5.6.7 Résultats d'étude de la digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes protéolytiques	160
5.7 Résultats de l'analyse statistique	161
5.7.1 Résultats de l'analyse statistique de la variation de pH avec les deux souches bifides	161
5.7.2 Résultats de l'analyse statistique de la variation de temps de génération, le taux de croissance et le taux de mortalité avec les deux souches bifides	162
5.7.3 Résultats de l'analyse statistique de la variation l'effet antagoniste de la souche B16	164
CONCLUSION	166
LISTE DES ABREVIATIONS	170
APPENDICES	172
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	190

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Différentes formes prises par la spiruline	24
Figure 1.2: Cycle biologique de la spiruline	27
Figure 2.1: <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ; Echelle: 1 mm	54
Figure 2.2 : Structure de peptidoglycane de <i>Bifidobacterium bifidum</i> .	56
Figure 2.3 : Fermentation du glucose par <i>Bifidobacterium</i>	58
Figure 2.4 : Modèle pariétal d'une bactérie Gram positive	59
Figure 2.5 : Dégradation du fructose par fermentation selon une cascade des réactions aboutissant à la formation d'acétate et de lactate	66
Figure 3.1 : Composition de la microflore intestinale humaine	86
Figure 4.1 : Protocole d'isolement des bifidobactéries et des coliformes à partir des selles de nourrisson.	105
Figure 4.2 : Protocole d'identification des souches bifides	107
Figure 4.3 : Protocole d'identification de <i>Bifidobacterium sp</i>	108
Figure 4.4 : Identification biochimique des souches bifides par la galerie API 20 E	122
Figure 4.5: Caractérisation de la flore bifide dans le lait adapté 1 <sup>er</sup> âge (Biomil 1)	123
Figure 4.6: L'antibiogramme des souches bifides	125
Figure 5.1 : Évolution de la microflore intestinale aux différentes étapes d'allaitement du nourrisson.	129
Figure 5.2 : Evolution de la flore colique selon le sexe	131
Figure 5.3 : Evolution de la flore colique selon le type d'accouchement	132

Figure 5.4 : Nombre des nourrissons selon l'âge	133
Figure 5.5 : Nombre des nourrissons selon les signes cliniques	133
Figure 5.6: Aspect macroscopique des colonies bifides ensemencées sur gélose MRS.	137
Figure 5.7 : Les souches bifides après coloration de Gram sous microscope optique G × 100	137
Figure 5.8: Aspect des colonies coliformes ensemencées sur gélose VRBL	138
Figure 5.9: Criblage des souches Bifides à l'égard d' <i>Escherichia coli</i>	141
Figure 5.10 : Aspect de la spiruline après réactivation sous microscope optique	148
Figure 5.11 : Identification biochimique des deux souches bifides par la galerie API 20 E	149
Figure 5.12: Évolution de pH des deux souches bifides B <sub>1</sub> et B <sub>16</sub>	151
Figure 5.13: Evolution des nombres des UFC /mL de la souche bifides B <sub>1</sub> avec le temps	154
Figure 5.14 : Le taux de mortalité de la souche de bifide B <sub>1</sub> .	154
Figure 5.15 : Evolution des nombres des UFC /mL de la souche bifides B <sub>16</sub> avec le temps	155
Figure 5.16 : Le taux de mortalité de la souche de bifide B <sub>16</sub> .	155
Figure 5.17: Suivi de pH, la densité optique et l'effet antagoniste de la souche bifide B <sub>16</sub> cultivée sur le lait infantile enrichi en spiruline et le lait infantile seul.	156
Figure 5.18 : Activité inhibitrice de la souche bifide B <sub>1</sub> sur trois antibiotiques.	157
Figure 5.19 : Activité inhibitrice de la souche bifide B <sub>16</sub> sur trois antibiotiques.	158
Figure 5.20 : L'activité antimicrobienne de la spiruline vis-à-vis les souches bifides	160
Figure 5.21 : La digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes Protéolytique	161
Tableau 1.1 : Les limites de concentration admissibles pour les différents éléments dans le milieu de culture	30

Tableau 1.2 : Pourcentage moyen des acides aminés de <i>Spirulina platensis</i> selon différents auteurs et de <i>Spirulina mexicana</i>	35
Tableau 1.3 : Composition typique en pourcentage des principaux acides gras de 3 espèces de Spiruline	36
Tableau 1.4 : Teneur en vitamines en $\mu\text{g}$ / g de matière sèche de Spiruline	42
Tableau 1.5 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en $\mu\text{g/g}$ de sa matière sèche	44
Tableau 1.6 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de <i>Spirulina platensis</i>	47
Tableau 1.7 : Normes imposées en France pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries et métaux lourds	50
Tableau 2.1 : Distribution des espèces de <i>Bifidobacterium</i> chez les adultes et les nourrissons	69
Tableau 4.1 : Critères microbiologiques des aliments pour enfants en bas âge et nourrisson	117
Tableau 4.2 : Critères microbiologiques de la spiruline	117
Tableau 4.3 : Les différents antibiotiques utilisés	124
Tableau 5.1 : Évolution de la microflore colique aux différentes étapes d'allaitement du nourrisson.	129
Tableau 5.2 : Évolution de la microflore colique selon le sexe	130
Tableau 5.3 : Évolution de la microflore colique selon le type d'accouchement	131
Tableau 5.4 : Isolement et purification des souches bifides	139
Tableau 5.5 : Résultats d'identification des bifidobactéries (galerie classique)	140
Tableau 5.6 : Criblage des souches lactiques à l'égard de germes Pathogènes	142
Tableau 5.7 : Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) des cultures des bactéries bifides sélectionnées	143
Tableau 5.8: Les analyses physico-chimiques du lait infantile "Biomil 1"	144
Tableau 5.9 : Les résultats des analyses physico-chimiques de la spiruline sèche	145

Tableau 5.10 : Critères microbiologiques des aliments pour enfants en bas âge et nourrisson	146
Tableau 5.11 : Les résultats des analyses microbiologiques de la spiruline	147
Tableau 5.12: Résultats des tests biochimiques par la galerie API 20 E des deux souches bifides B1 et B16	150
Tableau 5.13: Résultats des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) des cultures de la souche bifide B <sub>1</sub>	152
Tableau 5.14: Résultats des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) des cultures de la souche bifide B <sub>16</sub>	153
Tableau 5.15: Étude de la sensibilité de la souche B <sub>1</sub> aux antibiotiques	157
Tableau 5.16: Étude de la sensibilité de la souche B <sub>16</sub> aux antibiotiques	158
Tableau 5.17 : Variation de pH avec la souche bifide B1	161
Tableau 5.18 : Variation de pH avec la souche bifide B16	162
Tableau 5.19 : Variation du temps de génération G	163
Tableau 5.20 : Variation de taux de croissance $\mu$	163
Tableau 5.21 : Variation de taux de mortalité	164
Tableau 5.22 : Variation de l'effet antagoniste de la souche B16	164

## INTRODUCTION

La spiruline dont le nom scientifique est *Spirulina sp.* ou *Arthrospira sp.* est une algue bleue microscopique qui se développe dans les régions tropicales et subtropicales. Apparue sur la terre il y a 3,5 milliard d'années, elle figure aujourd'hui parmi les êtres vivants les plus vieux de notre planète et attire de plus en plus l'attention des scientifiques. Elle possède de multiples utilités: Agro-alimentaire, pharmaceutique, écologique et biotechnologique, etc. [1-14]

De nombreuses études ont montré des effets positifs de sa consommation sur la santé humaine et animale [15-21]. Elle apparaît comme une algue de l'espoir qui aura un rôle de premier plan à jouer pour relever le défi alimentaire et pour servir de remède à certaines maladies qui touchent en particulier les pays en voie de développement [22].

La spiruline est une algue bleu-vert, depuis des années, considérée comme un complément alimentaire sain et efficace par un nombre grandissant de personnes [23]. Sa structure demeure exceptionnelle, de ce fait elle est recommandée aux femmes enceintes, lors de l'allaitement ainsi aux enfants [24], car elle contient les même éléments que le lait maternel [25]. La spiruline est utilisée dans la lutte contre la mal nutrition car nul autre aliment ne peut apporter jusqu'à 70% de protéines, autant de minéraux, vitamines, anti-oxydant et acides gras poly-insaturés. [24, 25]. De ces qualités découlent pour nous un grand intérêt de son utilisation dans l'alimentation infantile.

Des études transversales ont montré que la flore colique du nourrisson sous allaitement maternel est dominée par les bifidobactéries tandis que les entérobactéries prédominent chez l'enfant nourri au lait artificiel. Peu d'études ont concerné le sevrage, défini ici comme la période de substitution à l'allaitement maternel. Pour cela, on veut apporter une meilleure connaissance à l'évolution de la flore colique aux différents stades d'allaitement.

Tsuchihashi a montré en 1987 que l'ajout de 5% de la spiruline dans l'alimentation augmentait de 3 fois la population des *Lactobacillus* des intestins de rats. Chez les humains, les *Lactobacillus* sont connus pour leurs 3 fonctions majeures : ils facilitent la digestion des nutriments, protègent contre les infections et stimulent le système immunitaire. La spiruline agit comme aliment fonctionnel, nourrissant la flore intestinale, surtout le lactobacille et le bifidus. Le maintien d'une population saine de ces bactéries dans l'intestin réduit les problèmes provoqués par des éléments pathogènes comme *E. Coli* et *Candida albicans* [25]. Lors de cette étude on veut mettre au point l'influence *in vitro* de la spiruline sur la croissance de la flore intestinale en particulier sur les bifidobactéries.

Cette présente étude, s'articule autour de trois volets:

- Isolement de quatorze souches bifides à partir des selles des nourrissons recevant différents types d'allaitement (maternel, artificiel et mixte).
- L'identification, l'effet antimicrobien et l'étude des aptitudes technologiques, permet de sélectionner deux souches bifides qui sont révélées les plus intéressantes sur le plan de cinétique de croissance et l'effet antagoniste vis-à-vis la souche ciblée *Escherichia coli*.
- Ensuite, une série de purification de deux souches bifides sélectionnées, puis une mise au point de l'influence *in vitro* de la spiruline sur la croissance de la flore intestinale en particulier sur les bifidobactéries.

## CHAPITRE I LA SPIRULINE

### 1.1 Généralité sur la spiruline

#### 1.1.1 Définition

On connaît actuellement quelques 25 000 espèces d'algues sur la planète Terre., Parmi elles, on peut distinguer une algue bleue microscopique, il s'agit de la *Cyanobactérie Arthrospira Platensis*, plus connue sous le nom de Spiruline [26]. Elle fait partie des micro-organismes : ni végétale ni animale [27]. Ce groupe comprend l'ensemble des bactéries autotrophes, c'est-à-dire capables d'utiliser l'énergie de la lumière pour la photosynthèse [28].

C'est une algue microscopique en forme de spirale, la spiruline est une des premières formes de Vie sur la planète Terre [29]. Elle appartient à l'embranchement des procaryotes, car elle n'a pas de noyau bien individualisé.

En effet, elle est longtemps restée classée parmi les « algues bleu-vert », ce pour plusieurs raisons :

- son habitat aquatique,
- la présence d'un système photosynthétique producteur d'oxygène,
- son aptitude à développer des biomasses importantes,
- sa morphologie proche de celle des algues,
- sa couleur liée à sa teneur en pigments bleu (phycocyanine) et vert (chlorophylle) [28].

Le miracle de la photosynthèse se produit : grâce à l'énergie lumineuse, une bactérie est désormais capable de transformer le gaz carbonique en matière organique, au cours d'un processus complexe qui dégage de l'oxygène. Ceci a permis l'enrichissement de l'atmosphère en oxygène (O<sub>2</sub>) puis la formation d'ozone (O<sub>3</sub>) protégeant ainsi la Terre des rayonnements ionisants [29]. Les milieux où on trouve de la spiruline à l'état naturel sont des étendues d'eaux généralement ensoleillées et relativement chaudes (environ 30-35°C) [28].

En pratique, il faut retenir que le terme "spiruline" correspond au nom commercial d'une espèce de cyanobactérie alimentaire appartenant toujours au genre *Arthrospira*. Le mot "Spirulina" est le nom commercial anglophone de la spiruline, mais il désigne également un genre de cyanobactérie assez éloigné de *Arthrospira*, et surtout non comestible (par exemple : *Spirulina major*, *Spirulina subtilissima*, *Spirulina princeps*, *Spirulina gigantea* ou *Spirulina subsalsa*) [30].

### 1.1.2 Historique

L'origine de la Terre remontant à 4,5 milliards d'années, les cyanobactéries apparaissent vers 3,5 - milliards d'années [29] et elle est considérée comme l'aliment naturel le plus complet de notre planète [28].

Les chercheurs ont trouvé des descriptions d'une algue bleue utilisée dans l'alimentation de base de la civilisation aztèque. Plus récemment, en 1940 on publie pour la première fois la consommation de galette appelée « dihé » au Tchad par l'ethnie Kanembous. L'enquête montra que ce " dihé " provenait de masses d'un micro-organisme unique récolté à la surface de mares fortement alcalines et séché à même le sable des berges. [31]. Ce peuple utilise toujours la spiruline comme complément alimentaire. De plus ils commercialisent ces galettes permet de penser que la culture de spiruline peut être une économie rentable au-delà même de la dimension sanitaire.

Aujourd'hui des cultures autonomes sont mises sur pied en Afrique, Inde, Pérou, et Chine pour combattre la malnutrition, la dénutrition et les carences protéiques.

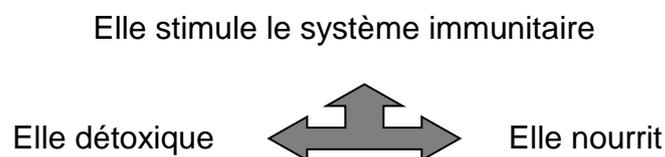
En occident, la spiruline est utilisée en tant que complément alimentaire pour ses multiples bienfaits [28].

En Algérie, aucune allusion à la consommation ou à l'utilisation de la spiruline n'est faite. Son existence dans notre pays, n'a été signalée qu'au cours de ces vingt dernières années. De modestes initiatives ont été entreprises au lacs d'El Goléa, à Tamanrasset et plus récemment, en 2009 à Mostaganem.

### 1.1.3 Description (Qu'est ce que la spiruline)

La spiruline est un petit être aquatique « algue bleue » (mais que l'on voit verte), vieux comme le monde dont le nom scientifique est "cyanobactérie *Arthrospira platensis*" (ne pas confondre avec la cyanobactérie marine dénommée scientifiquement "*Spirulina subsalsa*"), qui vit de photosynthèse comme les plantes et prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe. [29]

De par sa composition, la spiruline a un triple rôle :



#### **1.1.4 Taxonomie**

La spiruline est une cyanobactérie (anciennement désignée par le terme «algue bleue» puis cyanophycée) [32]. Elle appartient donc au domaine des bactéries (*Bacteria*) et se classe parmi les bactéries gram négatives [33, 34]. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires.

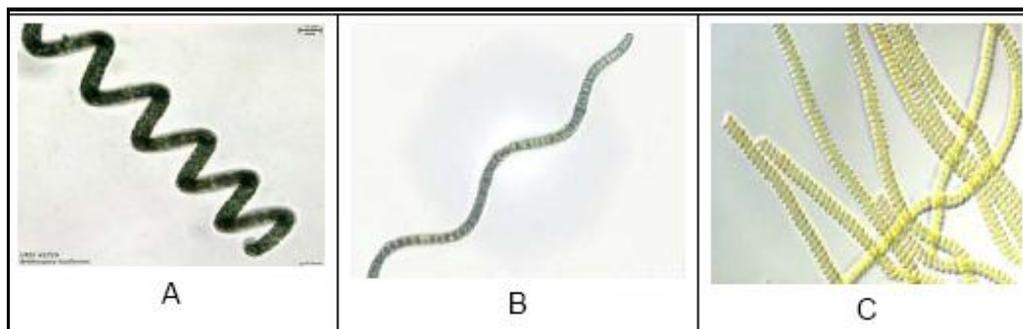
La spiruline appartient à :

- Ordre des *Nostocales* (= *Oscillatoriales*)
- Famille des *Oscillatoriaceae*,
- Genre *Oscillatoria* et
- Sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira* [35, 36].

#### **1.1.5 Morphologie et cytologie**

C'est une cyanophycée microscopique [37] qui se présente sous la forme de brins, parfois en hélice (0,2 à 0,3 mm de long). Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires. Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation de « Spiruline » [38].

Cependant les Spirulines présentent différentes formes (Figure 1.1). On trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites. Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat. [37, 39].



**Figure 1.1 : Différentes formes prises par la spiruline.**

**A = Forme spiralisée (*Arthrospira fusiformis*) Image provenant du site**

**www.utex.org, B= Forme ondulée (*Spirulina maxima*)**

**Image provenant du site www.utex.org, C = *Arthrospira platensis* [37]**

La spiruline est constituée de cellules juxtaposées, 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 [41]. Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau en adoptant le mouvement d'une vis [37].

Les cellules de cyanobactéries n'ayant pas de plastes individualisés, leur coloration est homogène. Cependant, en microscopie optique, on distingue une zone périphérique colorée (le *chromoplasma*) et une partie centrale plus claire (le *centroplasma*) [42].

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) [37]. La spiruline, trésor de protéines, vitamines, minéraux, enzymes, pigments... [27].

A cela viennent s'ajouter de nombreux métaux comme le fer, le cuivre ou le manganèse. Enfin des acides gras essentiels comme la linoléique et les vitamines

complètent la composition de la spiruline. Elle est un inducteur potentiel de l'interféron-gamma, et un stimulant modéré des interleukine-4 et interleukine-1 bêta. Ces derniers sont des marqueurs de la fonction immunitaire. En concluant que la spiruline "boostait le système immunitaire" [43].

La spiruline devient aussi une excellente source de zinc : des essais menés par Antenna Technologie en 1998 montrent qu'il est facile d'obtenir une spiruline dont 2 à 4 grammes suffisent à couvrir simultanément l'essentiel des besoins quotidiens en zinc, en fer et en vitamine A chez l'enfant [33].

### **1.1.6 Ultra-structure**

La microscopie électronique a aussi permis de mieux connaître la structure et le fonctionnement de ces cellules. Leur organisation est relativement simple et semblable à celle des cellules de procaryotes [44 - 46] :

- Absence de membrane nucléaire et donc de noyau bien individualisé;
- Absence de mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, et flagelles;
- Les cellules sont limitées par une fine membrane constituée de 4 couches minces différenciables en microscopie électronique : deux d'entre elles présentent une analogie chimique et structurale avec la paroi des bactéries gram négatif car elles sont riches en mucopolymères et mucopeptides. Elles sont néanmoins un peu plus complexes, mais il est important de retenir que cette membrane est totalement exempte de cellulose. Une enveloppe externe, riche en caroténoïdes, peut parfois l'enrober;
- Sur le plan ultra structural, le chromoplasma apparaît comme un système membranaire comprenant des thylakoïdes; la spiruline ne renfermant pas de chloroplastes, ce sont ces thylakoïdes qui constituent les sites de photosynthèse. Ce sont des filaments pigmentés disposés généralement de façon pariétale concentrique. Ils renferment les phycobilisomes, granules porteurs des pigments

photosynthétiques (chlorophylle a,  $\beta$ -carotène et oxycaroténoïdes, phycocyanine et phycoérythrine).

Le nucléoplasme (ou centroplasma) correspond d'une part, à des fibrilles d'acide désoxyribonucléique (ADN) représentant le génome (entre 2 et  $8 \times 10^9$  Daltons) et, d'autre part, à des grains d'acide ribonucléique (ARN). L'ADN est colorable par les réactifs histologiques classiques (Feulgen, hématoxyline, etc.) et visible au microscope électronique sous forme de fines aiguilles de 250 nm.

Le chromoplasma présente de nombreuses inclusions dont les plus importantes sont [47] :

- Les granules de cyanophycine: la cyanophycine, molécule propre aux cyanobactéries, est un polymère d'acide aspartique et d'arginine. Ce polypeptide, non fabriqué par les ribosomes, constitue une forme de réserve d'azote et d'énergie;
- Les carboxysomes : ils contiennent le ribulose-1,5 phosphate carboxylase, responsable de la fixation du  $\text{CO}_2$ . Cette enzyme n'est présente que dans des conditions de hautes intensités lumineuses et de hautes concentrations en nitrates;
- Les granules d'amidon cyanophycéen (glycogène), d'hydrates de carbone similaires à l'amylopectine et ceux de volutine (polyphosphate) constituent des formes de réserve énergétiques;
- Les ribosomes riches en acide ribonucléique;
- Les globules lipidiques;

- Les vésicules de gaz : elles se présentent sous la forme de faisceaux de minuscules cylindres contenant de l'azote. Leur rôle est de réguler la flottabilité des filaments de spiruline.

## 1.2 Écologie et répartition géographique

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 [48]. 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). Cet organisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe.

## 1.3 Cycle biologique

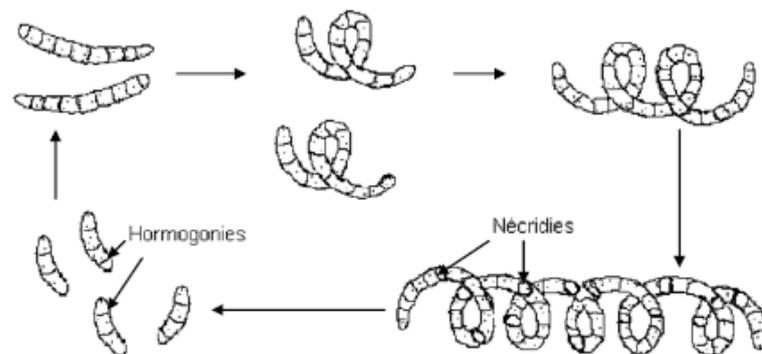


Figure 1.2: Cycle biologique de la spiruline [49].

Le cycle est schématisé dans la figure 1.2 la spiruline se reproduit par bipartition par scission simple. C'est une reproduction asexuée, par segmentation des filaments [50, 51].

Le filament de spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées *nécriidies*. 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*. 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 maximal de la spiruline est de l'ordre de 7 heures [50].

## **1.4 La croissance de la spiruline**

### **1.4.1 Conditions physiques et chimiques de croissance**

Pour se développer, la Spiruline a besoin d'éléments minéraux simples tels l'eau, les sels minéraux, le CO<sub>2</sub> et l'O<sub>2</sub> qu'elle puise directement dans son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie grâce à son système pigmentaire. Ce mode de synthèse de biomasse est la photo autotrophie dotée des photosystèmes I et II [52]. La photosynthèse constitue alors la clé de sa croissance.

La spiruline croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines (8 < pH < 11,5) et natronées (fortement concentrées en carbonates et bicarbonates) 8 de la zone intertropicale. En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer, sont les éléments limitant de la production phytoplanctonique dans les milieux aquatiques (Tableau 1.1). Dans les gisements naturels, ces éléments sont apportés par les bassins versants. La Spiruline se développe dans des eaux chaudes (28 à 40°C) [37] à 20°C la croissance est pratiquement stoppée [27] et bénéficiant d'une intensité lumineuse élevée.

Le vent joue un rôle important en créant une agitation qui favorise une dispersion homogène de la Spiruline dans le milieu, et donc son exposition à la lumière [37]. La construction de bassins sous serre peut être d'autant plus intéressante que cet abri constitue non seulement une protection contre le froid, l'évaporation, les insectes et les poussières mais aussi contre les pluies diluviennes, comme les orages, qui peuvent faire déborder les bassins et donc provoquer une perte, ou au moins une dilution du milieu de culture.

Le fait que la spiruline prospère en milieu très alcalin présente deux avantages majeurs :

- meilleure absorption du gaz carbonique de l'air
- protection contre les contaminations [27].

En milieu naturel, lorsque les conditions sont optimales, les Spirulines peuvent se développer en grande quantité et entrent alors en compétition avec d'autres organismes.

Lors des efflorescences, la consommation des carbonates et bicarbonates entraîne une augmentation du pH limitant ainsi la croissance des autres microorganismes [37].

**Tableau 1.1 : Les limites de concentration admissibles pour les différents éléments dans le milieu de culture [27]**

<b>Composants</b>	<b>Concentrations</b>
Carbonate	2800 mg/l
Bicarbonate	720 mg/l
Nitrate	614 mg/l
Phosphate	20 mg/l
Sulfate	350 mg/l
Chlorure	3030 mg/l
Sodium	4380 mg/l
Potassium	642 mg/l
Magnésium	10 mg/l
Calcium	5 mg/l
Ammonium + ammoniac	5 mg/l
Fer	1 mg/l
Salinité totale	12792 mg/l
Densité à 20°C	1010 g/l
Alcalinité	0,105 N (molécule-gramme/l)
PH à 20°C	10,4

Le milieu doit contenir en plus tous les oligoéléments nécessaires, apportés généralement par l'eau et par les impuretés des sels, mais dont il est prudent d'ajouter un complément. Un peu d'argile peut être un complément utile [27].

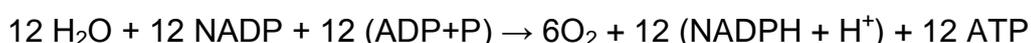
L'énergie lumineuse est captée par des pigments assimilateurs représentés par les chlorophylles. La chlorophylle de la spiruline et des autres bactéries photosynthétiques se situe dans les régions spécialisées de leur membrane cellulaire : les phycobilisomes des thylakoïdes. La photosynthèse est divisée en deux phases: une série de réaction dites "lumineuses" et une série de réactions dites "obscurées" [53].

### 1.4.2 Les réactions lumineuses

Ces réactions nécessitent la présence de lumière et s'effectuent dans les membranes thylakoïdiennes pour la spiruline (dans les chloroplastes pour les cellules végétales). Cette lumière permet d'apporter l'énergie nécessaire à la réaction photosynthétique. Les thylakoïdes contiennent des pigments photosynthétiques organisés en deux photosystèmes: les photosystèmes I et II, respectivement notés PS I et PS II. C'est au niveau des membranes communes à deux thylakoïdes que se trouvent ces deux photosystèmes; ils sont toujours placés à proximité l'un de l'autre [53].

Le PS I possède une plus grande variété de pigments que le PS II et il est riche en chlorophylle de type a P700 : celle-ci absorbe des longueurs d'onde de 430 nm dans le bleu et de 700 nm dans le rouge. La source d'électrons est constituée par les minéraux et les molécules organiques. Le PS II est riche en chlorophylle de type à P680. C'est à son niveau que se produit la photolyse de l'eau, c'est-à-dire qu'il récupère les électrons libérés par les molécules d'eau. La phycocyanine, pigment spécifique aux cyanobactéries, est essentielle au transport de l'énergie vers le PS II [53].

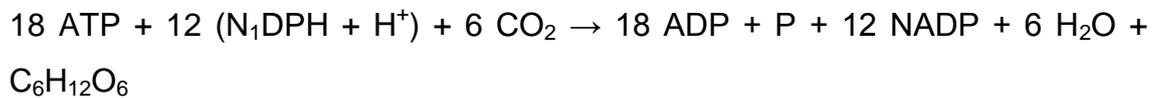
Au cours de cette phase lumineuse, il y a photolyse de l'eau: les molécules d'oxygène et d'hydrogène se séparent. On assiste également à la synthèse d'ATP, molécule dont la consommation libère beaucoup d'énergie, et de NADP [53].



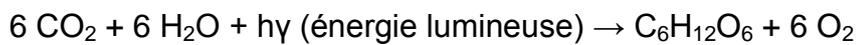
### 1.4.3 Les réactions obscures

Elles ont lieu dans le stroma (matrice) du thylakoïde, ou l'énergie produite lors de la phase lumineuse y est stockée sous forme d'ATP et de NADP réduit. Cette énergie est utilisée pour la synthèse de molécules organiques, par réduction du dioxyde de carbone. Cette phase est dite obscure car elle correspond à une

série de réactions qui ne nécessitent pas de lumière; ce n'est pas pour autant qu'elles se déroulent la nuit, au contraire. Ces réactions forment le cycle de Calvin. A l'issue de ce cycle, une molécule de glucose est synthétisée [53].



La formule générale de la photosynthèse peut donc s'écrire de la façon suivante:



Bien que la spiruline ne renferme que de la chlorophylle de type a, il en existe d'autres sortes, en particulier chez d'autres types d'algues : les chlorophylles b, c et d.

Les chlorophylles sont des pigments photosynthétiques et elles peuvent être excitées par les radiations lumineuses. Cette excitation est due à la présence de liaisons conjuguées (et donc d'électrons délocalisés) [54, 55]: l'arrivée d'un photon fait passer un électron délocalisé d'un état fondamental (non excité) à un état excité. La chlorophylle, une fois excitée, retourne à son état fondamental, plus stable thermodynamiquement. Ceci peut se faire de plusieurs manières, en particuliers:

- En émettant de la lumière (c'est la fluorescence constatée dans une solution de chlorophylle);
- En transférant son énergie à une molécule très proche (c'est la résonance, qui permet aux pigments de l'antenne collectrice des photosystèmes de transférer l'énergie lumineuse de molécule jusqu'à une chlorophylle piège);

- En perdant un électron (c'est la photochimie, laquelle permet à la molécule de chlorophylle piège du photosystème, de réduire un accepteur d'électron et donc de réaliser la chaîne photosynthétique) [53].

La nuit, c'est la respiration qui permet à la spiruline de produire l'énergie nécessaire à son entretien et à sa croissance. Les hydrates de carbone produits pendant le jour, subissent une oxydation qui les convertit en protéines, avec en parallèle une formation de CO<sub>2</sub> (lequel reste dissous dans le milieu de culture) et d'H<sub>2</sub>O. Puis, avec le retour de la lumière du jour, le CO<sub>2</sub> participera à un nouveau cycle de photosynthèse [39]. La photosynthèse et la respiration s'équilibrent globalement.

## **1.5 Aspect nutritionnel de la spiruline**

### **1.5.1 Composition chimique de la spiruline**

La spiruline est un aliment naturel qui a des valeurs nutritionnelles exceptionnelles.

Championne toute catégorie, elle contient plus de protéines, de bêta-carotène, de vitamine B<sub>12</sub>, de fer, et d'acide gamma linoléique qu'aucun autre aliment connu.

La composition de la Spiruline dépend des éléments chimiques dont elle dispose dans le milieu. La culture en bassin permet en tous les cas de maîtriser la qualité [37].

La plupart des études des constituants de la spiruline ont été réalisées sur *Spirulina platensis* (connue aussi sous l'appellation de *Arthrospira platensis* ou *S. geitler*). Cette espèce sert de référence car sa composition est relativement constante même si elle varie selon la souche, les conditions de culture et le mode de conditionnement [37].

### **1.5.1.1 Composition en protéines et 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 [27, 37, 39, 56]. Ce pourcentage est bien plus élevé que celui du poisson (25%), du soja (35%), de la poudre de lait (35%) et des céréales (14%) [62], viande (20%) [27]. Cette richesse est cependant à relativiser compte tenu de la faible quantité de spiruline utilisée en complément alimentaire (<10g par jour) [39].

Ce micro-organisme ne possède pas de paroi cellulosique mais une enveloppe relativement fragile, constituée de polysaccharides. Cette faible teneur en cellulose explique sa digestibilité de l'ordre de 75 à 83%. De ce fait, la Spiruline ne nécessite pas de cuisson ni même l'administration d'un traitement spécial pour une bonne digestibilité protéique. ) [37]

**Tableau 1.2 : Pourcentage moyen des acides aminés de *Spirulina platensis* selon différents auteurs et de *Spirulina mexicana* d'après [58]**

Acides Aminés	Jacquet 1974	Clément 1975b	Fox 1999	Borowitzka
<b>Acides aminés essentiels* (%)</b>				
Isoleucine	5,60	6,40	5,98	5,70
Leucine	8,00	9,00	8,71	8,70
Lysine	4,20	4,80	5,28	5,10
Méthionine	2,25	2,60	2,85	2,60
Phénylalanine	4,40	4,60	5,09	5,00
Thréonine	4,70	5,50	5,58	5,40
Tryptophane	1,00	1,60	1,48	1,50
Valine	5,70	6,90	7,72	7,50
<b>Acides aminés non essentiels (%)</b>				
Alanine	7,25	7,90	8,24	7,90
Arginine	6,60	6,70	7,92	7,60
Acide aspartique	9,30	9,20	9,50	9,10
Cystéine	0,95	0,90	0,93	0,90
Acide Glutamique	NC	12,90	13,20	12,70
Glycine	4,80	5,00	5,07	4,80
Histidine	1,60	1,60	1,50	1,50
Proline	3,60	3,90	4,32	4,10
Sérine	5,00	5,60	5,46	5,30
Tyrosine	4,30	4,90	NC	4,60

\* acide aminé indispensable qui ne peut être synthétisé *de novo* par l'organisme et doit donc être apporté par l'alimentation.

### 1.5.1.2 Composition en lipides

Les lipides représentent généralement de 6 à 8% du poids sec de la spiruline mais ce pourcentage peut atteindre 11% [59]. 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%) [56].

#### □ Les acides gras

La fraction saponifiable, représentant 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la Spiruline [39] est essentiellement composée de monogalactosyl diglycéride et de digalactosyl diglycéride (23%) de sulfoquinovosyl diglycéride (5%) et de phosphatidyl glycérol (25,9%) [60]. 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 10 présents en quantité appréciable. Il est à noter que 4,6% de phospholipides sont encore indéfinis [37].

**Tableau 1.3 : Composition typique en pourcentage des principaux acides gras de 3 espèces de spiruline d'après [61].**

<b>Acides gras</b>	<b><i>S. pacifica</i></b>	<b><i>S. maxima</i></b>	<b><i>S. platensis</i></b>
Palmitique (16:0)	44,2	63,0	25,8
Palmitoléique (16:1) oméga-6	4,4	2,0	3,8
Stéarique (18:0)	Traces	1,0	1,7
Oléique (18:1) oméga-6	0,4	4,0	16,6
Linoléique (18:2) oméga-6	24,3	13,0	40,1
Gamma-linolénique (18:3) oméga-6	22,1	13,0	40,1
Alpha-linolénique (18:3) oméga-3	Traces	Traces	Traces

Les acides gras oméga-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 (2002) [58, 59]. Ces expériences sur l'homme sont cependant réalisées avec de faibles effectifs et sur des sujets souffrant d'hyper cholestérolémie ou hyperlipidémie.

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) [60, 61]. 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 [62]. Le composant lipide sulfoquinovosyldiacyl glycerol (SQDG) de *Spirulina platensis* riche en sulfolipides a démontré par expérience *in vitro* sa capacité à inhiber la transcriptase inverse<sup>1</sup> du hiv-1 et du hiv-2 alors que ce dernier est naturellement résistant à cette classe de molécules [63].

Le contenu en acide gras de la Spiruline peut être modifié suivant les conditions de culture [71].

La fraction insaponifiable est composée essentiellement de stérols, de terpènes, d'hydrocarbures saturés (paraffines) et de pigments. Cette fraction représente 1,1% à 1,3% de la matière sèche de la Spiruline [39]. Bien que certaines études révèlent l'absence de stérols, il semblerait que ces derniers représentent néanmoins 1,5% de la fraction lipidique non polaire de la Spiruline [62]

### □ **La fraction insaponifiable**

La fraction insaponifiable est composée essentiellement de stérols, de terpènes, d'hydrocarbures saturés (paraffines) et de pigments. Cette fraction représente 1,1% à 1,3% de la matière sèche de la Spiruline [39]. Bien que certaines études révèlent l'absence de stérols, il semblerait que ces derniers représentent néanmoins 1,5% de la fraction lipidique non polaire de la Spiruline [62]

#### **1.5.1.3 Composition en glucides**

Les glucides représentent 13,6 à 25% de la matière sèche des spirulines [62 - 64]. La paroi des Spirulines comme les bactéries Gram négatives, est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides.

### □ **Glucides simples et polyols à petites molécules**

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.

### □ **Glucosanes aminés et Rhamnosanes aminés**

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 [65]. La glucosamine représente une part non négligeable des polysaccharides. Par contre, le galactose et ses dérivés sont absents de cet équipement glucidique.

### □ **Cyclitols**

Présents sous forme phosphorylée, les cyclitols correspondent à 2-3 % de la matière sèche de la Spiruline. Ils se composent essentiellement de meso-inositol phosphate qui constitue une source de phosphore organique ainsi que d'inositol (350-850mg de matière sèche) [67]. Cette teneur en inositol serait selon [62] environ huit fois celle de la viande et plusieurs centaines de fois celle des végétaux les plus riches en cette molécule. Les cyclitols phosphatés sont aussi des capteurs de calcium qui peuvent avoir un effet décalcifiant si l'apport en calcium devenait insuffisant [65].

### □ **Glucides des parois cellulaires**

Ces glucides se retrouvent sous la forme d'acide sialique à de très faible teneur (0,5%), de glucannes aminés et de rhamnosanne aminés, ainsi que d'acide muramique et glucosamine sous forme de chlorhydrate, tous deux associés à des peptides et à un pourcentage totalisant 2% [65, 68].

La paroi de la Spiruline présente une teneur en glycogène estimée à environ 0,5% de son poids sec [39, 72] et une teneur en cellulose très faible, soit 0,5% de son poids frais [69]. Elle serait donc facilement assimilable même par les personnes ayant une absorption intestinale faible.

### □ **Polysaccharides sulfatés**

La Spiruline est constituée aussi de polysaccharides sulfatés spécifiques comme spirulane-calcique (Ca-Sp) ou le spirulane-sodique (Na-Sp). Ces 12 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 [70].

#### □ **Immulina**

Un nouveau polysaccharide d'un poids moléculaire élevé a été isolé chez *Spirulina platensis*. Cet activateur potentiel des monocytes et macrophages humains a été nommé « Immulina ». Ce polysaccharide, structurellement complexe et fortement hydrosoluble, représente entre 0,5% et 2% du poids sec de cette cyanophycée. PUGH (2001) [71] ont isolé « Immulina » de *Spirulina platensis* et observent *in vitro* une activation des monocytes 100 à 1000 fois plus élevée que celle produite par des préparations de polysaccharides utilisés habituellement en clinique pour traiter les cancéreux.

Un article plus récent [72] portant sur l'ingestion d' « Immulina » par 11 patients en bonne santé rapporte un effet immédiat mais temporaire sur les défenses immunitaires.

#### **1.5.1.4 Composition en acides nucléiques**

La spiruline renferme 4,2 à 6% d'acides nucléiques totaux (30% ADN et 70% ARN) dans sa matière sèche [73]. 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) [37].

### **1.5.1.5 Teneur en vitamines, minéraux et pigments**

Nous comparons les besoins journaliers d'un enfant de 6 mois à 3 ans avec ce que peut apporter une dose de 10 g de spiruline (dose maximum donnée à des enfants). Pour évaluer cet apport, il nous faut tenir compte de la quantité de micronutriment contenue dans 10 g de spiruline, mais aussi de celle qui sera réellement incorporée par l'organisme (biodisponibilité). Selon les aliments la biodisponibilité d'un micronutriment peut être très faible, jusqu'à moins de 10 %. Les besoins journaliers d'un enfant extraits du tableau de LUTTER et DEWEY (2003) sont comparés en termes de pourcentage avec les apports de 10 g de Spiruline. Nous gardons à l'esprit que la Spiruline est utilisée comme complément alimentaire et que le reste des micronutriments doit être fourni par la nourriture de base dont le lait maternel chez les jeunes enfants [37].

#### □ **Vitamines**

La spiruline contient une large gamme de vitamines (Tableau 1.4). Les valeurs du tableau sont variables car elles concernent différentes productions avec des procédés de conservation variés. En effet, les vitamines sont sensibles à la chaleur. D'après une étude [74], les teneurs en vitamines du Tableau 1.4 seraient diminuées d'environ un tiers dans le cas de séchage sur des tambours chauffants. La granulométrie du produit final intervient également dans la préservation immédiate et la conservation à long terme des vitamines notamment pour le  $\beta$ -carotène [75]. Une granulométrie plus élevée permettrait une meilleure conservation. Cet auteur déconseille le séchage par pulvérisation [37].

**Tableau 1.4 : Teneur en vitamines en  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche de spiruline d'après [62] complété par d'autres références pour la vitamine E**

Vitamine	Teneur	Vitamine	Teneur
<b>Vitamines hydrosolubles</b>		<b>Vitamines liposolubles</b>	
B1 (thiamine)	34-50	Provitamine A ( $\beta$ -carotène)	700-1700
B2 (riboflavine)	30-46	Cryptoxanthine	100
B3 (niacine) Vitamine E	130	(alpha-tocophérol)	120** 50-190*** 13****
B5 (pantothénate)	4,6-25		
B6 (pyridoxine)	5-8		
B8 (biotine)	0,05		
B9 (folate)	0,5		
B12 (cobalamine)	0.10-0.34*		
C (acide ascorbique)	Traces		

\* hors pseudo vitamine B12

\*\* Vincenzini *et al.* (1979) [76]

\*\*\* Falquet & Hurni (2006) [62]

\*\*\*\* Gomez-Coronado *et al.* (2004) [77]

#### □ Vitamine B<sub>12</sub> et C

Parmi les vitamines hydrosolubles, on note la présence de vitamines du groupe B. Selon YATES (2001) [78] cette teneur soit exceptionnelle pour un végétal, Plus récemment, elle est rediscutée par FALQUET et HURNI (2006) [62]. Un article de WATANABE (2007) [79] conclut que la plupart des cyanobactéries utilisées en complément alimentaire contiennent une part prédominante de pseudo vitamine B<sub>12</sub>, inactive chez l'homme. Le besoin journalier en vitamine B<sub>12</sub> d'un enfant de 6 mois à 3 ans est de 0,5 à 0,9  $\mu\text{g}$ . Si l'intégralité de la vitamine B<sub>12</sub> (hors la pseudo) était biodisponible, une dose de 10 g de spiruline couvrirait de

142 % (teneur basse) à 486 % (teneur haute) des besoins de l'enfant. La vitamine C n'existe qu'à l'état de trace dans la Spiruline [37].

#### □ Vitamine A

Parmi les vitamines liposolubles, on note une teneur très élevée en  $\beta$ -carotène. Cette provitamine A représenterait 80% des caroténoïdes totaux [80], le reste étant principalement composé de xanthophylle, de cryptoxanthine, d'échinénone, de zéaxanthine et de lutéine. 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. L'organisme humain convertit ce pigment en vitamine A « ou rétinol » en quantité nécessaire à ses besoins [81]. Il n'y a donc pas de risque d'excès de vitamine A (hypervitaminose).

Une étude récente de WANG (2008) [82] 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 données dans le Tableau 3 correspondraient en terme 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 3 g/j.

#### □ Vitamine E

La vitamine E a des propriétés antioxydantes 4 envers les acides gras insaturés et se conserve très bien après séchage de la Spiruline. On note dans le Tableau 1.4 des teneurs en vitamine E de la spiruline variant de 13 à 120  $\mu$ g / g [77]. Cette très forte variabilité des teneurs est liée probablement

- a) à des méthodes de dosage différentes
- b) à des qualités de Spiruline différentes.

Les besoins journaliers d'un enfant de 6 mois à 3 ans sont de  $5.10^3$  à  $6.10^3$   $\mu\text{g}$ , si la biodisponibilité était de 100 %, une dose de 10 g de spiruline couvrirait de 2 à 22 % de ces besoins.

#### □ Sels minéraux et oligo-éléments

La composition en minéraux de la Spiruline apparaît dans le Tableau 1.5. On observe une grande variabilité dans les teneurs. Elle s'explique par le fait qu'elles concernent les Spirulines en milieu naturel et celles cultivées. La variabilité dans les cultures maîtrisées est bien moindre. En outre, il est possible d'augmenter les teneurs en minéraux des organismes cultivés.

**Tableau 1.5 : Composition en minéraux de la spiruline cultivée en  $\mu\text{g}$  / g de sa matière sèche d'après [62]**

Minéraux	Teneur	Minéraux	Teneur
Calcium	1300-14000	Cuivre	8-10
Phosphore	6700-9000	Chrome	2,8
Magnésium	2000-2900	Manganèse	25-37
Fer	580-1800	Sodium	4500
Zinc	21-40	Potassium	6400-15400

#### □ Fer

Les spirulines naturelles ont rarement des teneurs en fer dépassant 500 mg/kg bien que des valeurs supérieures à 1000 mg/kg aient été trouvées [285]. La Spiruline de culture peut être enrichie en Fer et les teneurs obtenues peuvent être alors plus de 10 fois supérieures à celles présentées dans le Tableau 1.5. C'est le

cas de Végifer spiruline cultivée dans les Andes. Johnson & Shubert (1986) [84] ont étudié la biodisponibilité du fer de la Spiruline chez le rat et Puyfoulhoux *et al.* (2001) [85] sur des cellules Caco-2.

Le besoin journalier en Fer d'un enfant de 6 mois à 3 ans est de  $7.10^3$  à  $11.10^3$   $\mu\text{g}$ . Si l'intégralité du fer était biodisponible, une dose de 10 g de spiruline couvrirait de 64 % (teneur basse) à 200 % (teneur haute) des besoins de l'enfant.

#### □ **Zinc**

Le Zinc est considéré comme un micronutriment majeur dans la lutte contre la malnutrition [86]. La spiruline cultivée ne contient généralement que des traces de Zinc (21 - 40  $\mu\text{g/g}$ ). Ces teneurs sont insuffisantes pour que la spiruline soit considérée comme une bonne source en Zinc. En effet, le besoin en Zn d'un enfant de 6 mois à 3 ans est estimé de  $3.10^3$  à  $5.10^3$   $\mu\text{g}$ . Si l'intégralité du zinc était biodisponible une dose de 10 g de spiruline couvrirait de 5 à 10 % de ces besoins.

#### □ **Magnésium**

Le Mg est un élément important pour la santé et une carence est fréquente chez les enfants malnutris [87]. La spiruline est naturellement riche en Mg. PLANES (2002) ont montré par des études sur des cellules intestinales Caco-2 qu'un enrichissement en Mg n'améliorait pas la disponibilité en Mg. Le besoin en Mg d'un enfant de 6 mois à 3 ans est estimé de  $75.10^3$  à  $80.10^3$   $\mu\text{g}$ . Si l'intégralité du Mg était biodisponible une dose de 10 g de spiruline couvrirait de 26 à 37 % de ces besoins.

### □ **Potassium**

La teneur en potassium ( $6,4 \cdot 10^3$  -  $15,4 \cdot 10^3$   $\mu\text{g/g}$ ) pourrait être intéressante, notamment dans les pays industrialisés où le rapport potassium/sodium serait trop faible dans la grande majorité des aliments disponibles [69]. Le besoin en potassium d'un enfant de 6 mois à 3 ans est estimé de  $700 \cdot 10^3$  à  $3000 \cdot 10^3$   $\mu\text{g}$ . Si l'intégralité du potassium était biodisponible une dose de 10 g de Spiruline couvrirait pour le moins 2 % et pour le mieux 22 % de ces besoins.

### □ **Sélénium**

Le sélénium est un antioxydant car il agit contre les radicaux libres. Il n'y a pratiquement pas de sélénium dans la spiruline naturelle mais il est possible d'enrichir la Spiruline en sélénium [88, 89]. CASES (1999, 2001, 2002) [90, 91, 92] ont montré la biodisponibilité par les rats du sélénium à partir de spiruline fortifiée. Notons que le besoin en Se d'un enfant de 6 mois à 3 ans est estimé à 20  $\mu\text{g}$ .

### □ **L'iode**

La carence en iode provoque des troubles irréversibles du développement. Il est possible d'obtenir des souches de spiruline capables de fixer l'iode [93, 95] mais les sels d'iodes sont chers et la spiruline ne semble pas concentrer activement cet élément. Notons que le besoin journalier en iode d'un enfant de 6 mois à 3 ans est de 130 à 90  $\mu\text{g}$ .

### □ **Pigments**

La spiruline contient des chlorophylles dont la chlorophylle *a* (typique des végétaux), des caroténoïdes dont le principal est le  $\beta$ -carotène et des phycobiliprotéines telles la phycocyanine et la phycoérythrine. Les teneurs en pigments de *Spirulina platensis* apparaissent dans le Tableau 1.6.

**Tableau 1.6 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10 g de matière sèche de *Spirulina platensis* [80].**

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

Le Tableau 1.6 montre que la cyanobactérie *Spirulina platensis* est une excellente source de phycocyanine. D'après VONSHAK (1997) [95], la fraction protéique pourrait contenir jusqu'à 20 % de phycocyanine. La phycocyanine aurait une activité antitumorale, elle induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses [96]. Elle aurait aussi une activité antioxydante [97, 98]. Elle aurait également un rôle d'hépatoprotection [300]. En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel.

D'après l'étude de FEDKOVIC (1993) [99] les antioxydants comme le  $\beta$ -carotène contenus dans la spiruline permettraient d'inhiber à la fois l'effet mutagène et l'effet régulateur induit par les radicaux libres, préservant ainsi nos tissus [37]. Le  $\beta$ -carotène est d'autre part un précurseur de la vitamine A.

### **1.6 Valeur thérapeutique**

Dans les pays développés, et depuis peu dans quelques régions d'Afrique, la Spiruline est consommée comme complément alimentaire "Bénéfique à la santé" (c'est un micronutriment) [100]. Elle est vendue dans le secteur des produits dits "Bio". La spiruline semble être un complément thérapeutique idéal. Les propriétés thérapeutiques de la spiruline sont utilisées aux traitements de diverses pathologies en se basant sur la composition de cet organisme et les études sur les activités de ses composants.

Elle devrait être administrée très tôt chez le nourrisson et le jeune enfant pour empêcher l'installation des carences qui surviennent surtout à partir du sevrage. La spiruline est très bien acceptée et très bien tolérée [101].

Les différents effets observés sont :

- Limite les carences alimentaires.
- Stimule l'appétit
- Favorise la reprise de poids plus vite qu'avec les seules rations traditionnelles utilisées pour soigner les enfants malnutris.
- Réduit les diarrhées, réduit rapidement les œdèmes dans les cas de KWK (Kwashiorkor).

La spiruline semble être un excellent antiviral [304, 305, 306, 307], un anti herpes [308] et lutte contre le HIV – 1 [102, 103, 107, 108] elle est aussi un anti bactérien [109]. Elle baisse le taux de cholestérol et des lipides sanguins [110, 111]. Son effet hypo-glycémiant a été prouvé [112, 113] ainsi que son effet contre l'hypertension artérielle [111]. La spiruline a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum [114], elle entraîne une réduction du poids corporel chez les obèses [110].

Cette portion magique stimule le système immunitaire [115, 116], elle aurait une activité anti-tumorale [117, 118] et peut induire un mécanisme d'apoptose des cellules cancéreuses [96] : elle prévient le cancer [121, 122, 123]. Toute fois, elle exerce une activité anti-oxydante [124, 125, 126]. Elle est douée d'activité anti-inflammatoire sur les articulations [127], d'un effet protecteur contre les radiations en stabilisant le DNA [122], d'un effet sur la flore intestinale [128]. Elle prévient l'anémie : [129, 130, 131], stimule l'érythropoïèse [132] et diminue la leucoplasie [133, 134].

La spiruline possède une propriété de réduire les métaux lourds : arsénic [135, 136, 137], cadmium [138] et mercure [139], et des substances néphrotoxique de l'organisme [136, 140]. C'est un hépato-protecteur [124, 141, 142], lutte

contre toxicité cardiaque [143, 144], empêche le développement de l'athérosclérose [145] et l'ischémie cérébrale [144, 145, 146] et les agents responsables de la pneumonie [147]. En outre, la spiruline joue un rôle dans réactivité vasculaire [148], elle est anti-plaquette [149], Anti cataracte [150], prévient la rhinite allergique [151, 152, 153] voire même le Parkinson [154]. L'efficacité de la spiruline pour perdre du poids [155] reste à prouver, en outre elle, permet une meilleure croissance de la musculature [156, 157].

### **1.7 Toxines des cyanobactéries**

Certaines cyanobactéries synthétisent des toxines, En ce qui concerne les spirulines, elles ne possèderaient pas les gènes qui assurent la synthèse des cyanotoxines (Isabelle Itean, comm. « Colloque International sur les cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement » [158].

Il faut envisager celle par les micro-organismes et les métaux lourds (tableau 1.7). La forte capacité de la spiruline à fixer certains poly-cations (cadmium, plomb, chrome, cuivre) nécessite d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à la consommation humaine.

**Tableau 1.7 : Normes imposées en France pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries et métaux lourds [39].**

Type d'agent contamination	Norme admise
<b>Métaux lourds (mg/Kg)</b>	<b>Sur poids sec, en ppm</b>
Arsenic	≤ 3
Plomb	≤ 5
Etain	≤ 5
Cadmium	≤ 0,5
Mercure	≤ 0,1
Iode	≤ 5000
<b>Bactéries (germe/g)</b>	<b>Sur produit frais ou sec</b>
Germes aérobies (30°C)	≤ 100000
Coliformes fécaux (44,5°C)	< 10
Anaérobies sulfito-réducteurs (46°C)	< 100
<i>Clostridium perfringens</i>	≤ 1
<i>Salmonella</i> 25 g	Absence dans
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 100

### **1.8 Réactions allergiques**

Dans différentes publications, il est toujours souligné l'excellente tolérance de la spiruline au niveau métabolique. Il n'a jamais été signalé d'allergie [159], jusqu'à l'an 2010 où un travail de Pétrus et son équipe [160] signale la détection de la première manifestation allergique de la spiruline chez un enfant atopique de treize (13) ans, après six (6) heures de son ingestion, des troubles digestifs à type de diarrhée et érythème diffus. L'allergène responsable, la phycocyanine C, a été identifié [161].

## **1.9 Précaution d'emploi**

La dose courante de spiruline utilisée comme complément alimentaire (en dehors des états de malnutrition sévère) se situe aux alentours de 3 à 5 g par jour. En lien direct avec ses propriétés détoxifiantes, lorsque les dosages de départ sont trop élevés, des symptômes que des troubles gastro-intestinaux et/ou des céphalées peuvent survenir. Les sociétés commercialisant la spiruline conseillent donc de commencer par une dose de 1 g / j et d'augmenter progressivement par palier de 1 g tous les trois jours, jusqu'à la dose quotidienne souhaitée [161].

De plus, la spiruline pouvant exercer un effet stimulant chez certaines personnes, il est préférable de ne pas en prendre de soir. Par ailleurs, les personnes souffrant de phénylcétonurie doivent éviter la spiruline car, comme tous les aliments renfermant des protéines, elle contient de la phénylalanine. Aucune interaction médicamenteuse n'a été signalée jusqu'à alors [162].

## **1.10 Législation**

La spiruline répond à la législation sur les compléments alimentaires. décret n° 2006/352 du 20 mars 2006, publié au Journal Officiel du 25 mars 2006, reprend la définition européenne des compléments alimentaires : « *on entend par compléments alimentaires, les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité* ».

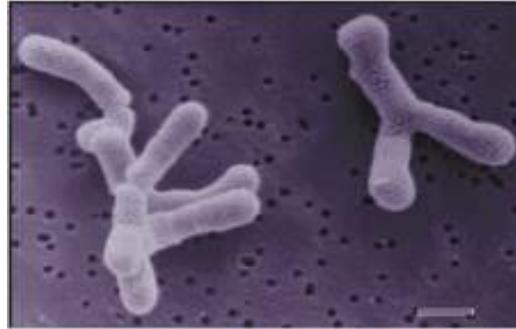
L'étiquetage de ces produits doit comprendre la dénomination de vente de «complément alimentaire », ainsi que d'autres informations comme le mode d'emploi détaillé, la dose journalière recommandée, la liste de toutes les substances utilisées lors de la fabrication, les précautions d'emploi. Ces produits doivent être enregistrés par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, après une évaluation préalable par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

## CHAPITRE II

### LE GENRE *BIFIDOBACTERIUM*

#### 2.1 Historique

Au cours de ses recherches sur la flore du nourrisson en 1899 et 1900, Tissier [163] observe dans les fèces d'enfants des bactéries en Y [164] : découvre des bacilles à Gram positifs incurvés, souvent bifides, qu'il nomme *Bacillus bifidus communis* (Figure 2.1). De 1900 à 1957, cette espèce est incluse dans la famille des *Lactobacillaceae* sous le nom de *Lactobacillus bifidus* [165, 166]. En (1924) Orla- Jensen [167] 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 [168] réalise qu'il existe plusieurs biotypes de *Bifidobacterium*. Il faudra attendre 1963 pour que Reuter [169] découvre sept espèces du genre *Bifidobacterium*. En 1967, De Vries et Stouthamer [170] démontrent la présence chez cette bactérie de la fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) [171]. Le pourcentage de G-C (57,2 – 64,5%) dans l'ADN des *Bifidus* diffère des *Lactobacillus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* [172]. C'est dans la 8<sup>e</sup> édition du Bergey's Manual of determinative Bacteriology [173] que le genre *Bifidobacterium* est reconnu. Il est inclus dans la famille *Actinomycetaceae* de l'ordre des *Actinomycetales* [174].



**Figure 2.1: *Bifidobacterium adolescentis* ; Echelle: 1  $\mu$ m [175]**

## 2.2 Définition

Les bifidobactéries sont des bactéries très utiles pour lutter contre la constipation et les gastro-entérites. La plus connue est le lactobacille. Contrairement aux bactéries du yogourt, ces bactéries ont la particularité de coloniser l'intestin. Leurs présences durables favoriseraient donc une bonne santé intestinale et le renforcement du système immunitaire [176].

## 2.3 Propriétés phénotypiques

### 2.3.1 Morphologie

Ces bactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courtes, coccoïdales, cellules ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînes, disposées en V ou en palissades. Ces bactéries sont Gram (+), non acido-alcool-résistantes, non sporulées, immobiles, anaérobies, bien que quelques espèces tolèrent l'oxygène en présence en  $\text{CO}_2$  [177].

Différentes morphologies cellulaires sont obtenues selon les conditions de culture [178] : concentration en N-acétyl-glucosamine [179], de nombreux acides aminés (alanine, acide aspartique, acide glutamique et sérine) [180], les ions  $\text{Ca}^{++}$  [181, 182]. Le peptidoglycane de la paroi a sa structure illustrée par la figure 2.2. On de la morphologie cellulaire a été réalisée sur un grand nombre de souches remises en culture en anaérobiose dans du milieu TPY (*Trypticase-*

*Phytone-Yeast*). Cette étude a montré que certaines espèces présentaient une forme cellulaire caractéristique qui pouvait aider à leur reconnaissance. Par exemple, la disposition en «V» ou en palissade est caractéristique chez *Bf. angulatum*, l'alignement d'éléments globulaires chez *Bf. catenulatum*, de longues chaînes de cellules régulières chez *Bf. pullorum*,... Mais, le plus souvent, la morphologie cellulaire ne permet pas une bonne différenciation du genre et de l'espèce. Même l'aspect bifide des extrémités des bâtonnets est rencontré aussi chez les genres *Corynebacterium* et *Propionibacterium*. Cette caractéristique a donné lieu à de nombreuses études et à des interprétations contradictoires. Anciennement, les formes vésiculeuses étaient considérées comme des formes de souffrance indiquant une mort prochaine [183].

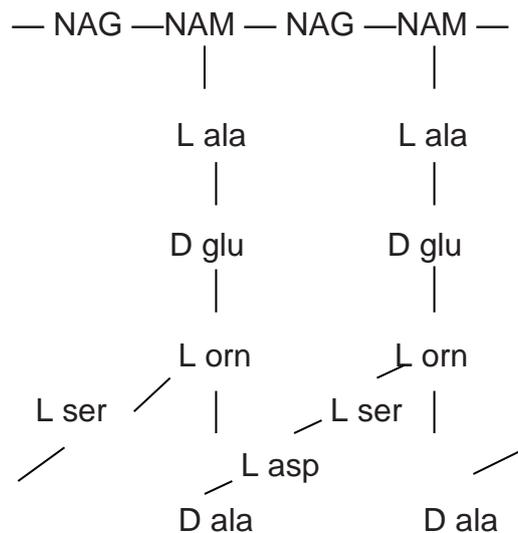
Une autre hypothèse serait que les massues sont des amas d'ADN en rapport avec un processus de conjugaison. Les formes globuleuses ont été assimilées aux protoplastes : il s'agirait de formes ayant une paroi incomplète, apparaissant sur des milieux capables de provoquer la croissance mais incapables de servir à la synthèse des constituants de la paroi [184].

### **2.3.2 Les caractéristiques taxonomiques**

Le genre est caractérisé par la présence d'une enzyme : la fuctose-6-phosphate-phosphocétolase. La température optimale de croissance ne dépasse pas 39°C pour les espèces d'origine humaine, alors que les espèces d'origine animale préfèrent 43°C - 45°C. *Bifidobacterium bifidus* meurt à 60°C [185]. La croissance n'est pas possible à pH 4,5 – 5 et pH 8 – 8,5. Ces bactéries sont glucidolytiques et produisent de l'acide acétique et lactique (3/2 sans CO<sub>2</sub> sauf avec le gluconate) [188].

Ces bactéries produisent des petites quantités d'acide formique, d'éthanol et d'acide succinique. Les acides butyriques et propionique ne sont pas produits. Les espèces sont en général catalase (–) sauf *Bf. indicum* et *Bf. asteroides*. La présence d'α-galactosidase différencie rapidement les *Bifidobacterium* des *Lactobacillus* [187-189].

Chez l'homme, les *Bifidobacterium* sont des commensaux de la bouche, de l'intestin, des bronches et du vagin. Chez l'animal, ils sont surtout mis en évidence dans la flore intestinale. De plus, on les trouve en grandes quantités dans les eaux résiduaires. Chacun pense à les utiliser comme marqueur d'une contamination fécale d'origine soit humaine soit animale. La plupart des espèces humaines sont d'origine soit intestinale, soit vaginale. *Bf. bifidum* var. a est intestinal, *Bf. bifidum* var b domine la flore fécale du nourrisson au sein. Le *Bf. infantis* est isolé de fèces de nourrisson et d'adulte ainsi que de la flore vaginale [190] mais on le trouve également chez le veau avant sevrage. Les *Bf. breve* et *Bf. adolescentis* ne sont décrit que chez l'adulte au niveau intestinal et fait partie de la population microbienne du rumen. Le *Bf. dentium* est la seule espèce potentiellement pathogène mais physiologiquement identique à *Bf. adolescentis* non pathogène [191 - 193].



NAG = N-acétyl-D-glucosamine

NAM = acide N-acétyl-muramique

L-ala = L-alanine

L-orn = L-ornithine

L-asp = acide L-aspartique

L-ser = L-sérine

D-ala = D-alanine

D-glu = acide d-glutamique

**Figure 2.2 : Structure de peptidoglycane de *Bifidobacterium bifidum* [194].**

### **2.3.3 Spécificités biochimiques et culturelles**

Les *Bifidobacterium* sont strictement anaérobies mais la tolérance à l'oxygène dépend du milieu de culture. Elles se développent sur de nombreux milieux de culture en présence d'un agent réducteurs tel que le chlorhydrate de cystéine ou l'acide ascorbique [195, 196]. Parmi les souches capables de se développer en présence d'oxygène quelques unes restent catalase (-), d'autres deviennent catalase (+).

Les bifidobactéries peuvent se développer sur d'autres milieux tels que le TPY (Trypticase peptone yeast) et le milieu Columbia Agar modifié par Beerens (1990) [197]. Ce dernier est sélectif et électif pour les bifidobactéries lorsque le pH est ajusté à 5 par l'action de l'acide propionique [198]. Il existe un 3<sup>ème</sup> milieu appelé Bacto Brawn Anaerobic Agar Actinomyces Broth, [199]. Pour le dénombrement des bifidobactéries deux milieux sont utilisés [200]. Le premier milieu, est le transgalactosylate oligosaccharide (T.O.S) agar amélioré par le NPNL (mélange d'antibiotiques, de sulfate de néomycine, de sulfate de paromomycine, d'acide nalidixique et de liel). Le second milieu, est le TOS agar modifié par le remplacement du TOS par L-arabinose.

Sur le plan biochimique, les bifidobactéries se différencient des autres espèces au niveau de la voie de "Bifid Shunt" du fructose-6-P, en produisant 3 moles d'acétate pour 2 moles de lactate [199]. Le processus de la fermentation du glucose par *Bifidobacterium* est présenté dans la figure 2.3 [201]. Toutes les espèces de bifidobactéries sont nitrate-réductase (-) et catalase (-) à l'exception de *Bf. indicaum* et de *Bf. asteroides* qui deviennent catalase (+) en présence d'air.

Toutes les souches accumulent du peroxyde d'hydrogène qui est réduit par la NADH peroxydase. Les aldolase et glucose-6-phosphate déshydrogénase sont absentes et la fructose-6-phosphate phosphocétolase est présente [186]. La fermentation de deux glucoses conduit à la formation de trois acétates et deux lactates. De petites quantités de succinate et de CO<sub>2</sub> peuvent être produites (Figure 2.3) [178].

Les *Bifidobacterium* produisent la thiamine (B<sub>1</sub>), la pyridoxine (B<sub>6</sub>), l'acide folique (B<sub>9</sub>), la cyanocobalamine (B<sub>12</sub>) et l'acide nicotinique (PP). Les vitamines B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> et B<sub>12</sub> sont excrétées [202]. Les *Bf. bifidum* et *Bf. infantis* sont de bons producteurs de thiamine, d'acide folique et d'acide nicotinique contrairement à *Bf. breve*, *Bf. longum* et *Bf. adolescentis*. Les *Bf. breve* et *Bf. infantis* produisent beaucoup de vitamines PP et H (biotine) [202].

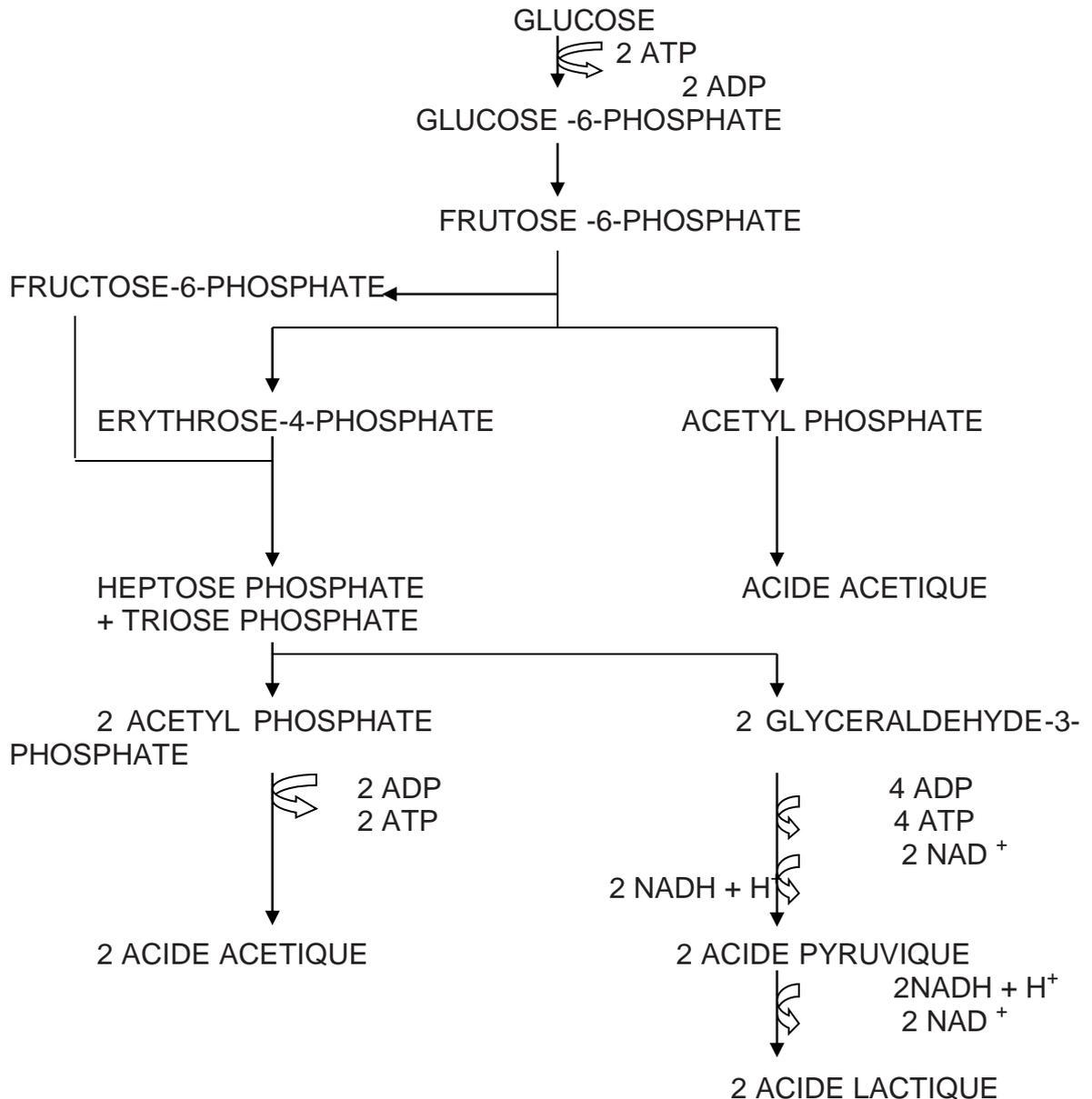


Figure 2.3 : Fermentation du glucose par *Bifidobacterium* [178]

### 2.3.4 Structure de la paroi et de la membrane cellulaire

La paroi cellulaire des bifidobactéries a une structure spécifique aux bactéries Gram positives. Elle est constituée d'une épaisse couche de muréine (peptidoglycane) entremêlée de longues chaînes de polysaccharides ainsi que de protéines et d'acides lipotéichoïques (figure 2.4). La couche de muréine permet à ces bactéries de vivre dans un milieu ambiant qui est fréquemment hypotonique. Les protéines et les acides lipotéichoïques déterminent le caractère hydrophobe de la surface des bifidobactéries [203]. La structure du peptidoglycane des bifidobactéries est plus proche des *Lactobacillaceae* que des *Actinomycetaceae* [178].

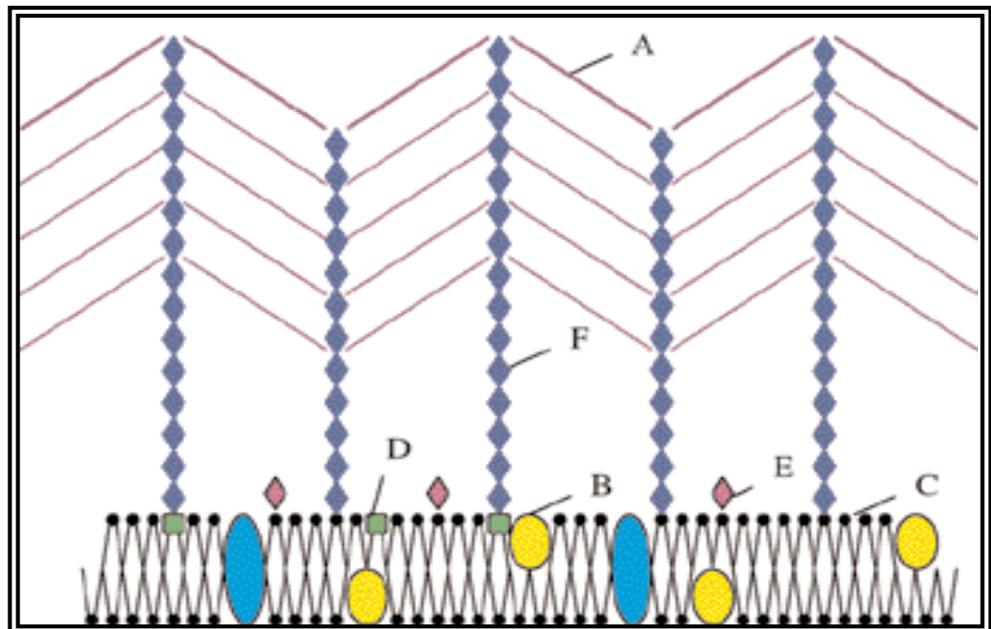


Figure 2.4 : Modèle pariétal d'une bactérie Gram positive [178]

- A : peptidoglycane
- B : protéine
- C : phospholipide
- D : glycolipide
- E : phosphatidylglycolipide
- F : acide lipotéichoïque

La composition en acides aminés de la muréine est variable selon les espèces et les souches d'une même espèce [204, 205]. Ces variations permettent de distinguer *Bf. boum* de *Bf. thermophilus* ou encore *Bf. minimum* de *Bf. subtilis* [206]. Les acides aminés les plus fréquemment retrouvés sont la L-alanine, l'acide glutamique, la L- ornithine et la D- alanine. Pour certaines espèces et même certaines souches d'une même espèce, l'ornithine est remplacée par de la lysine [204].

Au niveau des composants polysaccharidiques de la paroi cellulaire, le glucose, le galactose et le rhamnose sont les plus fréquemment trouvés [178]. Des différences qualitatives et quantitatives sont observées selon les espèces, les souches et les conditions de croissance [204].

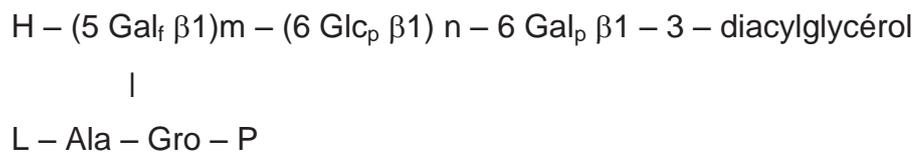
Les acides gras des bifidobactéries sont sensiblement les mêmes que ceux des *Lactobacillus* à l'exception de C18: 0 faiblement détecté chez les seconds [205]. Les acides lipotéichoïques forment des liaisons avec les chaînes de polysaccharides et semblent importants pour l'adhésion cellulaire des bifidobactéries à la paroi intestinale. Plusieurs bifidobactéries ont des lipoglycans de structures variables [204].

La composition en phospholipides est un meilleur critère de différenciation. Seuls les *Bifidobacterium* contiennent :

- des polyglycérolphospholipides et leurs lysodérivés
- l'alanylphosphatidylglycérol
- les lysodérivés du diphosphatidylglycérol [206].

Une approche immunologique est donc intéressante. OP DEN CAMP *et al.* préparent en 1985 [203], des anticorps anti-acides lipotéichoïques de *Bf. bifidum* par couplage avec une protéine immunogène. Ils sont spécifiques du core polyglycérophosphate (essentiellement 1,2) et, pour une faible part, de la partie polysaccharidique.

Des essais de réactions croisées avec des extraits phénoliques d'acides lipotéichoïques de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* montrent que seuls les premiers réagissent. Il est, dès lors, intéressant d'envisager un sérogroupage avec, comme antigènes de groupe les acides lipotéichoïques [203]. Les travaux ultérieurs de FISHER W. (1987) [206] et IWASAKI H. *et al.*, (1990) [207] montrent, en effet l'existence d'une structure macroamphiphile commune aux *Bifidobacterium*, correspondant à :



où  $m = 7$  à  $10$ ,  $n = 8$  à  $15$

Gro-P = glycérophosphate

Ces structures polymériques amphiphiles joueraient un rôle essentiel dans les fonctions membranaires [208, 209]. Les effets des conditions de croissance sur la composition en lipides ont été étudiés par Veerkamp (1977) [210].

## **2.4 Physiologie**

### **2.4.1 Croissance bactérienne**

#### **2.4.1.1 Sensibilité à l'oxygène**

Les *Bifidobacterium* sont des bactéries anaérobies strictes. Mais la sensibilité à l'oxygène varie parmi les souches dans de grandes proportions [189]. Les souches peu sensibles à l'oxygène pourraient disposer d'une faible activité catalasique détruisant les traces d' $\text{H}_2\text{O}_2$  formées. Une autre hypothèse explique l'absence de sensibilité par le fait que le NADH oxydase de ces souches ne forme pas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Chez les moyennement sensibles à l'oxygène, on observe souvent une accumulation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui bloque l'activité de la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Par contre, certaines extrêmement sensibles à l'oxygène

réprimerait la prolifération microbienne par l'intermédiaire d'un potentiel d'oxydoréduction trop élevé [211].

#### **2.4.1.2 pH / Température**

La plupart des bifidobactéries d'origine humaine poussent à une température optimale de 36 à 38°C [205]. Alors que celles d'origine animale supportent des températures plus élevées (43 – 45°C). En dessous de 20°C, leur croissance n'est plus détectable, ainsi qu'à des pH inférieurs à 5,0 ou supérieurs à 8,0; l'optimum étant compris entre 6,6 et 7 [211].

#### **2.4.1.3 Sensibilité aux antibiotiques**

Les bifidobactéries sont sensibles aux pénicillines telles que l'ampicilline ou la pénicilline G, aux céphalosporines de première génération, aux tétracyclines, aux macrolides tels que l'érythromycine, aux lincosamides tels que la clindamycine, bacitracine, vancomycine et enfin au chloramphénicol.

Elles sont par contre résistantes aux aminosides tels que la néomycine, la kanamycine, l'acide nalidixique la gentamycine, et la streptomycine. Une résistance aux polymyxines telles que la polymyxine B a également été observée ainsi que pour le thriméthoprime et le metronidazole [212]. Les mécanismes de résistance sont encore peu connus [213]. La résistance intrinsèque à la néomycine et à la kanamycine a été largement exploitée pour améliorer la sélectivité des milieux de culture. Des limites sont cependant observées à cause de la grande variabilité entre les espèces [214].

#### **2.4.1.4 L'activité antimicrobienne**

Les activités antimicrobiennes de *Bf. bifidum* et *Bf. longum* sont importantes contre les entérobactéries (*E. coli*, *Enterobacter*), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Ec. faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Bf. longum* a un effet barrière contre *E. coli* chez le rat [215]. Chez les patients leucémiques traités par

chimiothérapie, *Bf. longum* tend à maintenir une microflore intestinale normale [216]. En une semaine *Bf. longum* élimine *E. coli* inoculée par voie intragastrique dans une souris axénique [217]. Cette bactérie affecte l'immunité cellulaire et tumorale. Les diarrhées infantiles à rotavirus sont inhibées par *Bf. longum* [218]. L'implantation des *Bifidobacterium*, stimulé par l'allaitement maternel, a un effet bactériostatique sur *E. coli* et les bactéries Gram négatives [219]. L'acidité stimule les mouvements péristaltiques de l'intestin, ce qui facilite l'élimination des pathogènes [220].

Le *Bf. longum* aurait un effet antitumoral au niveau du foie chez la souris [221]. Les bifidobactéries s'opposeraient aux désordres provoqués chez les prématurés soumis à des traitements antibiotiques [222]. *Bf. longum* régularise le transit intestinal des femmes enceintes [223] et *Bf. breve* restaure la microflore et régularise le transit intestinal des enfants ayant subi des diarrhées [224].

Le lactosérum antimicrobien représente chez l'homme l'élément actif des laits fermentés par *Bf. longum* par exemple. Cliniquement les laits fermentés par *Bf. longum* ont un effet favorable sur la reprise de poids des nourrissons lors de diarrhées à rotavirus ou d'étiologie inconnue. Biologiquement l'absorption du lait fermenté diminue considérablement le taux des protéines hydrosolubles dans les selles.

#### **2.4.1.5 Activité uréasique**

Les souches les plus fréquemment uréolytiques sont celles appartenant à l'espèce *Bf. suis* (80% des souches sont uréolytiques). Toutes les autres espèces possèdent également des souches uréolytiques sauf *Bf. cuniculi*. Les bifidobactéries d'origine humaine sont moins souvent uréolytiques (moins de 10 %) [225].

#### **2.4.1.6 Anaérobiose**

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies stricts qui ne se développent pas en présence d'oxygène. Cependant, la sensibilité à l'oxygène est différente selon les souches et les espèces. Il existe en effet des souches moins strictes que d'autres pouvant supporter une tension d'oxygène de 10 cm de mercure. Certaines souches ont même donné naissance à des mutants facultatifs. D'une manière générale, les espèces du genre *Bifidobacterium* ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène, mais survivent cependant [226].

#### **2.4.1.7 Pouvoir pathogène**

Les espèces du genre *Bifidobacterium* ne possèdent ni endotoxine (bactérie Gram positive), ni exotoxine. Ce genre n'est pas considéré comme pathogène. L'injection aux animaux de cultures ou de suspensions microbiennes ne provoque cependant aucune lésion ni aucun trouble. Bien au contraire, sa présence dans l'intestin est une cause ou un témoin de l'équilibre bactérien intestinal, et son implantation dans un intestin dont la microflore est déséquilibrée rétablit rapidement cet équilibre, d'où la thérapie possible des troubles intestinaux par l'ingestion ou l'implantation indirecte de la flore bifide. Ces microorganismes sont de plus en plus régulièrement incorporés à des denrées alimentaires dans l'espoir qu'un apport supplémentaire de cette bactérie dans l'alimentation ait un effet favorable sur la santé humaine [184].

### **2.4.2 Métabolisme des hydrates de carbones**

#### **2.4.2.1 Glucose**

Les lactobacilles fermentent le glucose, soit par la voie d'Embden-Meyerhoff, soit par celle du shunt des hexoses monophosphates. Par contre, les bifidobactéries utilisent le glucose par le shunt du fructose-6-phosphate (fructose 6-P) [178]. C'est une voie tout à fait originale de dégradation des hexoses. Mais curieusement, l'enzyme clé, la fructo-6-P-phosphocétolase peut venir à manquer [217]. Le schéma général proposé ces dernières années est le suivant:

Le glucose est converti en fructose 6-P sous l'action de l'hexokinase et du glucose 6-phosphate isomérase. Le fructose 6-P est transformé en érythrose 4-phosphate, avec comme catalyseur la fructose 6-phosphate phosphocétolase.

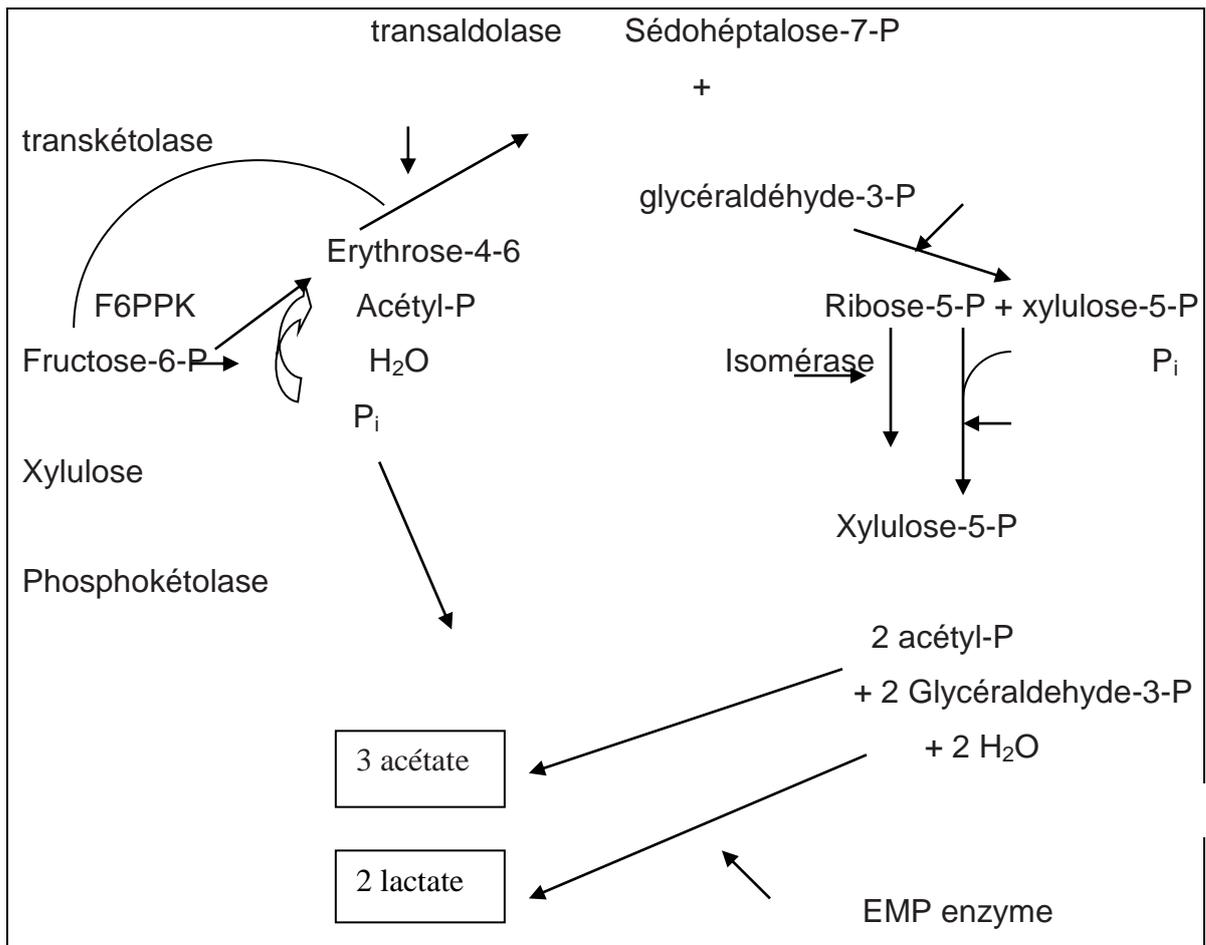
La réaction se poursuit jusqu'à formation de 3 moles d'acétate et 2 moles de lactate. Cependant, ce rapport théorique n'est pas retrouvé en pratique. La plupart des souches de *Bifidobacterium* produisent plus d'acide acétique et moins de lactique.

L'excès d'acide acétique provient de la dégradation de l'acide pyruvique en acides formique et acétique, ultérieurement réduit en éthanol. L'équilibre de fermentation est donc déplacé en faveur de la production d'acide acétique. Mais, là encore, des discordances apparaissent dans la littérature. Aussi le rapport acide acétique/acide lactique retenu pour l'identification des *Bifidobacterium* est l'objet de controverses [217].

#### **2.4.2.2 Galactose**

Le fructose est dégradé par fermentation selon une cascade de réactions aboutissant à la formation d'acétate et de lactate (Figure 2.5). Normalement 75% d'acétate sont formés pour 50% de lactate. L'enzyme clé de ce mécanisme est la Fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) qui scinde l'hexose-P en érythrose-4-P et acétylphosphate.

Cependant, la dégradation du pyruvate en acide formique et acétylphosphate et la réduction de cet acétylphosphate en éthanol peuvent modifier le ratio en faveur d'une production d'acétate, acide formique et éthanol plutôt qu'en faveur d'une production de lactate [182, 186, 218].



**Fig. 2.5 : Dégradation du fructose par fermentation selon une cascade des réactions aboutissant à la formation d'acétate et de lactate [187].**

### 2.4.3 Écologie du genre *Bifidobacterium*

#### 2.4.3.1 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 *Bf. infants* 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 sont absents

[205]. Le lait maternel contient des facteurs, tels que des oligosaccharides comme le galactose, le fucose et le N-acetylglucosamine, qui stimulent la croissance des bifidobactéries [228]. 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 [201].

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 [205]. 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 *Bf. adolescentis* et *Bf. longum* [201]. 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.

#### **2.4.3.2 Les bifidobactéries dans l'intestin humain**

La flore gastro- intestinale a toujours été considérée comme l'écosystème microbien le plus complexe. Il comprend environ 400 espèces différentes réparties le long du tube digestif [229].

##### **2.4.3.2.1 Colonisation microbienne du tube digestif des nourrissons**

Durant la vie intra utérine, le fœtus se développe dans un environnement stérile [230]. A la naissance, on assiste à la colonisation bactérienne du tube digestif, cette flore atteinte au bout de 48 heures un taux compris entre  $10^9$  et  $10^{11}$  germes par gramme de selles, c'est-à-dire un taux voisin de ce qu'on trouve chez l'adulte [231].

Cette population microbienne est fortement influencée par le mode d'allaitement [232], car chez les nourrissons allaités au sein, la flore fécale est caractérisée par une prédominance des bacilles Gram +, non sporogènes en l'occurrence des bifidobactéries, en comparaison avec les nourrissons allaités au lait artificiel qui favorise les *E. coli*, les *Streptococcus* et les anaérobies (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*) [191, 232, 233].

#### **2.4.3.2 Implantation des bifidobactéries dans le tube digestif des nourrissons**

Chez les nourrissons nés par voie naturelle, leur contamination par les bifidobactéries est très rapide, et le lait maternel favorise leur présence dans le tube digestif à des taux trop élevés, généralement supérieurs à ceux des bactéroïdes et des entérobactéries [228], ce qui assure une forte résistance contre les infections entériques [230].

#### **2.4.3.2.3 Distribution des espèces de bifidobactéries dans le tube digestif**

L'espèce *Bf. bifidum* était toujours considérée comme l'espèce caractéristique des bifidobactéries chez les nourrissons [234-236]. Les populations de *Bifidobacterium* varient également selon l'âge. Le colon des enfants nourris au sein possède *Bf. longum*, *Bf. infantis* et *Bf. breve* et les enfants nourris au biberon sont colonisés par *Bf. adolescentis*. Le colon des jeunes enfants montre *Bf. infantis*, *Bf. breve*, *Bf. bifidum* biovar b, *Bf. longum*. Chez les adultes les dominantes sont *Bf. adolescentis* biovars a et b, *Bf. longum* et chez les personnes âgées *Bf. adolescentis* biovar b et *Bf. longum* (tableau 2.1) [237].

**Tableau 2.1 : Distribution des espèces de *Bifidobacterium* chez les adultes et les nourrissons [237].**

Espèce de <i>Bifidobacterium</i>	N° : nombre des échantillons positifs (% du total)	
	Adultes (n = 48)	Nourrissons (n = 27)
<i>Bf. adolescentis</i>	29 (60)	2 (7,4)
<i>Bf. angalatum</i>	2 (4,2)	1 (3,7)
<i>Bf. bifidum</i>	18 (38)	6 (22)
<i>Bf. breve</i>	6 (13)	19 (70)
<i>Bf. catenulatum</i> group	44 (92)	5 (19)
<i>Bf. longum</i>	31 (65)	10 (37)
<i>Bf. infantis</i>	0 (0)	11 (41)
<i>Bf. dentium</i>	3 (6,3)	3 (11)
<i>Bf. gallicum</i>	0 (0)	0 (0)

#### **2.4.3.3 Facteur affectant la viabilité des bifidobactéries dans le tube digestif**

Les bifidobactéries rencontrent, le long du tractus digestif, plusieurs obstacles, selon les conditions locales de chaque région [238].

##### **2.4.3.3.1 L'acidité du milieu**

L'estomac est une partie du tube digestif qui se caractérise par une forte acidité; pH inférieur à 3 [231] voire moins de 1,5 [238].

Pour tester l'impact de l'acidité sur les bifidobactéries, CLARCK *et al.* (1993) [239] et BEZKOROVAINY (2000) [240] ont exposé quelques espèces de bifidobactéries à des acidités différentes, ils ont montré qu'à pH = 3 le nombre initial, pendant 180 min d'exposition à cette acidité. Alors qu'à pH = 2, ce nombre décline doucement pour atteindre le zéro à pH = 1.

Mais de manière générale, les bifidobactéries ont une excellente capacité à résister à l'acidité gastrique et selon un modèle dynamique simulant le transit et les sécrétions physiologiques de l'estomac représentent 67 % des bifidobactéries ingérées [241]. La résistance des bifidobactéries à l'acidité gastrique est fonction de la valeur du pH dans le milieu, le temps d'exposition ainsi que l'espèce de *Bifidobacterium* en elle-même. Les bifidobactéries influencent la maturation et le cycle de développement des entérocytes. Ils sont impliqués dans le remplacement des mucines intestinales et auraient une action immunogène [242-244]. CLARK *et al.* (1993) [239] ont montré que parmi les espèces : *Bf. infantis*, *Bf. longum*, *Bf. adolescentis* et *Bf. bifidum*; *Bf. longum* est la plus résistante aux faibles valeurs du pH.

#### **2.4.3.3.2 Les sels biliaires**

Au niveau de l'intestin grêle, les bifidobactéries rencontrent d'autres obstacles particulièrement les enzymes digestives (Lysozymes) et de fortes concentrations en sels biliaires, qui présentent un fort pouvoir bactéricide [245]. Suite à une étude faite *in vivo*, BEZKOROVAINY (2001) [246] a montré que la résistance des bifidobactéries aux sels biliaires est également fonction de la concentration en ces composés, le temps d'exposition, et l'espèce de bifidobactéries elle-même. Dans cette étude *Bf. infantis* est apparue comme l'espèce la plus résistante aux fortes concentrations en sels biliaires.

De façon générale, les bifidobactéries résistent à 2% de sels biliaires (la concentration maximale de ces composés, qui peut exister dans l'intestin grêle) [245], comme elles résistent même à 8 % de sels biliaires [247].

Pour faire face à ces composés, les bifidobactéries les hydrolysant par une hydrolase. Cependant cela génère des acides biliaires déconjugés plus néfastes [246].

Suite à des travaux réalisés sur des sujets volontaires, plusieurs auteurs ont pu quantifier le taux de survie des bifidobactéries dans le tube digestif. Ils ont montré qu'à l'arrivée au colon, il y avait environ 20 à 40% du nombre initial des bifidobactéries [246, 248] ingérées.

#### **2.4.4 Besoins nutritionnels**

##### **2.4.4.1 Besoins en composés azotés**

Les N-acétylglucosamine et N-acétyllactosamine présents dans le lait stimulent la croissance des bifidobactéries.

Le N-acétylglucosamine est un précurseur essentiel à la synthèse du peptidoglycane. Quand le milieu de culture contient un excès de N-acétylglucosamine, les bifidobactéries ont une forme plus régulière [249].

Les bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium (azote inorganique) comme seule source d'azote [178]. Ces espèces, lorsqu'elles croissent sans source d'azote organique, rejettent des taux considérables d'acides aminés dans le milieu. Par exemple, *Bf. bifidum* peut produire jusqu'à 150 mg/litre de thréonine. En général, les acides aminés les plus souvent produits sont l'alanine, la valine, l'acide aspartique et la thréonine [250]. Les bifidobactéries sont généralement incapables de réduire les nitrates en nitrites.

##### **2.4.4.2 Besoins en sels minéraux**

Les besoins en minéraux ont surtout été étudiés chez *Bf. bifidum*. Cette espèce requiert pour cultiver la présence de fer, de magnésium et de manganèse [251-253]. Le fer peut être présent sous ses deux formes, ferreux ou ferrique.

- Le fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) est assimilé essentiellement à pH acide [252, 254]. Son incorporation est régie par plusieurs facteurs:

- A faible concentration, le transport de la molécule dans la bactérie dépend, entre autres, de la température et de la production d'une substance produite par le microorganisme [254, 255].
- A forte concentration, l'affinité du germe pour le fer diminue et l'incorporation devient indépendante de la température et des sécrétions bactériennes [254]. Le transport de la molécule dépendrait, dans les deux cas, d'une ATP ase membranaire et son incorporation est inhibée compétitivement par le zinc [254, 256].
- Le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) n'est incorporé par *Bf. bifidum* qu'à pH neutre. Il existe deux systèmes d'assimilation selon le mode de présentation du fer. Sous forme monomérique (en présence de citrate), le transport dépend de la température et de la présence d'une substance sécrétée par la bactérie, et est inhibé par différents inhibiteurs métaboliques. Inversement, la forme polymérique est incorporée sans que ces différents facteurs n'interviennent. Les deux systèmes sont saturables par le fer, indiquant ainsi la présence d'un transporteur associé à la membrane et (ou) un nombre limité de sites récepteurs à la surface de la bactérie [253, 254].

Comparant le système de piégeage du fer chez *Bf. breve* à celui décrit chez *Bf. bifidum*, BEZKOROVAINY *et al.*, (1989) [228] observent de grandes similitudes (affinité pour le fer ferreux, mécanisme de piégeage de type enzymatique sensible à la température, existence de deux systèmes de transport) mais aussi quelques différences (plus grande indépendance du système vis-à-vis d'une source exogène de carbone comme le lactose, le pH optimum d'activité est respectivement 6.0 et 5.0). Ces auteurs démontrent en outre la présence d'une ferri-réductase permettant de passer de l'état ferrique à l'état ferrique à l'état ferreux [257]. Ils attribuent au nombre élevé de modèles d'incorporation du fer une signification fonctionnelle.

Les mécanismes d'assimilation du fer ferrique et du fer ferreux de forte affinité sont probablement destinés aux propres besoins de la bifidobactéries. Par contre, le modèle fer ferreux de faible affinité présente, un intérêt dans la protection intestinale de l'enfant: En effet, la virulence des bactéries dépend souvent de la disponibilité en fer du milieu ambiant [258]. Or, chez l'enfant nourri au sein, le pH des selles est voisin de 5 et l'environnement microbien anaérobie du tube digestif favorise la réduction du fer sous forme ferreux, qui peut alors être piégé par les *Bifidobacterium*. La déplétion relative en ions qui en résulte, participerait à la protection observée dans ce groupe humain. Le pH bas, supposé moyen de lutte contre des bactéries invasives [219], est semble-t-il, généré par les bifidobactéries. Or, la production d'acides par ces bactéries est fonction de la concentration en fer du milieu [252], ce qui indiquerait que ce métabolisme dépend de ferroenzymes. Cependant, aucune vérification *in vivo* n'a été faite jusqu'à ce jour, mais le rôle conjoint des *Bifidobacterium* et du fer ne doit pas être négligé.

#### **2.4.4.3 Besoins en vitamines**

Les besoins en vitamines des bifidobactéries ne dépendent pas de leur localisation écologique. Il n'y a pas d'exigences communes pour le genre et, même au sein des espèces humaines, les comportements sont très variables. Cependant, de nombreuses souches humaines sont capables de produire des vitamines (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> et PP) [202] qu'elles libèrent dans le milieu. Cette capacité est variable selon les espèces. DEGUCHI *et al.*, (1985) [202] distinguent ainsi trois groupes, sur la base de la production et de la libération de thiamine, acide nicotinique et acide folique. *Bf. bifidum* et *Bf. infantis* les accumulent en grande quantité alors que *Bf. breve* et *Bf. longum* sont de faibles producteurs. Parmi les espèces faiblement productrices de vitamines, il existe certaines souches de l'espèce *Bf. adolescentis* ne synthétisant aucune vitamine.

Les procédés de régulation diffèrent entre ces trois groupes. Ainsi, l'apport de thiamine dans le milieu réduit le taux de thiamine accumulée en culture chez les souches faiblement productrices (*Bf. longum*), alors qu'il n'affecte pas celui de souches fortement productrices (*Bf. bifidum*).

#### **2.4.4.4 Besoins en facteurs de croissance**

Plusieurs substances ont un effet «facteur de croissance». Le lactulose est très efficace d'une part parce qu'il diminue le pH ambiant et d'autre part parce qu'il permet aux bifidobactéries d'adopter leur forme spécifique en «Y» ou en «V».

Les chaînes courtes de fructo-oligosaccharides appelées «néosugars» sont encore plus intéressantes car en plus de favoriser la croissance des bifidobactéries, elles empêchent la croissance de *Clostridium* et d'*E. coli*. Enfin, d'autres substances comme le lactosucrose, le lactisol et les xylooligosaccharides sont également décrites comme ayant un effet positif sur la croissance des bifidobactéries [249].

### **2.5 Les facteurs bifidigènes**

Les *Bifidobacterium* exigent un certain nombre de facteurs de croissance [185, 253, 259]. Les bifidobactéries sont incapables de se développer dans un milieu totalement synthétique [260, 261]. Leur croissance nécessite à la présence de substances naturellement présentes dans le lait maternel appelées facteurs bifidigènes [262, 263]. Cependant, à chaque espèce de *Bifidobacterium* correspond un groupe de facteurs de croissance spécifiques [230]. Il existe au moins 2 types de facteurs bifidigènes, thermostables pour *Bf. bifidum* et thermolabiles pour *Bf. infantis* [264, 265]. Les *Bf. bifidum* trouve dans le lait de la femme des facteurs résistent à la chaleur, alors que *Bf. infantis* ne se développe pas dans le lait maternel pasteurisé.

Généralement les facteurs bifidigènes sont classés en quatre groupes selon leur nature et leur provenance [266].

### **2.5.1 Facteurs bifidus I**

Les facteurs bifidus I regroupe les glycoprotéines contenant le N-acétyl glucosamine, le glucosamine ou le galactosamine [266]. On les rencontre dans différentes sécrétions humaines:

Le liquide amniotique et le lait maternel en contiennent (sous la forme de gynolactose) [267, 268]. Ces facteurs stimulent essentiellement la croissance de *Bf. bifidum*. Les mucines de porcs et de rongeurs en présentent également. Ces facteurs sont utilisés comme un nutriment (une source d'énergie) ou un facteur de croissance (entrant dans la composition de la paroi cellulaire) [230, 269].

### **2.5.2 Facteurs bifidus II**

Les facteurs bifidus II regroupe l'ensemble des peptides non glycosylés, obtenus au cours de la digestion par la voie enzymatique par action de la trypsine, la chymotrypsine, l'alcalase ou la papaïne sur la caséine laitières ou autres protéines [266, 269]. 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 [270]. Leurs structures demeurent non caractérisées. Etoth *et al.* (2000) [266] ont caractérisé un fragment peptidique isolé du NRSP "Natural Rubber Serum Powder" qui a cet bifidigène; c'est un décapeptide de poids moléculaire 1075 Da et de séquence : Ala-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Glu-Pro-Thr-Ala.

### **2.5.3 Les oligosaccharides**

Selon Salminen et Salminen, 1997 [270], le lactulose est favorable pour la croissance des bifidobactéries. Le lactulose est un disaccharide composé de galactose et de lactose. Il est obtenu par une caramélisation du lactose. En dehors de son effet bifidogène ce sucre est utilisé dans le traitement des constipations et des affections intestinales [271, 272]. Le raffinose est un oligosaccharide naturel

métabolisé par des espèces de bifidobactéries [273-275]. Il existe même des oligosaccharides de synthèse tels que le fructo-oligosaccharide 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 [276, 277].

Selon WIJSMAN *et al.* (1989) [200] les oligosaccharides de synthèse ont un grand intérêt au laboratoire pour un isolement sélectif des bifidobactéries à partir d'un produit polymicrobien tel que les selles.

#### **2.5.4 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 [278].

Il existe aussi d'autres facteurs bifidigènes tels que l'extrait de malt [279] et l'extrait de levure [280].

### **2.6 Intérêt des bifidobactéries chez les nourrissons**

L'examen des études et des résultats des vingt dernières années, permet une mise à jour des actions thérapeutiques, nutritionnelles et probiotiques des bifidobactéries sur la santé et le bien être générale du nouveau-né [281].

L'idée des effets bénéfiques apportés par les bactéries probiotiques est basée sur la connaissance que la flore intestinale peut protéger l'être humain. Plusieurs travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont montré que la flore intestinale est effectivement une barrière contre les microorganismes pathogènes et opportunistes [281].

### **2.6.1 Intérêt thérapeutique**

Parmi les 3 fonctions les plus importantes des bactéries probiotiques, la première est ce qu'on appelle « l'effet de barrière », qui constitue une stratégie très efficace contre la colonisation du tube digestif par des bactéries étrangères, qu'elles soient inoffensives ou bien dangereuses. Cette fonction protectrice permet également le maintien de l'équilibre de la flore intestinale [282].

Les probiotiques sont reconnus pour leur aptitude à rétablir l'équilibre microbien affecté [281], soit suite à une antibiothérapie [233, 283], soit par des infections entériques. Ainsi plusieurs travaux réalisés *in vitro* ainsi *in vivo* ont prouvé l'effet antimicrobien des bifidobactéries contre plusieurs espèces pathogènes à savoir : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* [163], *E. coli* [284, 285], *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* [281], *Salmonella typhimurium* [286].

#### **2.6.1.1 Intérêt dans les troubles intestinaux**

La muqueuse intestinale agit comme une barrière qui empêche la translocation des bactéries pathogènes et/ ou leurs toxines aux autres organes et tissus [238]. ROOS et KATAN (2000) [283] ont montré que l'ingestion des probiotiques diminue l'impact des ulcères intestinaux.

Lorsque l'on constate le parallélisme existant entre la résistance des nourrissons aux infections intestinaux et la présence en nombre élevé de bifidobactéries on est en droit de se demander si ces bactéries ne sont pas des garants de la bonne santé intestinale. De nombreuses constatations et expériences sont en faveur de cette activité [287].

- **Effet du tampon acétate**

BULLEN *et al.* (1976) [218] dans une étude alimentaire, montre qu'un facteur prévenant la croissance d'*Escherichia coli* et autres Enterobactéries dans l'intestin

des enfants allaités au sein, est l'accumulation du tampon acétate (acide acétique + acétate de sodium) qui exerce un effet bactériostatique sur les gram négatifs et microorganismes putréfiants.

Plus tard la même équipe montre que le tampon acétate est attribué à la prépondérance des bifidobactéries dans les fèces de ces enfants.

En effet, les bifidobactéries et en particulier *Bifidoacterium bifidum* produisent grâce à leur voie fermentaire particulière "bifid shunt", 3 molécules d'acide acétique pour 2 molécules d'acide lactique [288].

Cette quantité importante d'acide acétique amène les matières fécales à un pH acide non neutralisé par le faible pouvoir tampon du lait maternel, lequel contient en outre une forte proportion de lactose et une faible concentration de protéines.

Ces conditions physico-chimiques reproduites dans les laits maternisés ne permettent cependant pas, à elles seules au tampon acétate d'opérer [218].

De plus, il est connu que l'acide acétique a un effet inhibiteur plus important que l'acide lactique [268].

Ceci a été confirmé par GILLILAND S.E. (1989) [289]. Ce dernier, en 1984 avait montré que la stimulation du péristaltisme intestinale par ces acides organiques, permet indirectement l'expulsion des germes pathogènes de l'intestin.

- **Activité antibiotique des bifidobactéries**

Ce point jusqu'à nos jours reste très peu étudié. ANAND (1985) [290] et MATHUR (1987) [291] restent à notre connaissance les seuls auteurs ayant travaillé à ce sujet. Ils ont pu mettre en évidence la production par les

bifidobactéries notamment *Bf. bifidum* d'une substance antibactérienne particulièrement active contre *Escherichia coli*.

Cette substance appelée "*Bifidum*" a été partiellement purifiée et caractérisée comme renfermant deux acides aminés majeurs à savoir le phénylalanine et l'acide glutamique.

#### **2.6.1.2 Intérêt en prophylaxie antitumorale**

Il a été démontré que la présence de la flore avait un impact considérable sur la stimulation de nos fonctions immunitaires. 80% des cellules du système immunitaire sont déployées le long de l'intestin. Les probiotiques permettent de multiplier les cellules macrophages au niveau intestinal.

La fonction protectrice est due à la présence de nombreux enzymes et substances fabriquées par les bactéries, métabolites bactériens. La flore va agir sur de nombreux paramètres physiologiques, sur la vitesse de renouvellement des cellules de l'épithélium colique, évitant le développement de cellules cancéreuses, diminuant le temps de contact avec des substances potentiellement dangereuses (nitrosamines, etc..) et produits toxiques [280].

Toutes ces fonctions sont dues non pas à une seule bactérie mais à l'ensemble des bactéries constituant la flore dominante. Il est important de maintenir son équilibre car plusieurs facteurs peuvent agir sur cet écosystème microbien : prise d'antibiotiques, alimentation déséquilibrée, stress de la vie quotidienne, modification du transit (constipation ou prise de produits laxatifs), maladie. Les conséquences des perturbations de l'écosystème digestif peuvent se résumer à court terme par des désordres intestinaux, un mal être, de la fatigue et peuvent à long terme engendrer des pathologies plus graves : maladies inflammatoires du tube digestif, cancers du colon. Il est donc important de pouvoir pallier à toutes les insuffisances fonctionnelles de la flore digestive et l'ajout de probiotiques constitue un moyen très efficace [280].

MITSUOKA *et al.*, [292] a associé des souris axénique à trois espèces microbiennes: *C. paraprutricum*, *S. faecalis* et *E. coli*. Après un an, ils constatent que tous les animaux présentent des nodules tumoraux à localisation hépatique. Ils reprennent alors cette expérimentation mais en ajoutant un *Bifidobacterium* aux trois espèces précédentes, les animaux ne développent alors plus de tumeur hépatique. L'explication se trouve, peut être dans l'activité enzymatique des *Bifidobacterium* capables de dégrader les N. nitrosamines à activité carcinogène [278].

### **2.6.1.3 Intérêt hypocholestérolémique**

Les résultats de recherche sur les possibilités de contrôles par la microflore intestinale, le taux de cholestérol du plasma, sont de plus en plus fréquents.

HOMMA (1988) [293] a étudié *in vitro* l'influence du *Bifidobacterium* sur le métabolisme du cholestérol des lymphocytes humains. Il a également administré ces bactéries à des rats recevant un régime hypercholestérolémique et qui voient leur taux de cholestérol diminuer. Il a donc conclu que les bifidobactéries affectent l'activité de l'hydroxyméthyle- COA réductase.

### **2.6.2 Action nutritionnelle**

Cette action qui n'est pas toujours spécifique des bifidobactéries est loin d'être négligeable. A nos jours, nous connaissons :

- Une production de vitamines intéressantes tel que les vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> et acide folique [268]. Déjà en 1967 OYAKE, avait montré que l'administration orale de *Bf. bifidum* à des nourrissons de 1 à 2 mois, à raison de 10<sup>9</sup> cellules/jours entraîne des concentrations sanguines et urinaires élevées en vitamines tel que la thiamine.
- Une production d'enzymes digestives tel que (Caseine-Phosphatase humaine) et lysozymes [268].

- Une production d'acides aminés en quantités considérables: en effet, *Bf. bifidum* peut produire jusqu'à 150 mg/L de milieu de culture, de thréonine. Les autres acides aminés généralement produits sont l'alanine, valine et l'acide aspartique [288].
- Une production d'acide lactique de la forme L (+) : cette caractéristique du type fermentaire des bifidobactéries est à souligner car contrairement aux *Lactobacillus* qui produisent de l'acide lactique de la forme D (-) ou DL qui est très peu ou pas du tout métabolisée par le nourrisson alors que la forme L (+) l'est complètement.

Ceci entraîne une diminution des risques d'acidoses de formation de méthémoglobines ou même de perturbations neurologiques [278]. Il est également très important de noter qu'une des actions bien faisantes des bifidobactéries est leur capacité d'adhésion épithéliale.

En effet, le biofilm de bactéries fixées sur les parois épithéliales, fait en sorte de maintenir efficace le mécanisme de production sur place de différents métabolismes bactériens tels que: acide organique, enzymes, vitamines, antibiotiques etc.... et il garantit en même temps, l'inoculation constante et abondante de l'aiment de passage [293].

D'autre part, il s'établit une bonne action de défense contre les bactéries pathogènes et les dégradations causées par les germes de putréfaction sont limitées [296]. Il en résulte un équilibre de toute la microflore intestinale ce qui assure un fonctionnement optimal du tractus digestif en y prévenant l'apparition de manifestations pathologiques.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il n'y a pas de doute concernant la capacité des bifidobactéries et plus particulièrement *Bf. bifidum* a contribué au maintien de l'état de bien être et de santé aussi bien du nourrisson que celle de l'adulte. C'est pourquoi nombreuses sont les tentatives d'implantation des

*Bifidobacterium* chez les nouveaux nés grâce à la fabrication de laits enrichis ou fermentés au *Bifidobacterium*.

### **2.6.3 Adaptation des laits infantiles aux bifidobactéries**

Les bifidobactéries sont des hétérofermentaires qui produisent le L (+) lactate qui est facilement métabolisé par les nourrissons en glucose ou en glycogène contrairement aux lactobacilles qui produisent le D (-) lactate qui n'est pas métabolisé, il est alors excrété dans les urines, ce qui peut provoquer une acidose métabolique [294]. De plus, les bifidobactéries en fermentant le lactose, pallient au problème d'intolérance au lactose rencontré souvent chez les nourrissons [295].

D'autre part, le nombre de bifidobactéries chez les nourrissons allaités au sein est d'environ 92% à 95% de la flore totale alors qu'il est de 20% à 40% chez les nourrissons allaités artificiellement, ou leur flore fécale est prédominé par les entérobactéries, les bactéroïdes et les streptocoques comme c'est le cas chez les adultes [275], cependant BEZKOROVAINY (2001) [246] a montré avec des nourrissons diarrhéiques, que l'ingestion des laits aux bifidobactéries peut rétablir la distribution normale de la flore intestinale infantile.

De ce fait, plusieurs auteurs ont proposé de compléter l'alimentation infantile avec les bifidobactéries [294, 296] ce qui préserve ces nourrissons contre les infections entériques à savoir : les diarrhées dues au Rotavirus et à EPEC; DUFFY (1994) [297] ont montré, suite à une étude faite *in vivo* que les souris à qui on a préalablement donné des bifidobactéries, résistent aux infections au Rotavirus A par rapport au témoin. Comme ils ont observé, suite à une étude statistique, que les incidences de cette infection chez les enfants allaités au sein sont moins graves voire négligeable devant celles observées chez les enfants allaités artificiellement.

## **CHAPITRE III**

### **ALIMENTATION ET MODIFICATION DE LA FLORE INTESTINALE**

La flore bactérienne de l' appareil gastro-intestinal est complexe, elle varie selon les espèces, selon l'âge, selon les régimes alimentaires, selon la culture ambiante et l'utilisation des antibiotiques. À la naissance, le tractus intestinal est stérile et ce n'est que quelques années plus tard que l'écosystème microbien digestif devient identique à celui de l'adulte.

#### **3.1 Etablissement de l'écosystème intestinal**

##### **3.1.1 Chez le nouveau-né**

La colonisation du tube digestif est relativement stéréotypée durant les premiers jours, dépendant en partie de la composition de la flore vaginale et fécale maternelle ; elle est retardée chez les enfants nés par césarienne [298].

La colonisation commence après la rupture des membranes fœtales puis le nouveau-né se trouve brutalement plongé dans un univers bactérien riche et varié et va se coloniser rapidement avec une flore simple à partir des flores maternelles vaginales, intestinales et cutanées et des flores de l'environnement. Continuellement exposé à de nouvelles bactéries, sa flore va ensuite se diversifier [298, 299].

Dès le 3ème jour de vie apparaissent des Bifidobactéries et des Lactobacilles, et dans une moindre mesure Bactéroïdes et Clostridiae. L'implantation de cette flore est directement dépendante du type d'alimentation reçue, des conditions environnementales et de la prescription éventuelle d'antibiotiques [298].

### **3.1.2 A la fin du premier mois**

Des différences très nettes existent dans la composition de la flore intestinale selon le type d'alimentation reçue par le nouveau-né. Ainsi la flore intestinale des enfants allaités est presque exclusivement composée de Bifidobactéries. Les facteurs bifidogènes du lait maternel sont nombreux et ne sauraient être limités aux seuls galacto-oligo-saccharides [298].

- En revanche la flore des bébés nourris avec des laits infantiles est riche en Entérobactéries et en bactéries Gram-négatif. Dès que l'alimentation commence à être diversifiée, la différence entre la flore des enfants nourris au sein et celle des enfants nourris artificiellement s'estompe avec augmentation de la concentration en *Escherichia Coli*, *Entérococci* et *Clostridiale*. Entre l'âge de 1 an et 2 ans, l'enfant acquiert une flore intestinale identique à celle de l'adulte.
- Cette microflore demeure relativement stable au cours de la vie, sauf en cas de changements drastiques de l'alimentation, d'antibiothérapie, ou de modulation par l'ingestion de pré ou probiotiques.

### **3.1.3 Le tube digestif de l'adulte**

Il est colonisé par une microflore très importante ( $10^{14}$  bactéries), implantée essentiellement au niveau colique, avec une grande diversité puisque composée de plus de 400 espèces différentes.

- Les Bifidobactéries font partie de la flore résidente normale, et leur abondance est directement fonction de l'ingestion de laitages fermentés. La composition

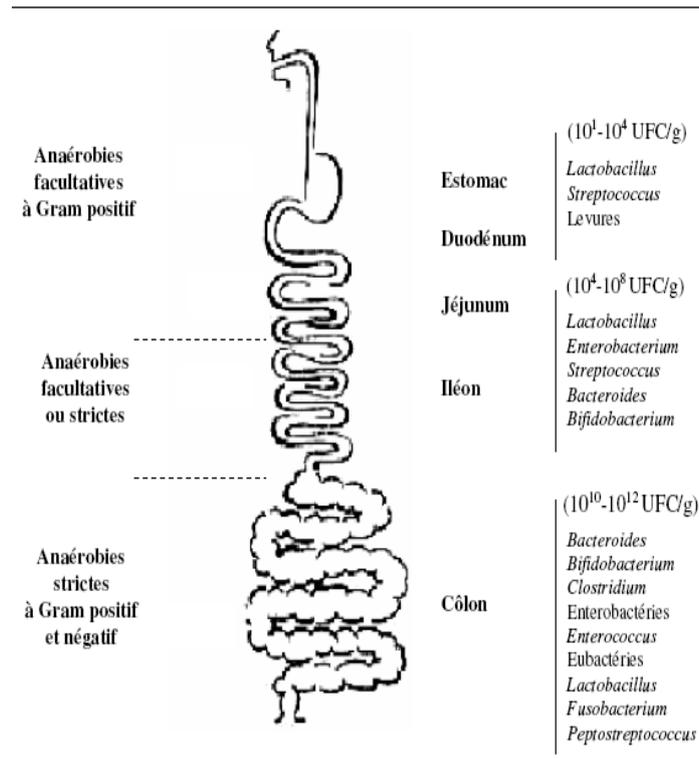
taxonomique de la microflore colique semble être extrêmement stable chez un individu sain, mais très variable d'un individu à l'autre en fonction notamment des habitudes alimentaires.

### **3.2 Composition de la microflore intestinale**

La flore normale est définie par la présence constante de certaines espèces dans l'intestin. Chez un individu donné, il existe également des variations quantitatives et qualitatives en fonction de la région intestinale [300]. Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (Figure 3.1).

L'estomac contient toujours une flore plus faible lorsque le pH est acide comme chez l'homme. En fait, seuls les micro-organismes à Gram positif aérobies ou anaérobies facultatives acidotolérantes sont capables d'y survivre. Cependant, des bactéries anaérobies strictes résistantes à l'acidité gastrique peuvent s'y implanter, c'est notamment le cas d'*Helicobacter pylori* capable de se loger dans la sous-couche du mucus. La principale flore résidente de l'estomac est composée de streptocoques et de lactobacilles.

A l'inverse, l'intestin grêle n'est pas un organe où les bactéries peuvent se multiplier chez un sujet sain, et constitue une région de transit. Lorsque les bactéries y prolifèrent, en particulier parce qu'elles possèdent des facteurs leur permettant d'adhérer à la muqueuse, il s'agit toujours d'un phénomène pathologique. En effet, la croissance bactérienne dans l'intestin grêle est limitée par le transit rapide, les bactériocines des cellules de Paneth [301] et les sécrétions biliaires et pancréatiques [302]. Les premiers segments de l'intestin grêle comportent une flore très faible, constituée seulement par les bactéries gastriques en transit. Au fur et à mesure que l'on se rapproche de l'extrémité distale de l'iléon, une augmentation importante de la flore en nombre et en variété a été observée [303]. Ainsi des espèces anaérobies facultatives à Gram négatif (entérobactéries) apparaissent à côté des espèces à Gram positif.



**Figure 3.1 : Composition de la microflore intestinale humaine [304]**

Les espèces anaérobies strictes augmentent progressivement le long du tractus digestif. Ainsi, au niveau du côlon, leurs proportions deviennent 100 à 1000 fois plus abondantes que les espèces anaérobies facultatives. Le côlon est le segment le plus peuplé ( $10^{10}$  à  $10^{12}$  bactéries/g de contenu). Les bactéries représentent environ 50 % du poids sec des selles [305]. Un profil bactérien quantitatif et qualitatif caractérise la flore du côlon de chaque espèce animale. Certains genres bactériens comme les *Bacteroides*, *Eubactérium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus* appartiennent communément à la flore dominante de plusieurs espèces animales. Cependant, le genre *Lactobacillus* rencontré dans la flore dominante des rongeurs et du porc, ne se trouve que très occasionnellement dans la flore dominante de l'homme. Inversement, le genre *Bifidobacterium* appartenant à la flore dominante chez l'homme n'est pas répertorié chez les rongeurs.

La microflore fécale est constituée de l'ensemble de micro-organismes qui provient des différents biotopes du tube digestif. Elle reflète surtout l'équilibre microbien existant dans les régions caeco-coliques. Les fèces constituent ainsi un

écosystème bactérien. Du fait de la facilité de prélèvement, l'écosystème fécal est le plus étudié chez l'animal et l'homme [306]. Il a été constaté que les populations anaérobies strictes et facultatives sont co-dominantes dans le côlon proximal alors que seuls les anaérobies stricts sont dominants dans le côlon distal et les matières fécales. Par conséquent, les études de l'écosystème bactérien fécal renseignent particulièrement sur la microflore présente dans la partie terminale du côlon.

### **3.3 Prébiotiques, probiotiques et symbiotiques : définitions, utilité, modes d'actions**

#### **3.3.1 Aliments fonctionnels**

##### **3.3.1.1 Définitions**

On appelle aliment fonctionnel « un aliment qui contient (en concentration adéquate) un composé ou une association de composés qui modifie les fonctions de l'organisme de sorte que l'on observe des effets cellulaires ou physiologiques positifs » [307].

Pour rechercher et développer un aliment fonctionnel, il faut [307]:

- Démontrer l'interaction avec une ou plusieurs fonction(s) corporelles
- Une compréhension au moins partielle des mécanismes d'action
- Etablir les effets dans des systèmes biologiques appropriés.
- Formuler des hypothèses solides.
- Tester ces hypothèses dans des études alimentaires chez l'Homme.

Les aliments fonctionnels incluent notamment les prébiotiques, les probiotiques, et les symbiotiques.

### **3.3.2 Probiotique**

#### **3.3.2.1 Définition**

La définition du comité d'experts réunis par la FAO et le WHO en 2001 [308] est la suivante : « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » [308].

Selon DESCHEEMAER (2000) [309], Les probiotiques ou agents biothérapeutiques sont des micro-organismes vivants (microbes, levures), administrés sous forme soit alimentaire (choucroutes, yaourt, lait fermenté, lait battu) soit lyophilisée, et qui exercent un effet bénéfique sur notre santé, en rétablissement un meilleur équilibre au niveau de notre flore intestinale.

Cela pose la question des micro-organismes vivants au moment de leur ingestion, qui ont un effet physiologique bénéfique démontré, mais qui ne survivent pas au cours du transit digestif. La conférence FAO/WHO recommande que seuls les microorganismes qui survivent à leur passage dans le tube digestif soient considérés comme probiotiques. Elle va même plus loin dans l'exigence puisqu'elle recommande que non seulement les probiotiques doivent survivre mais également avoir la capacité de proliférer dans le tube digestif. CHERBUT (2003) [310] n'a pas retenu ces exigences et a considéré que tous les micro-organismes vivants au moment de leur ingestion et exerçant un effet bénéfique sur la santé du nourrisson et de l'enfant en bas-âge étaient des probiotiques [308].

L'écologie microbienne du tube digestif est fortement régulée et ces bactéries "exogènes" ne s'implantent pas de manière définitive : les probiotiques et avec eux leurs effets positifs éventuels, disparaissent rapidement à l'arrêt de la consommation du produit. Les plus utilisées appartiennent à deux familles principales : les bifidobactéries et les lactobacilles. A l'intérieur de ces familles, chaque souche peut présenter des propriétés qui lui sont propres : ce qui est démontré pour une souche n'est pas obligatoirement transposable pour une autre souche, même issue de la même famille.

### **3.3.2.2 Le mécanisme d'action**

Les mécanismes d'action des probiotiques impliqués dans les effets bénéfiques exercés par ces bactéries sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée. Les effets des probiotiques sont classiquement attribués à une modulation direct ou indirecte de la flore endogène ou du système immunitaire local [311]. Ceci suggère qu'un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales, les immunocytes, est nécessaire.

#### **3.3.2.2.1 « Cross-talk » entre bactéries et bactéries/ cellules épithéliales**

L'existence d'une communication ou encore « cross-talk » entre les probiotiques et les cellules présentatrices d'antigène de l'intestin, telles que les cellules M, a été observée par microscopie électronique [312]. Cette interaction suppose que les probiotiques doivent être capables d'atteindre leur lieu d'action en nombre suffisant, de coloniser et de s'y multiplier afin d'exercer leur effet bénéfique. En effet, la consommation de probiotiques induit en général une modification transitoire de la microflore endogène. Outre l'augmentation du nombre de cellules viables de la souche probiotique, les populations totales de lactobacilles et de bifidobactéries sont parfois modifiées. Par exemple, une consommation de *Lb. casei* Shirota ( $10^{11}$  UFC/ j/ 4 semaines) [313] ou de *Lb. plantarum* 299v ( $2 \times 10^{10}$  UFC/j/21 jours) [314] entraîne une augmentation des lactobacilles et des bifidobactéries dans les selles. De plus, l'adhésion et la colonisation des probiotiques semble être essentielle pour le contrôle de la croissance de micro-organismes potentiellement pathogènes d'origine bactérienne, virale ou fongique [315]. En effet, l'administration d'un mélange de 19 lactobacilles pendant 10 jours induit une augmentation de streptocoques et une diminution des clostridies au niveau des biopsies du jéjunum, ainsi qu'une réduction des bactéries anaérobies Gram positif et des entérobactéries au niveau de biopsies rectales [316]. Une autre étude confirme la diminution des clostridies dans les selles après consommation de *Lb. plantarum* 299v pendant 3 semaines

[315]. Le principal mécanisme impliqué dans l'inhibition de bactéries pathogènes est expliqué par l'action de substances anti-microbiennes produites par les bactéries probiotiques et en particulier lactiques. En effet, cette activité antimicrobienne a été largement montrée *in vivo* dans des modèles de souris axénique ou conventionnelles infectées par des souches de salmonelles ou d'*E. coli* [316-321]. Il a également été observé que certains probiotiques réduisent la prolifération des bactéries pathogènes en diminuant le pH intraluminal et en augmentant la production d'acide gras à courte chaîne [322].

Certains probiotiques modifient la glycosylation apicale des cellules épithéliales, ce qui peut être associé à l'inhibition, observée avec certains probiotiques, de l'adhérence apicale intestinale de divers micro-organismes pathogènes. La colonisation de la flore conventionnelle de l'intestin est nécessaire à la fucosylation complète des glycoprotéines des membranes des entérocytes [323]. Ainsi, il a été observé, *in vitro*, que *Lb. casei* DN-144 001 modifie la galactosylation à la surface de cellules épithéliales de lignée HT-29 MTX [324] et par conséquent, inhibe fortement l'infection de ces cellules par le rotavirus.

D'autres probiotiques tels que *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. acidophilus* et *Bf. bifidum* ne dégradent pas les glycoprotéines du mucus intestinal, ce qui serait un gage de leur sécurité [325]. De plus, certains probiotiques augmentent l'expression de mucines sur des lignées intestinales humaines, et modifient ainsi la glycosylation apicale des cellules pouvant être reliée aussi à l'inhibition de l'adhérence intestinale de certains micro-organismes. MACK (1999) [284] ont montré que l'adhésion de *Lb. plantarum* aux cellules épithéliales des lignées HT-29 se traduit par l'augmentation de la sécrétion extracellulaire de mucines *MUC2* et *MUC3* (mucines prédominantes de l'iléon et du côlon) et une inhibition de l'adhésion d'*E. coli* entéroinvasive.

Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'ingestion de certaines souches de lactobacilles ou de bifidobactéries pouvaient modifier de manière reproductible certaines activités enzymatiques endogènes [326].

### **3.3.2.2 Maintien de l'équilibre de la barrière intestinale**

Plusieurs souches probiotiques présentent *in vitro* et *in vivo* un effet favorable sur la fonction barrière de l'intestin augmentant ainsi la résistance transépithéliale et diminuant la perméabilité intestinale. Une réduction de l'augmentation de la perméabilité intestinale chez la rat a été observée après un traitement par *Lb. reuteri* et *Lb. plantarum* dans un modèle de colite expérimentale [327], ou encore par le cocktail VSL#3 dans le modèle de colite spontanée chez la souris déficiente en IL-10 [328]. De la même façon, *Lb. brevis* [329] et *Lb. rhamnosus* GG [330] réduisent l'augmentation de la perméabilité induite par des germes bactériens ou des agents viraux.

L'effet des probiotiques sur la résistance transépithéliale est généralement accompagné par un maintien de l'intégrité fonctionnelle du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales, régulée par les jonctions serrées. *Lb. acidophilus* et *S. streptococcus* vivants préviennent des modifications de la perméabilité induites par les souches *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC) en évitant la déphosphorylation des protéines de jonctions et du cytosquelette. La capacité de ces probiotiques à prévenir la redistribution de l'actine, de l'occludine et de la ZO-1, serait en partie liée à la modulation de la voie de signalisation intracellulaire incluant les MAP- kinases et les Rho-GTPases. La rupture du cytosquelette d'actine associée à l'adhésion de souches d'*E. coli* isolées de patients atteints de la maladie de Crohn est également prévenue par *Lb. GG*. De même, *Lb. plantarum* exerce un effet bénéfique contre une souche d'*E. coli* EPEC altérant les protéines des jonctions serrées [331].

Les effets des probiotiques sur l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes Gram négatif, et sur la stabilisation de la barrière épithéliale sont également associés à une diminution de la translocation bactérienne [319].

### **3.3.2.2.3 Effet immunomodulateur**

La plupart des probiotiques stimulent généralement le système immunitaire de l'hôte de façon non spécifique, en stimulant l'activité phagocytaire et la production d'immunoglobulines A sécrétoires (IgA), néanmoins quelques études suggèrent une diminution de la réponse immunitaire de l'hôte [331]. En effet, les bactéries présentes dans la lumière intestinale sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales, de libérer des composés dans la lumière intestinale susceptibles d'être absorbés par l'épithélium intestinal et d'agir sur les cellules immunitaires [332].

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les probiotiques stimulent la sécrétion de cytokines, en activant la réponse de type Th<sub>1</sub>, par les cellules immunitaires avec des effets dépendants des souches. Ainsi, *S. thermophilus* stimule la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6), l'intensité de la réponse étant souche et dose-dépendantes [331, 332]. De la même façon, chez l'animal et chez l'homme, certaines études ont confirmé également la capacité de différentes souches de lactobacilles et de bifidobactéries à entraîner une réponse immunitaire et une activation de mécanismes de défense non spécifiques. En effet, plusieurs lactobacilles (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii* LA1) aussi bien que des bifidobactéries (*Bf. bifidum*, *Bf. lactis*) sont capables d'augmenter la phagocytose [334, 335] et par conséquent l'élimination des micro-organismes pathogènes.

Une autre étude menée, chez l'homme, a montré que l'ingestion pendant 3 semaines de lait fermenté composé de *Lb. johnsonii* LA1 et de bifidobactéries entraîne une augmentation de la production d'IgA totales et spécifiques chez les sujets sains soumis à un stimulus infectieux avec *Salmonella thyphimurium* atténué [336]. De même, un traitement par *Bf. lactis* ou *Lb. rhamnosus* suivi d'un challenge avec une souche d'*E. coli* entérohémorragique se traduit chez la souris par une augmentation d'IgA [239].

### **3.3.2.3 Les effets bénéfiques**

#### **3.3.2.3.1 Gastroentérologie**

##### ➤ **Prévention et traitement des diarrhées**

Les probiotiques ont fait leurs preuves pour le traitement de 4 types de diarrhées : diarrhées à rotavirus, diarrhées associées aux antibiotiques, diarrhée associée à *Clostridium difficile*, et tourista [337, 338] par inhibition de la production de toxines microbienne produites par ces bactéries pathogènes [309].

##### ➤ **Malabsorption du lactose**

L'absorption du lactose est améliorée lors de l'ingestion de yaourt par rapport au lait, et la concentration de l'air expiré en hydrogène est plus faible [337, 338]. Soit les enzymes endocellulaires (lactase) des bactéries sont libérées lors du passage dans l'estomac, soit les bactéries survivent au passage dans l'estomac et peuvent digérer le lactose présent dans l'intestin [339, 340]. JIANG (1996) [341] ont montré que la consommation de lait contenant des souches de *Bifidobacterium longum* réduit les symptômes de la malabsorption de lactose chez des sujets humains suite à une élévation de la sécrétion de  $\beta$ -galactosidase.

## **1. Anti-infectieux**

### **Modes d'action :**

- production de protéines antibiotiques appelées bactériocines (*Lactobacillus*, Lactobicilline, acidoline).
- Acidifiant le bol fécal.
- Certaines souches de probiotiques diminuent la translocation de bactéries intestinales pathogènes dans le sang.

➤ **Maladies inflammatoires chroniques du gros intestin**

Les études menées *in vivo* ne démontrent pas clairement une amélioration lors de la prise de probiotiques, mais leur activité anti- inflammatoire pourrait être intéressante pour soigner ces affections [337, 338]. Selon DESCHEEMAER (2000) [309], l'acidification engendrée par la fermentation intestinale des oligosaccharides inhibe l'activité protéolytique de la flore pathogène; elle freine donc la dégradation de la mucine produite par les cellules épithéliales et inhibe ainsi l'adhérence des bactéries pathogènes (lactobacilles, bifidobactéries, cocci Gram+, eubactéries, bactéroïdes, entérobactéries) de la muqueuse intestinale. La mucine inhibe aussi la réplication du rotavirus.

Les probiotique permet aussi la réduction des lésions intestinales engendrées par : la radiothérapie et le méthotrexate et l'administration de *Lactobacillus casei* qui diminue l'activité de l'uréase produite par les mauvaises bactéries intestinales. L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée et ammoniacque (néfaste pour la muqueuse et donc pro inflammatoire) et acide carbonique [309].

Elles permettent aussi la réduction de l'activité de certaines enzymes produits par les bactéries pathogènes présentes dans le colon, et qui transforment sinon des procarcinogènes en carcinogènes;

- Nitroréductase, qui transforme les nitrates en nitrites précurseurs des nitrosamines carcinogènes, lesquels peuvent former ensuite des nitroliasons et des composés hydroxy-N-carcinogènes;
- $\beta$ -glucuronidase, qui libère par hydrolyse des molécules potentiellement carcinogènes détoxifiées par conjugaison, comme par exemple le 3-hydrobenzopyrène ou les œstrogènes;
- Hydrolase glycocholique acide, qui transforme l'acide chénodéoxycholique en acide lithocholique carcinogène.

Les probiotiques diminuent le pouvoir mutagène de la N- méthyl-N'-nitro-N nitrosoguanine.

La fermentation produit des acides gras volatils acidifiant la lumière colique, ce qui

- Diminue la quantité d'acides biliaires secondaires mutagènes;
- Accélère le péristaltisme intestinal et le transit colique, raccourcissant ainsi la durée de l'exposition de l'intestin aux substances procarcinogènes.

### **3.3.2.3.2 Affections du tractus urogénital**

Les lactobacilles sont les représentants majoritaires de la flore vaginale, ainsi que de l'urètre et de la région périurétrale des individus en bonne santé. Ils exercent sans doute un rôle pour la prévention des infections uro-génitales similaire à celui qu'ils exercent dans l'intestin : diminution du pH, production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'agents anti- microbiens, compétition pour les sites d'adhésion à la muqueuse [339, 340].

### **3.3.2.3.3 Action hypocholestérolémiant**

Une étude expérimentale menée par Eyssen en 1973, qui a utilisé des animaux axéniques pour démontrer le rôle de la flore digestive sur la cholestérolémie (sans pour autant prouver l'effet d'un genre bactérien plus qu'un autre). Ensuite, l'observation que certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol [288, 339, 340]. Cet effet est encore controversé à l'heure actuelle.

La présence dans le lait fermenté d'acides organique comme l'acide urique, orotique et hydroxyméthylglutarique qui inhibent la synthèse du cholestérol.

Certaines souches de lactobacilles et de bifidobactéries assimilent le cholestérol *in vitro* en présence de bile et dans un milieu anaérobie. *In vitro*,

*Lactobacillus acidophilus* assimile davantage de cholestérol que *Lactobacillus delbruecki ssp bulgaricus*, lequel en assimile plus que *Streptococcus thermophilus* [341].

#### **3.3.2.3.4 Action anticancérogène**

Des études menées sur des hamsters BALANSKY et GYOSHEVA (1999) [342] ont montré que l'effet inhibiteur s'étend à l'appareil respiratoire supérieur, tandis que d'autres études menées sur des rats ou des souris ont montré une inhibition des tumeurs ascitiques d'Erlich ou Meth-A implantées par injection intrapéritonéale [343, 344] ou des rhabdomyosarcomes chimioinduits [345]. Chez l'Homme, l'ingestion de *Lactobacillus casei* ssp. Shirota exerce un effet préventif sur la récurrence de cancer de la vessie [346].

#### **3.3.2.3.5 Régulation du système immunitaire**

La stimulation du système immunitaire joue certainement un rôle majeur dans l'action anticancérogène des probiotiques, tant au niveau local [347], qu'au niveau systémique [345]. Les probiotiques stimulent des macrophages, ce qui entraîne une sécrétion accrue d'hydrolases lysosomiales, et l'activation du plasminogène, de la collagénase et des lymphocytes. Ils stimulent le l'IgA, le  $\gamma$ -infection par les lymphocytes T et les lymphocytes NK [309].

### **3.3.3 Prébiotique**

#### **3.3.3.1 Définition**

Un prébiotique est défini comme « un ingrédient alimentaire non digestible qui produit un effet bénéfique chez l'hôte en stimulant de manière sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou plusieurs espèce(s) bactérienne(s) dans le côlon » [307, 348, 349]. Cette définition ne met pas l'accent sur une population bactérienne en particulier [350].

On admet de façon courante qu'un prébiotique augmente le nombre des bifidobactéries et des bactéries productrices d'acide lactique, car ces groupes bactériens pourraient être bénéfiques pour l'hôte. Néanmoins, il pourrait exister des prébiotiques stimulant la prolifération et/ou l'activité d'autres groupes bactériens de la flore intestinale. Parmi les nombreux candidats prébiotiques, les plus connus et étudiés sont les fructanes (FOS : fructo-oligosaccharides, oligofructose, et inuline) et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS). Le lactose qui échappe à la digestion dans l'intestin grêle de l'enfant est également un prébiotique [351], et plusieurs travaux ont montré que du lactose pouvait parvenir dans le côlon chez le nourrisson [352]. De nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation de prébiotiques (xylooligosaccharides, isomaltooligosaccharides, glucooligosaccharides, etc.). Certains amidons résistants et des sucres alcools pourraient aussi avoir des propriétés prébiotiques. Le lactulose est également un prébiotique. Néanmoins, le groupe a limité son analyse aux seuls produits déjà utilisés en alimentation infantile, à l'exclusion des autres ingrédients réservés soit à d'autres usages (pharmacie), soit encore insuffisamment caractérisés pour leurs propriétés prébiotiques chez l'enfant [350].

L'ingrédient prébiotique doit être parfaitement caractérisé. Les produits ou organismes à l'origine de l'ingrédient doivent être connus et caractérisés, qu'il s'agisse d'un ingrédient isolé d'un produit végétal, animal ou microbien, ou d'un ingrédient produit par synthèse chimique ou microbienne. Les procédés

d'obtention doivent être décrits. De plus, les ingrédients prébiotiques étant souvent composés d'un mélange de molécules, les molécules actives doivent être identifiées et caractérisées, et leur concentration dans le produit doit être précisée. Enfin, les microorganismes ciblés par l'ingrédient prébiotique et ses mécanismes d'action devraient aussi avoir été recherchés et précisés autant que possible [350].

### **3.3.3.2 Les galacto oligosaccharide**

Les galacto oligosaccharides sont considérés comme de bons candidats prébiotiques dans la mesure où ils sont naturellement présents dans le lait féminin et dans le lait de vache. Les études montrant leur impact sur la flore intestinale ont été menées surtout chez le rat, et pour quelques unes chez l'homme, mais ont nécessité l'existence préalable intra-luminale de bifidobactéries [298].

### **3.3.3.3 Le lactulose et le lactitol**

Le lactulose est un disaccharide de synthèse utilisé comme médicament dans le traitement de la constipation et de l'encéphalopathie hépatique. L'oligofructose prébiotique se trouve naturellement dans de nombreux aliments tels que le blé, les oignons, les bananes, le miel, l'ail et les poireaux. Il peut aussi être isolé à partir de la racine de la chicorée ou subir une synthèse enzymatique à partir du sucrose [298].

### **3.3.3.4 Les fructo- oligosaccharide**

Les fructo-oligosaccharides (FOS) sont des oligosaccharides contenant du glucose lié à 2, 3 ou 4 unités de fructose en position  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 2), et ayant un degré de polymérisation inférieur à 9. Ce sont le raffinose et le stachyose retrouvés dans certains aliments. Ils sont surtout présents dans les graines de légumineuses. Le topinambour en contient jusqu'à 21%; l'oignon, l'asperge et le blé, le salsifis, le poireau, l'ail, le seigle, la levure, le miel, la bière, la ciboule chinoise, la tomate et la banane en contiennent aussi [298].

On en produit également par voie enzymatique (fructosyl-transférase) au départ du sucrose (= saccharose): ce sont le l-kestose (GF<sub>2</sub>), le nystose (GF<sub>3</sub>) et le 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosylnystose (GF<sub>4</sub>).

#### **3.3.3.5 L'effet bifidogène des prébiotiques**

Ainsi que leur action immunitaire et métabolique potentielle font penser qu'ils peuvent avoir un effet bénéfique notamment dans le cadre de la prévention des infections intestinales. Cependant ces effets semblent être dépendants de l'état de la flore bifidobactérienne avant la prise d'oligosaccharides, d'autre part les données expérimentales actuelles ne permettent pas d'affirmer ce rôle préventif. Il ne faut pas oublier enfin que, si un certain nombre d'éléments, présents dans le lait maternel, ont un effet bifidogène certain, l'effet préventif du lait maternel fait aussi intervenir d'autres facteurs et notamment la présence d'immunoglobulines de type A (2-4,14). L'addition de prébiotiques dans les laits infantiles nécessite vraisemblablement une modification de la réglementation actuelle après que l'on ait pu en démontrer l'intérêt et l'absence d'effet délétère notamment en terme de fermentation abusive [298].

#### **3.3.4 Le synbiotique**

Les synbiotiques sont des combinaisons appropriées de prébiotiques et de probiotiques. Un produit synbiotique exerce un effet pré et probiotique [298].

## **CHAPITRE IV**

### **MATERIEL ET METHODES**

L'ensemble de cette présente étude a été réalisé au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité et de l'emballage C.A.C.Q.E de Tissemsilt et l'hôpital de Tissemsilt.

#### **4.1 Matériel**

##### **4.1.1 Matériel biologique**

###### **4.1.1.1 Souches bifides**

Les souches de *Bifidobacterium* ont été isolées à partir des selles de nourrissons sous allaitement maternel exclusif, sous allaitement artificiel et sous allaitement mixte.

###### **4.1.1.2 Souche d'*Escherichia coli***

La souche d'*Escherichia coli* a été isolée à partir des selles de nourrissons diarrhéiques sous allaitement mixte.

###### **4.1.1.3 Souche spiruline**

La spiruline sèche a été récoltée et séchée dans la région de Tamanrasset.

#### **4.1.1.4 Le lait infantile 1<sup>er</sup> âge**

Il s'agit de lait infantile 1<sup>ère</sup> âge sous la dénomination « Biomil 1 âge ».

#### **4.1.1.5 Les enzymes protéolytiques**

Deux enzymes protéolytiques ont fait l'objet de notre étude : trypsine (Merck from bovine pancreas 40 UI/mg), chymotrypsine (Merck 60 UI/mg).

#### **4.1.2 Milieux de culture**

Plusieurs milieux de culture sont proposés pour isoler les bifidobactéries. Nous avons cependant retenu le milieu Man Rogosa et Sharp (MRS), Colombia et gélose nutritive du fait de sa disponibilité et de sa sélectivité. Concernant les coliformes, nous avons utilisé le milieu VRBL.

#### **4.1.3 Appareillages et verreries**

##### **4.1.3.1 Appareillages**

- Appareil de Kjeldhal de type KJELDIS II « PROLABO »
- Appareil soxhlet.
- Centrifugeuse de type Gerber
- Four Pasteur
- Four à moëlle de type de type HERAEUS
- Étuve d'incubation (30, 37, 44 °C) de type PRODILAB France
- La hotte à flux laminaire de type ASTEC HLF
- Balance analytique de type METTLER TOLEDO
- Microscope optique de type OLYMPUS OPTICAL
- Vortex
- Autoclave de type AVX Electronic
- Réfrigérateur à 4°C. pour le stockage des milieux de cultures et des échantillons
- pH mètre de type HANNA

- Polarimètre

#### **4.1.3.2 Verreries**

- Pipettes graduées : 5, 10 et 25 ml
- Pipettes Pasteur
- Tubes à essais
- Erlenmeyer
- Bécher
- Burette
- Eprouvette graduée
- Entonnoir
- Lames et lamelles du microscope
- Lamelles
- Les matras de Kjeldhal
- Fioles

### **4.2 Méthodes**

#### **4.2.1 Enquête sur les diarrhées infantiles dans le CHU de Tissemsilt**

##### **4.2.1.1 Objectif de l'étude**

L'objet de cette présente étude est l'évolution de la microflore colique aux différentes étapes de l'allaitement du nourrisson.

##### **4.2.1.2 Méthodologie**

L'enquête a été réalisée au niveau de l'hôpital de Tissemsilt dans le service pédiatrie pendant deux mois sur tous les nourrissons hospitalisés ou qui sont venus en consultation externe (contrôle de croissance, conseils diététiques, prise en charge des cas de pathologies courantes) et qui sont sous allaitement maternel

exclusif, sous allaitement artificiel et sous allaitement mixte. La population ciblée est constituée des enfants âgés de 0 à 7 mois. Un questionnaire a été élaboré pour collecter les informations générales relatives aux nourrissons (âge, sexe, poids, type d'accouchement, antibiothérapie, type d'allaitement,.. etc.) (Appendice A).

Il s'agit d'une étude longitudinale qui a concernée 14 nourrissons, initialement sous allaitement maternel exclusif. Des selles ont été recueillies à intervalles réguliers, d'abord sous allaitement maternel (AM) exclusif, établi depuis au moins 10 jours, puis sous AM partiel, 10 jours au moins après l'introduction du lait artificiel, enfin, après un sevrage total d'au moins 10 jours. Le dénombrement immédiat des bifidobactéries, des coliformes a été réalisé sur les milieux sélectifs de MRS et de VRBL, respectivement.

#### **4.2.2 Isolement de bifidobactéries et des coliformes à partir des selles de nourrissons**

##### **4.2.2.1 Échantillonnage**

Les bifidobactéries et les coliformes proviennent des selles fraîches des nourrissons (diarrhéique ou non), allaité exclusivement au sein ou artificiellement ou mixte.

L'échantillonnage est effectué au niveau de l'hôpital pédiatrique de Tissemsilt. Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable.

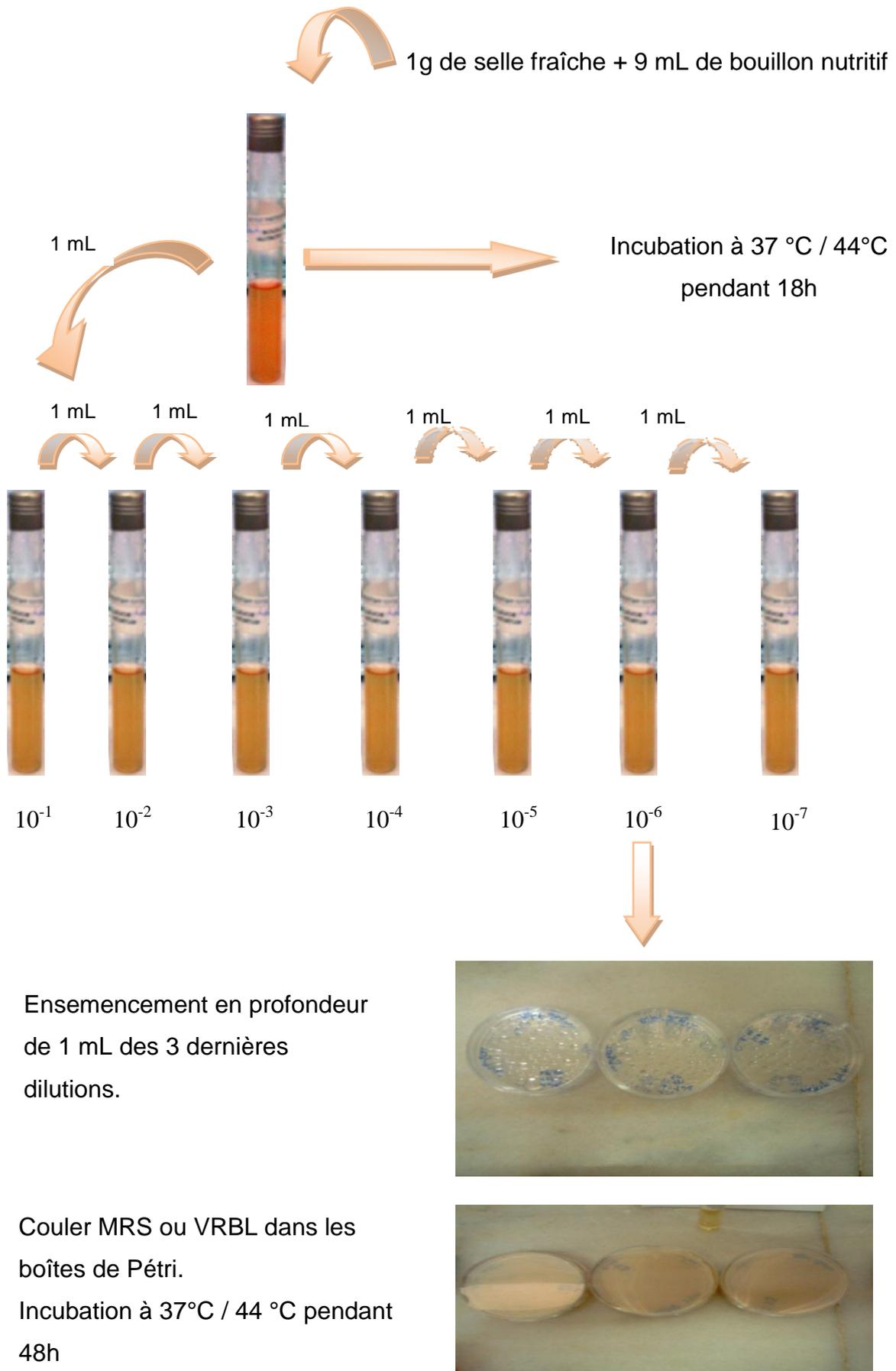
##### **4.2.2.2 Mode opératoire**

1 g de selle est mélangé avec 9 mL d'eau physiologique (9g de NaCl dans 1L d'eau) sous la hotte (dans un environnement stérile). Le mélange qui est appelé solution mère est ensuite mis dans un tube à essai hermétiquement fermé.

On prépare 7 dilutions dans 7 tubes différents de façon à prendre 1 mL de solution à partir de la solution pré-enrichie et ainsi de suite. Chaque tube contient préalablement 9 mL d'eau physiologique. On obtient donc 7 tubes  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  de dilutions.

On prélève 1 mL, à l'aide de pipettes, de chaque tube des trois derniers dilutions :  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et on les ensemence aseptiquement dans 3 boîtes de pétri stériles (ensemencement en profondeur). On réalise 2 essais pour chaque échantillon afin d'avoir des résultats avec précision (Figure 4.1).

On chauffe la gélose MRS et VRBL dans un bain mari afin qu'elle devient liquide à couler dans les boîtes de Pétri (gélose en surfusion à  $50^{\circ}\text{C}$ ). On effectue un mouvement de « 8 » pour homogénéiser le milieu et la dilution. Une fois la gélose se solidifie on les met à l'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  ou à  $44^{\circ}\text{C}$  pendant 48h.



**Figure 4.1 : Protocole d'isolement des bifidobactéries et des coliformes à partir des selles de nourrisson.**

#### **4.2.3 Contrôle de pureté de la souche bifidobactéries**

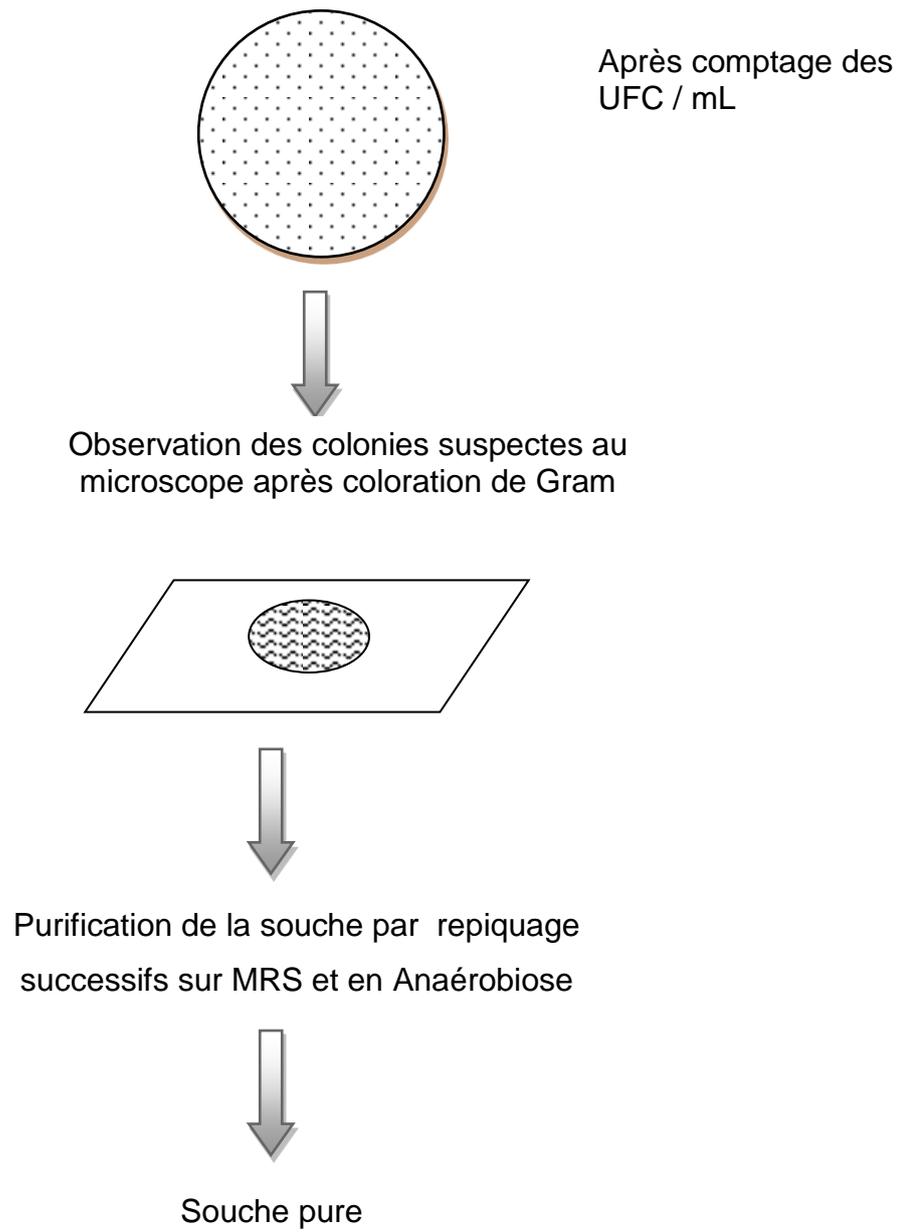
Les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS (Figure 4.2). Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C. Après quoi les souches seront repiquées sur MRS à pH 6,4. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu MRS solide.

#### **4.2.4 Identification biochimique de la souche bifide**

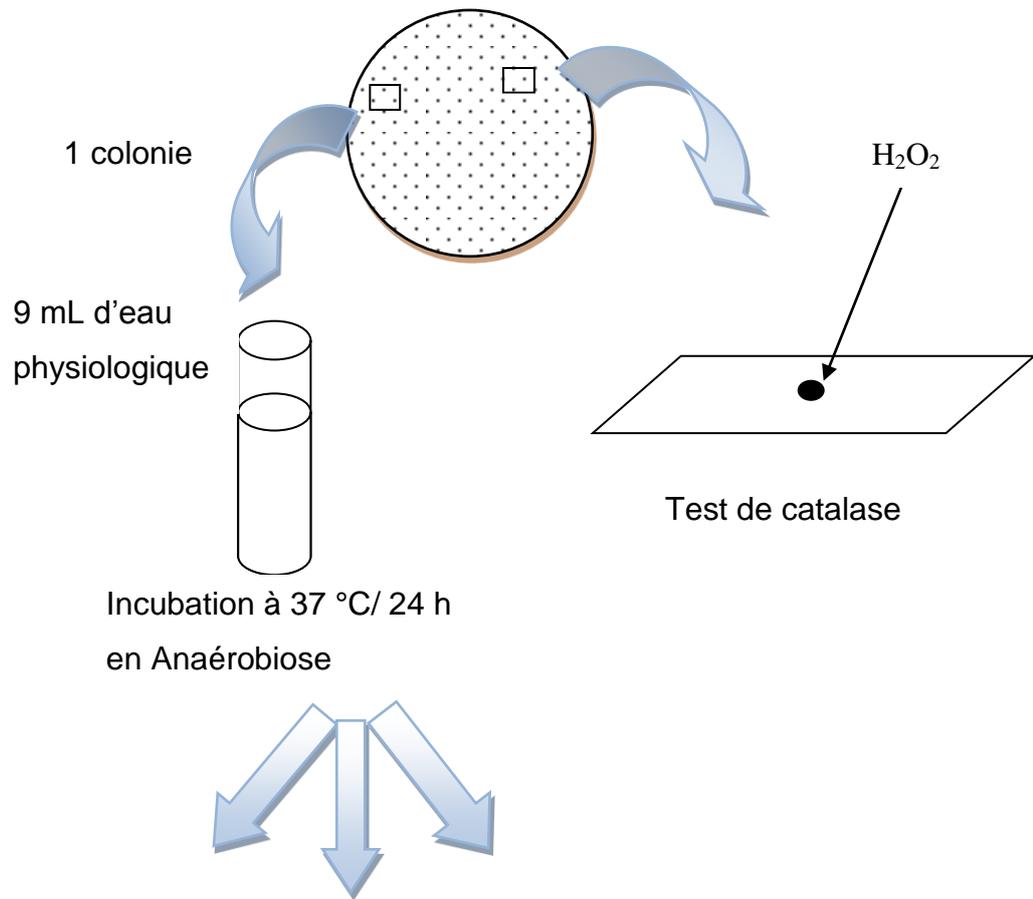
Les quatorze souches de bifidobactéries isolées à partir des selles de nourrissons sous allaitement maternel et artificiels choisie aléatoirement. Ce sont identifiées par L ARPENT (1997) [353]. Des observations macroscopiques et microscopiques, des colorations de Gram, des tests de la catalase, des tests physiologiques et des tests biochimiques de la galerie classique sont réalisés (Figure 4.3, appendice C).

#### **4.2.5 Criblage des souches bifides**

L'effet antagoniste des bifidobactéries est étudié vis-à-vis d'*Escherichia coli*, suivant la méthode de diffusion des puits afin de détecter la production de la substance inhibitrice. Le principe de cette méthode est basé sur la diffusion de l'agent antibactérien dans un milieu gélosé ensemencé au préalable avec un germe cible *Escherichia coli*.



**Figure 4.2 : Protocole d'identification des souches bifides**



### Tests d'identification biochimiques de la galerie classique



Figure 4.3 : Protocole d'identification de *Bifidobacterium* sp.

#### **4.2.6 Sélection des souches bifides selon leur aptitude technologique**

Une première sélection des souches est effectuée sur la base de l'activité bactériocinogène. Puis une deuxième sélection est réalisée sur la base de deux paramètres technologiques, le pouvoir acidifiant et la cinétique de la croissance. Ces deux derniers sont suivis dans de lait infantile 1 ère âge « Biomil1 » reconstitué à raison de 69 g dans 385 mL (selon description sur l'emballage). Le suivi est réalisé toutes les 100 mn pendant 8 h et après 24 heures de fermentation.

L'évolution de la population bactérienne est déterminée par dénombrement sur milieu solide (nombre des UFC/mL).

L'activité acidifiante est caractérisée par quatre paramètres [354] :

$$V_m = \Delta \text{pH} / \Delta T$$

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

$T_m$  : temps où intervient  $V_m$  (en min)

$\text{pH}_i$ : pH initial

$\text{pH}_f$ : pH final

La mesure de la croissance par dénombrement (UFC/mL) permet de calculer le temps de génération (G) ainsi que le taux de croissance ( $\mu$ ) [355]:

$$G = T \cdot \text{Log } 2 / (\text{Log } N_f - \text{Log } N_i)$$

$$\mu = 1 / G$$

$\text{Log } N_f$  : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final ( $T_f$ )

$\text{Log } N_i$  : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial ( $T_i$ )

#### **4.2.7 Contrôle de pureté du lait infantile et de la spiruline**

Le lait infantile 1<sup>ère</sup> âge et la spiruline sont soumis à des contrôles de qualité physico-chimique et microbiologique.

##### **4.2.7.1 Les analyses physico-chimiques**

Dans le cadre de notre étude, ces analyses sont limitées à des analyses de base : teneur en eau, teneur en résidu sec, teneur en cendre, teneur en matière grasse, teneur en lactose et l'acidité titrable. Toutes les analyses sont effectuées en triple répétition.

###### **4.2.7.1.1 Détermination de la teneur en eau (N° 10.97.06 CACQE)**

Selon la méthode thermogravimétrique qui consiste à une dessiccation à  $103 \pm 2$  °C à une quantité déterminée de produit jusqu'à poids constant, à fin d'évaluer l'humidité du matériau à partir de la différence. Les résultats sont exprimés en pourcentage du poids d'eau par rapport au poids initial, sont exprimés par l'équation suivante :

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

Où

H : Taux d'humidité, exprimé en pourcentage (%) en masse

$m_0$  : est la masse en gramme de la capsule vide et son couvercle

$m_1$  : est la masse en gramme de la capsule et le couvercle et la prise d'essai avant dessiccation

$m_2$  : est la masse en gramme de la capsule et le couvercle et la prise d'essai après dessiccation

#### **4.2.7.1.2 Détermination de la teneur en matière grasse**

La matière grasse a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique (méthode de Gerber) pour le lait infantile selon la norme NA 1933 et par la méthode de Soxhlet pour la spiruline.

##### **4.2.7.1.2.1 Pour le lait infantile**

La poudre du lait pesée et dissoute dans l'acide sulfurique dont l'action sert à libérer la matière grasse qui remonte à la surface de la solution et grâce à l'adjonction 40-60°C + d'une petite quantité d'alcool isoamylique, la matière grasse se sépare. La centrifugation permet de diriger la partie graduée du butyromètre.

Le butyromètre est gradué de manière à donner par lecture directe le pourcentage en masse de matière grasse.

##### **4.2.7.1.2.2 Pour la spiruline**

La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans la spiruline. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

La spiruline est pesée et placée dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par de l'éther de pétrole à ébullition (40-60 C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée.

Les capsules de cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Les résultats sont exprimés par équation suivante:

$$\% \text{ matière grasse} = \frac{P_1 - P_2}{P} \times 100$$

P : prise d'essai

P<sub>1</sub> : poids du ballon vide

P<sub>2</sub> : poids du ballon avec la matière grasse

#### **4.2.7.1.3 Détermination de la teneur en protéines**

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 catalyseurs : 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, un titrage par de l'acide chlorhydrique 0,25 N. 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'acidité 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, d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination sur blanc ;

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

6,25 : Facteurs de conversion des protéines de la spiruline.

#### 4.2.7.1.4 Détermination des cendres (NA 672/ NFV 04-208)

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après incinération de la matière sèche de la poudre du lait et la spiruline au four à moufle à  $525 \pm 25^\circ\text{C}$  dans un lent court d'air et pesée du résidu obtenu. Les résultats sont exprimés en pourcentage à partir de l'expression suivante :

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

C: le taux de cendre, exprimé en pourcentage (%) en masse

$m_0$  : la masse en gramme de la capsule vide préparée

$m_1$  : la masse en gramme de la capsule et de la prise d'essai

$m_2$  : la masse en gramme de la capsule et des cendres obtenues

#### 4.2.7.1.5 Détermination de la teneur en lactose (J.O 1983)

Défécation du lait sec dilué, par l'hexacyanoferrate de zinc. Mesure de l'activité optique du filtrat et calcul de la teneur en lactose. Mesure de l'activité optique du filtrat à  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$  et calcul de la teneur en lactose exprimée en pourcentage en masse, donnée par la formule suivante :

$$L = (100 \alpha / \alpha_0 \times I) / 100 / E$$

Ou :

$\alpha$  : représente la rotation optique du filtrat exprimée en degrés et fractions décimales de degrés

$\alpha_0$  : représente le pouvoir rotatoire spécifique du lactose soit 52.4

I : représente la longueur du tube polarimétrique exprimée en décimètres

E : représente la masse de la prise d'essai exprimée en gramme soit 10.

#### 4.2.7.1.6 Détermination de la teneur en sucre totaux dans la spiruline

Nous avons utilisé la méthode de Bertrand. En effet, après extraction des sucres par l'hexacyanoferrate de potassium et l'acétate de zinc. L'oxydation se fait par la solution de Fehling au point d'ébullition.

La teneur des ions de  $\text{Cu}^{+1}$  correspond à la teneur de en glucose, les ions  $\text{Cu}^{+1}$  sont oxydé en ion  $\text{Cu}^{+2}$  par la sulfate ferrique dilué dans l'acide sulfurique. Un titrage des ions  $\text{Cu}^{+2}$  de avec permanganate de potassium 0,1 N.

La teneur en sucre total, exprimée en gramme par litre de spiruline, a été calculée à partir de l'équation suivante:

$$\text{Saccharose (g/L)} = (SI - SR) \times 0,95$$

Ou:

SR: sucres réducteurs avant l'inversion

SI : Sucres totaux après l'inversion

0,95 : Facteur de conversion des sucres de la spiruline

$$S = \frac{X \times 10^{-3} \times 1000 \times K \times V_1}{V_2}$$

Ou :

X : Quantité des sucres interverti correspond au volume de  $\text{KMnO}_4$  0,1 N (Lu à partir de tableau de Bertrand);

K : Facteur de dilution;

$V_1$  : Volume de  $\text{KMnO}_4$  0,1 N (chute de burette);

$V_2$  : Prise d'essai pour le dosage.

#### **4.2.7.1.7 Détermination de l'acidité titrable (10.97.07)**

L'acidité titrable de lait infantile et de la spiruline est déterminée par une méthode volumétrique. Le produit est d'abord dilué et ensuite titré par une solution alcaline (NaOH 0,1 N) en présence d'un indicateur (phénolphthaléine). Le résultat est exprimé en pourcentage en masse d'acide lactique par rapport au lait sec selon la formule suivante :

$$0,01 \text{ g} \times v \times \frac{100}{2} = \frac{v}{2}$$

Ou

V : représente le volume en millilitres, de sodique à 0,111 mol/l utilisé pour le titrage.

#### **4.2.7.1.8 Mesurage du potentiel d'hydrogène (pH) (CHIMIE III - 24)**

Dispersion du lait sec dans l'eau distillée. Mesure directe du pH à l'aide d'un pH-mètre. Le résultat est exprimé en unité de pH à la température 20 °C sous la forme :

$$\text{pH à } 20 \text{ °C} = x, xx.$$

L'écart maximal entre les résultats de deux déterminations parallèles doit être de 0,03 unité pH.

#### **4.2.7.2 Analyses microbiologiques**

Les analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons de lait infantile 1<sup>er</sup> âge et la spiruline visent à contrôler la qualité hygiénique de ces produits.

#### **4.2.7.2.1 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales**

La spiruline et le lait infantile destinés aux analyses microbiologiques dans notre étude sont des produits solides donc pas directement pipetables, de ce fait, ils nécessitent une fluidisation représentée par ce qu'on appelle: la suspension mère. Cette suspension doit être préparée dans des conditions d'asepsie rigoureuse en manipulant sous hotte à flux laminaire, on a procédé à leurs préparations selon la norme ISO 6887.

10 g de lait infantile et de spiruline prélevés sont introduits aseptiquement, puis 90 mL de diluant: tryptone-sel-eau (TSE) ont été ajoutés puis on l'homogénéise. La suspension ainsi préparée correspond à la suspension  $10^{-1}$ . Nous avons procédé à la préparation des dilutions successives décimales de raison 10 à partir de la suspension mère:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Les taux de dilutions utilisés dépendent de la richesse présumée du produit en microorganismes.

Chaque dilution a été réalisée dans un volume de 9 mL de diluant (TSE) en tube à essai stérile, les prélèvements ont été faits à l'aide d'une pipette automatique à embouts jetables délivrant 1 mL à partir de la dilution qui précède celle que nous voulons préparer.

#### **4.2.7.2.2 Contrôle microbiologique de la qualité**

Le choix des espèces microbiennes à rechercher dans nos produits : lait infantile et spiruline a été effectué conformément aux normes Algériennes.

En effet, les analyses microbiologiques reposent sur la recherche et le dénombrement des germes les plus significatifs de l'état hygiénique du produit, nous avons effectué :

- La recherche et le dénombrement des germes totaux qui est un indice de l'état général de la qualité du produit ;
- La recherche et le dénombrement des groupes de germes indicateurs de contamination fécale : les coliformes et les *Clostridium* sulfito-réducteurs ;

- La recherche des germes pathogènes : Les salmonelles et le *Staphylococcus aureus* ;

Les tableaux 4.1 et 4.2 résument les différents germes recherchés au niveau de nos différents produits.

**Tableau 4.1 : Critères microbiologiques des aliments pour enfants en bas âge et nourrisson**

Famille de produit	Produit	Germes recherchés	Références
Les aliments pour enfants en bas âge et nourrissons	<b>Produits déshydratés</b>	Germes aérobies à 30 °C	ISO 4833
	<b>ou instantanés à consommer après adjonction de liquide</b>	Coliformes	12.97.73
		<i>Escherichia coli</i>	CACQE N° 06.97.50
		<i>Clostridium</i> -sulfite-réducteur	ISO 7937
		<i>Staphylococcus aureus</i>	01.05.58 -1 / ISO 6588 -1
	Salmonelles	01.05.60 / ISO 6579	

**Tableau 4.2 : Critères microbiologiques de la spiruline**

Germes recherchés	Références
Germes aérobie mésophile totaux	NA 1207
Coliformes totaux et thermo tolérants	ISO 4831
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA 2696
<i>Salmonella</i>	NA 2688
<i>Clostridium</i> sulfite-réducteurs	ISO 15213

#### **4.2.7.2.2.1 Dénombrement des germes aérobies à 30 °C**

À l'aide d'une pipette stérile a été transférer, dans une boîte de Pétri stérile 1 mL de la suspension mère et les différentes dilutions retenues pour le dénombrement. Environ 15 à 20 mL de gélose PCA à 45°C a été couler sur cet inocula. L'inoculum a été mélangé soigneusement avec le milieu par rotation des boites 5 fois dans un sens inverse, puis 5 mouvements de va-et-vient, puis 5 autres perpendiculairement aux premiers. Puis laisser pour se solidifier.

Après solidification complète, porter les boites ainsi préparées à l'étuve à 30°C (1 ±) pendant 72 heures ± 3 heures.

Après la période d'incubation prescrite, nous avons procédé à l'aide de compteur de colonies au dénombrement des colonies pour chaque boîte retenue. Les boites sont triées on ne retient pour le comptage que les boites lisibles contenant si possible au moins de 300 et plus de 30 colonies.

#### **4.2.7.2.2.2 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux**

La technique utilisée est celle du dénombrement sur milieu solide. A partir de chaque dilution décimale, 1 mL d'inoculum a été mis aseptiquement dans deux boites de Pétri stériles dont la première a servi à la recherche des coliformes totaux et la seconde à la recherche des coliformes fécaux (*Escherichia coli*).

Pour les coliformes totaux et selon la norme (N° 12.97.73) pour le lait infantile et la norme pour la spiruline, 15 mL du milieu sélectif solide : gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) à 45 ±°C 0,5 ont été coulés dans la boîte de Pétri contenant l'inoculum, et un mélange de l'inoculum au milieu de culture a été effectué. Après solidification, environ 4 mL du milieu VRBL ont été coulés de nouveau et laisser se solidifier. Les boites ainsi préparées ont été retournées et incubée dans une étuve réglée à 37 °C pendant 24 h ± 2 h.

Ce qui concerne les coliformes fécaux, le même mode opératoire a été à la différence de la température d'incubation qui sera de 44 °C ( $\pm 1$  °C).

Le dénombrement des colonies caractéristiques violacées de 0,5 mm de diamètre ou plus a été réalisé sur les boîtes ne contenant pas plus de 300 colonies caractéristiques et non caractéristiques.

#### **4.2.7.2.2.3 Dénombrement des *Staphylococcus aureus***

À l'aide d'une pipette stérile 0,1 mL a été transféré de la suspension mère ( $10^{-1}$ ) à la surface de chacune de deux boîtes de milieu gélosé Baird-Parker; on refait l'opération avec le  $10^{-2}$  et les dilutions suivantes si nécessaire. L'inoculum a été étalé soigneusement et le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur. Les boîtes ainsi préparées et séchées sont retournées et incubées dans l'étuve à 37 °C ( $1 \pm 1$  °C) pendant 24 h  $\pm$  2 h, puis les réincuber pendant 24h  $\pm$  2h supplémentaires dans l'étuve à 35°C ou 37°C.

Les colonies caractéristiques noires ou grises, brillantes et convexes de 1 à 1,5 mm et 1,5 mm à 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation de diamètre et entouré d'un auréole d'éclaircissement, sont visées lors du dénombrement.

#### **4.2.7.2.2.4 Recherche de *Salmonella***

La recherche des Salmonelles nécessite trois phases successives :

- 1) Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide : Une prise d'essai de 25 g d'échantillon était ensemencée dans 225 mL de l'eau-peptonnée-tampon (EPT) à température ambiante, puis incubation à 27 °C ( $1 \pm 1$  °C) pendant 18 h  $\pm$  2 h.
- 2) Enrichissement en milieu sélectif liquide : Un tube contenant 10 mL de bouillon SFB est ensemencé avec 1mL de la culture de pré-enrichissement.

- 3) Isolement et identification : Après la période d'incubation, chacun des bouillons récupérés a servi à l'ensemencement, à l'aide d'une anse, la surface de deux boîtes de Pétri contenant la gélose héctoène. Les boîtes renversées ont été placées dans une étuve réglée à 37 °C ( $\pm 1$  °C) pendant 24 h  $\pm$  3 h.

Les colonies a centre noir, entourées d'un halo clair, ont été à considérée lors du dénombrement. Dans le cas de développement bactérien, une identification biochimique et/ ou sérologique seront effectuées sur les colonies développées.

#### **4.2.7.2.5 Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs à 46 °C**

Nous avons procédé à la recherche de ces germes sous leurs formes sporulées.

Après que la solution mère et la dilution  $10^{-2}$  ont subir un chauffage à 80 °C pendant 10 mn puis un refroidissement brutal (sous l'eau de robinet). Nous avons transféré dans deux tubes à essai stérile, 1 mL de chaque dilution, puis on verse environ 18 mL de la gélose Viande-Foie sulfité (VF). Après solidification les tubes sont incubés à 46  $\pm$  1 °C, pendant 24 à 48 h. Après incubation, les spores de bactéries sulfito-réducteur sont noires.

#### **4.2.8 Suivi de la flore bifide *in vitro* dans le lait infantile seul et enrichi avec de la spiruline**

##### **4.2.8.1 La reconstitution du lait infantile adapté 1<sup>er</sup> âge**

La préparation du lait adapté premier âgé a été faite par mesure d'une quantité adéquate de la poudre de lait, celle-ci a été reconstituée dans l'eau minérale à raison de 69 g dans 385 mL d'eau minérale (reconstitution indiquée sur l'emballage).

Une fois la poudre dissoute dans l'eau, le lait est réparti dans des tubes à essais à raison de 9 mL. Le lait est stérilisé à l'autoclave à 110°C. pendant 10 minutes. Le lait est conservé au congélateur à -20°C. jusqu'au moment de son utilisation.

#### **4.2.8.2 La mise au point du lait infantile seul ou enrichi fermenté avec la flore bifide**

Le but de ce travail est d'abord suivre la cinétique de la croissance de la souche d'intérêt toutes les 100 minutes pendant 8h et après 24h de fermentation dans le lait infantile.

##### **4.2.8.2.1 Protocole expérimentale**

Le lait adapté estensemencé avec 1 mL d'une préculture de la flore bifide. Le suivi de l'évolution de la cinétique de la croissance ainsi que le suivi de pH de la bactérie dans le lait artificiel est effectué durant les huit premières heures d'incubation (chaque 100 mn), le dénombrement de la souche dans est réalisé sur gélose MRS (figure 5.5), ainsi un suivi par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm et une étude de la résistance aux antibiotiques.

##### **4.2.8.3 Réactivation de la souche**

Après de nombreux essais infructueux pour réactiver la souche, nous avons abouti à la méthode suivante : la réactivation se fait dans un milieu liquide constitué d'eau distillé (1000 mL), de bicarbonate de sodium (0,2%).

Dans une fiole de 200 mL, on prélève 100 mL de cette solution que l'on chauffe pendant 10 à 20 minutes à 50 à 60 °C puis on ajoute 2 à 4 grammes de poudre sèche de spiruline. Après quelques minutes (20 à 30 min), on agite doucement jusqu'à homogénéisation totale.

#### **4.2.8.4 Tests biochimiques par galerie API 20 E des deux souches bifides sélectionnées**

Les deux souches bifides pures retenues ont été par la suite reconfirmée par une galerie API 20 E (Figure 4.4) et qui consiste en :

- Test ONPG
- Test ADH, LDC, ODC
- Test de citrate
- H<sub>2</sub>S
- Urée
- TDA
- IND
- VP
- Liquéfaction de gélatine
- Fermentation des sucres : MAN, GLU, SOR, RHA, SAC, MAL, AMY, ARA....



**Figure 4.4 : Identification biochimique des souches bifides par la galerie API 20 E**

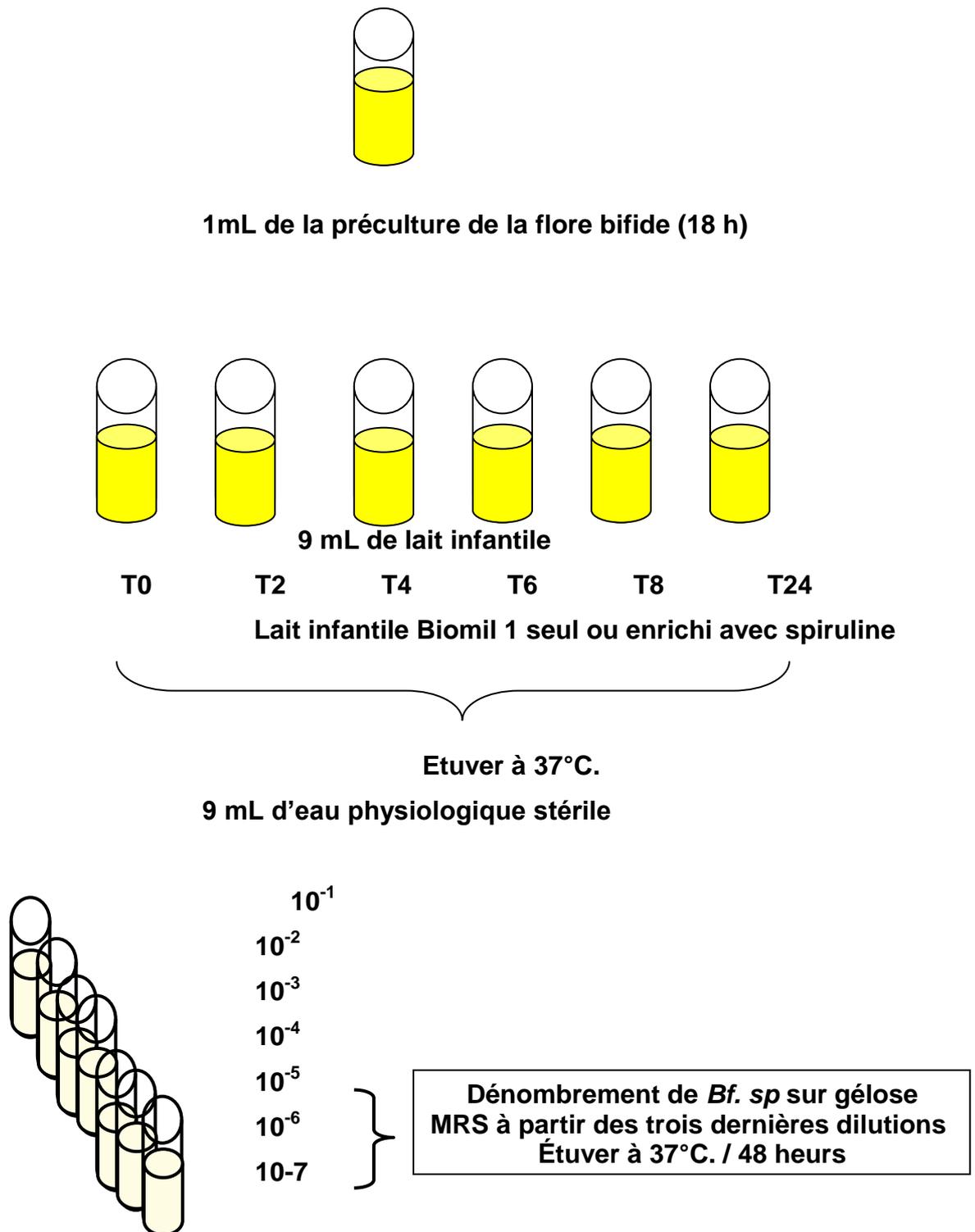


Figure 4.5 : Caractérisation de la flore bifide dans le lait adapté 1<sup>er</sup> âge (Biomil 1)

#### 4.2.8.5 Étude de la sensibilité des souches bifides B<sub>1</sub> et B<sub>16</sub> aux antibiotiques

L'antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action des molécules d'antibiotiques sur une culture bactérienne (Figure 4.6).

##### 4.2.8.5.1 Mode opératoire

- Prélever une colonie bactérienne puis mélanger dans un tube de 9 mL d'eau distillée stérile
- Mettre le tube à l'étuve à 37°C / 30 min
- Verser le contenu du tube sur la gélose nutritive préalablement fondue dans une boîte de Pétri
- Retourner la boîte de Pétri pour verser l'excès du liquide
- Placer la boîte de Pétri à l'étuve pendant 15 à 30 min pour sécher le film liquide rester à la surface de la gélose
- Retirer la boîte puis fixer les disques d'antibiotiques à la surface de la gélose
- Replacer la boîte de Pétri à l'étuve

**Tableau 4.3 : Les différents antibiotiques utilisés**

Code	Antibiotiques	Résultats		
		Résistance	Intermédiaire	Sensibilité
AM	Ampicilline	≤ 13	14 – 16	≥ 17
CRO	Ceftazixone	≤ 13	14 – 20	≥ 21
E	Erythromycine	≤ 13	14 – 22	≥ 23
FOX	Cefoxitine	≤ 14	15 – 17	≥ 18
STR	Streptomycine	6	7 – 9	≥ 10
FA	Acide fusidique	< 15	-	≥ 22
C	Chloramphénicol	≤ 12	13-17	≥ 18
CT	Colistin	≤ 10	-	≥ 11
CZ	Cefazoline	≤ 14	15-17	≥ 18
AX	Amoxicille	≤ 13	14-17	≥ 18
SXT	Triméthprime/Sulfaméthoxazole	≤ 10	11-15	≥ 16
OX	Oxacilline	≤ 10	11-12	≥ 13
CN	Gentamicine	≤ 12	13-14	≥ 15
P	Pénicilline	≤ 16	-	≥ 17



**Figure 4.6: L'antibiogramme des souches bifides**

#### **4.2.8.5.2 Expression des résultats**

Après incubation des boîtes de Pétri, les puits s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

#### **4.2.9 Criblage des souches bifides par la spiruline**

Le criblage des souches bifides à la spiruline a été déterminé par la technique de diffusion en milieu solide MRS à pH = 7 par soit l'utilisation des disques imbibés par la solution de spiruline, soit dans chaque puit de 6 mm, on met 50  $\mu$ L de la solution de spiruline.

Ce test a été utilisé pour étudier l'effet antagoniste de la spiruline vers les bifidobactéries.

#### **4.2.10 Étude de la digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes protéolytique**

La digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes protéolytique a été étudiée par l'utilisation des enzymes suivant : Trypsine (Merck from bovine pancreas 40 UI/mg) et la Chymotrypsine (Merck 60 UI/mg).

On ensemence la spiruline sur gélose nutritive puis on met par piqueur centrale sur gélose l'enzyme protéolytique, ensuite on détermine la zone d'inhibition exempte de développement microbien (un halo) autour des puits ce qu'il signifie de la présence d'effet bactériostatique ou bactériocine de la spiruline vis-à-vis les souches bifides.

### **4.3 Analyse statistique**

Pour l'analyse statistique de nos résultats a été effectuée par le logiciel Statist ITFC, avec un seuil de signification  $\alpha = 0,05\%$ .

#### **4.2.11.1 Le principe de l'analyse de l'ANOVA**

Le principe de l'ANOVA découle de l'hypothèse  $H_0$  qui consiste à dire que toutes moyennes de variables sont égales et que qu'il n'y a aucune différence significative entre elles, cela veut dire qu'on suppose que les facteurs étudiés n'ont pas d'effet sur les variables.

#### **4.2.11.2 Le plan expérimental**

L'analyse de la variance à deux facteurs en randomisation totale. Les deux facteurs ont été :

- Le temps (T0, T2, T4, T6, T8, T24) et les milieux de cultures (LS, LE) pour la variation de pH pour les deux souches bifides et les données de l'antagoniste de la souche B16 avec *E. coli*
- Temps et les deux souches (B1, B16) pour les données de cinétique de croissance ( $\mu$  et G) et les taux de mortalité.

L'établissement de l'ANOVA a été effectué par le calcul de :

- La moyenne générale
- SCE : la somme des carrés des écarts
- SCE<sub>r</sub> : la somme des carrés des écarts résiduels
- CM<sub>F1</sub> ; CM<sub>F2</sub> : les carrés moyens factoriels
- CM<sub>F1,F2</sub> : les carrés moyens inter factoriels
- CM<sub>r</sub> : les carrés moyens résiduels
- $F_{\text{obs.}} = F_{F1} = \frac{CM_{F1}}{CM_r}$  ;  $F_{F2} = \frac{CM_{F2}}{CM_r}$  ;  $F_I = \frac{CM_I}{CM_r}$
- Puis on résume tout dans un tableau appelé : tableau de l'analyse de la variance.

Si la valeur de F théorique (lu à partir de la table F, appendice H) avec un seuil de 5 % est supérieure à celle de F observé donc les résultats sont considérés comme significatifs mais s'elle est inférieure donc les résultats sont considérés comme non significatifs et dans ce cas nous passons à la comparaison des moyennes (CMM).

## **CHAPITRE V**

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **5.1 Résultats de l'enquête**

Notre enquête s'est déroulée dans le service de Pédiatrie de l'hôpital de Tissemsilt. L'analyse de la flore fécale de 14 nourrissons, 12 enfants nés à terme entre 04 et 07 mois et 02 enfants nés prématurés de 35 et 37 jours.

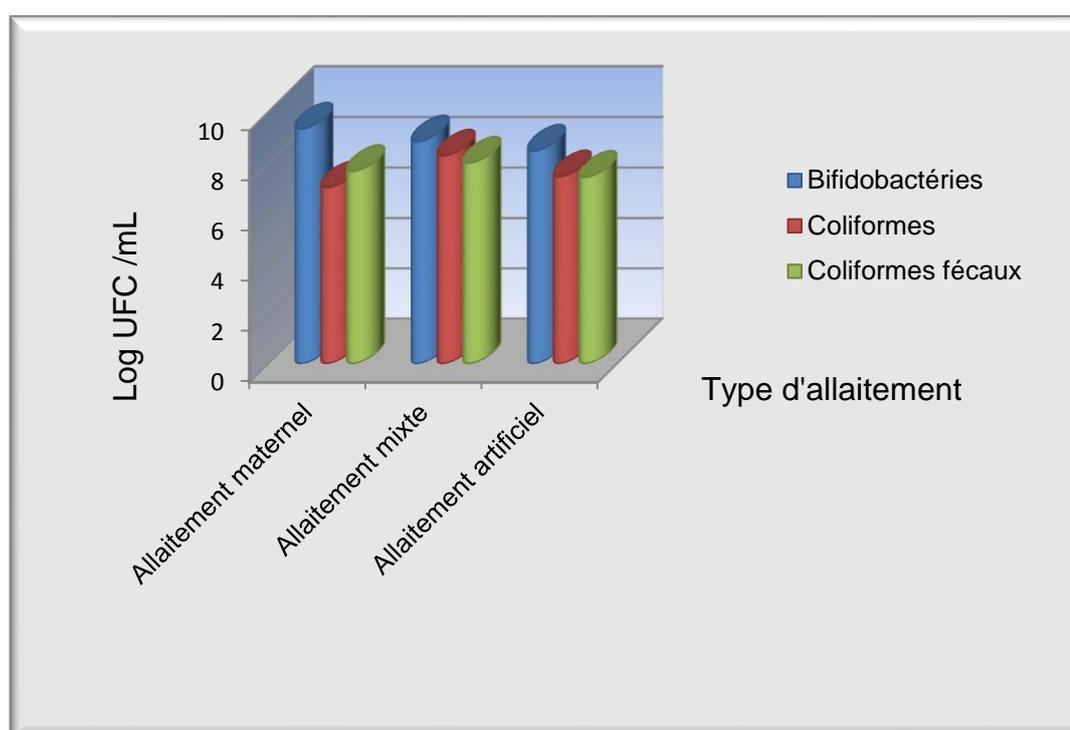
- 05 cas sous allaitement maternel exclusif
- 06 cas sous allaitement mixte et
- les 03 autres nourrissons recevaient des préparations lactées (Biomil, Célia....etc.)

#### **5.1.1 Répartition selon le type d'allaitement**

Les résultats de l'enquête relatifs aux diarrhées infantiles, ont permis d'estimer l'évolution de la microflore colique aux différentes étapes d'allaitement du nourrisson (Tableau 5.1 et figure 5.1).

**Tableau 5.1 : Évolution de la microflore colique aux différentes étapes d'allaitement du nourrisson.**

Type d'allaitement Log UFC/mL	Allaitement maternel	Allaitement mixte	Allaitement artificiel
<b>Bifidobactéries</b>	9,32 ± 0,45	8,81 ± 0,99	8,45 ± 0,36
<b>Coliformes</b>	7 ± 0,26	8,25 ± 0,45	7,43 ± 0,59
<b>Coliformes fécaux</b>	7,64 ± 0,99	7,97 ± 0,22	7,41 ± 0,65



**Figure 5.1 : Évolution de la microflore intestinale aux différentes étapes d'allaitement du nourrisson.**

Il ressort du tableau 5.1 que les nourrissons sous allaitement maternel exclusif de notre échantillon ont développés un plus grand nombre de Log UFC/mL de bifidobactéries de  $9,32 \pm 0,45$  alors que chez les nourrissons sous allaitement mixte et artificiel sont présentes en moins nombre ( $8,81 \pm 0,99$ ) et ( $8,45 \pm 0,36$ ) respectivement.

La microflore intestinale du nouveau-né, composée de seulement quelques genres bactériens pendant les premiers jours, évolue fortement et rapidement en fonction de l'environnement, de l'alimentation et d'une éventuelle antibiothérapie (tableau 5.1).

### 5.1.2 Répartition selon le sexe

Notre échantillon comprend 14 nourrissons dont 06 filles (42,85 %) et 08 garçons (57,14 %) (Tableau 6.2).

**Tableau 5.2 : Évolution de la microflore colique selon le sexe.**

Sexe UFC/mL	Sexe masculin	Sexe féminin
<b>Bifidobactéries</b>	8,95 ± 0,22	9,12 ± 0,35
<b>Coliformes</b>	7,75 ± 0,04	8,10 ± 0,44
<b>Coliformes fécaux</b>	7,09 ± 0,44	8,86 ± 0,25

La figure 5.2 indique une prédominance féminine de la flore colique. C'est le cas des bifidobactéries dont le nombre de Log UFC /mL est de l'ordre de 8,95 ± 0,22 alors que les coliformes sont de l'ordre de 7,75 ± 0,04. Cette prédominance féminine serait liée à une plus grande sensibilité des filles aux diarrhées.

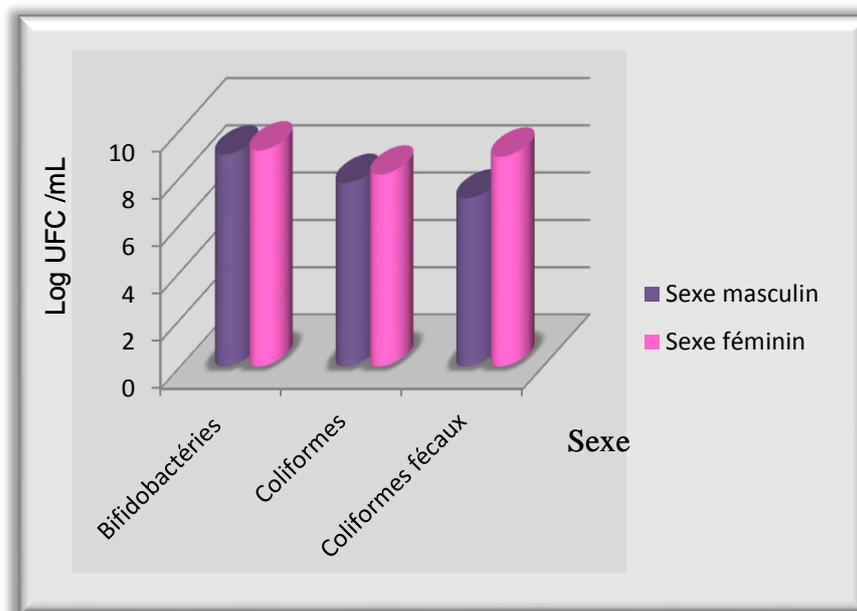


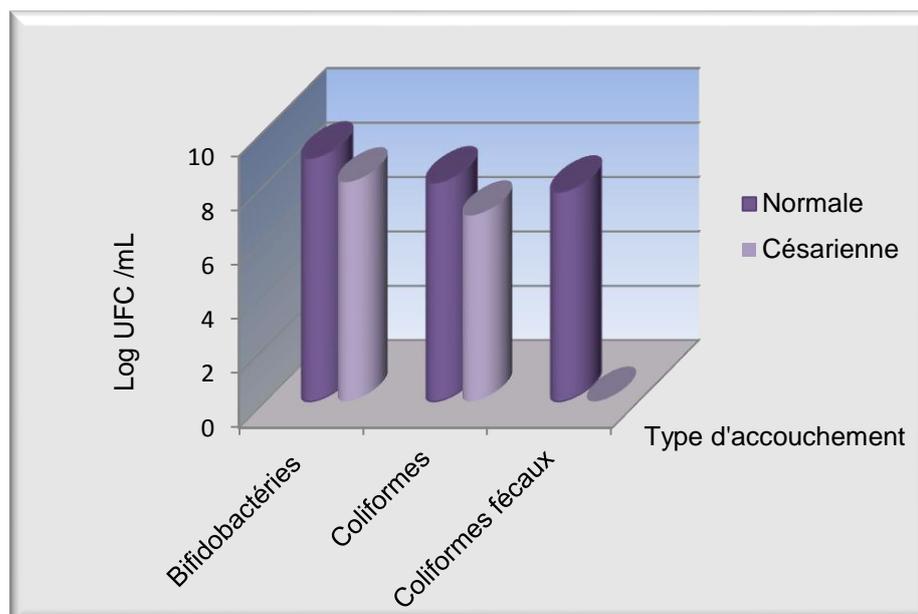
Figure 5.2 : Evolution de la flore colique selon le sexe

### 5.1.3 Répartition selon le type d'accouchement

Le type d'accouchement influence l'évolution de la flore colique. Dans notre échantillon il y avait 10 cas accouchement par voie basse, 04 cas avec césarienne.

Tableau 5.3 : Évolution de la microflore colique selon le type d'accouchement.

Type d'accouchement / UFC/mL	Normale	Césarienne
Bifidobactéries	8,98 ± 0,20	8,07 ± 0,35
Coliformes	8,07 ± 0,35	6,85 ± 0,12
Coliformes fécaux	7,73 ± 0,13	00



**Figure 5.3 : Evolution de la flore colique selon le type d'accouchement**

La figure 5.3 indique une prédominance des germes bifides chez les nourrissons nés par voie basse ( $8,98 \pm 0,20$  Log UFC/mL), par contre chez les nourrissons nés par césarienne le Log UFC/mL des bifidobactéries représentent  $8,07 \pm 0,35$  (tableau 5.3). Donc le type d'accouchement influe sur la flore colique.

#### 5.1.4 Répartition selon l'âge

L'âge moyen de la population était de 56,6 jours avec des extrêmes de 04 jours et 07 mois. La population la plus diarrhéique, leur âge moyen est inférieur à 04 mois.

En effet, l'âge de plus forte prévalence de la diarrhée correspond à la période de sevrage (18 – 24 mois) à partir de laquelle les enfants commencent à consommer n'importe quoi, s'exposant ainsi aux agents infectieux [356].

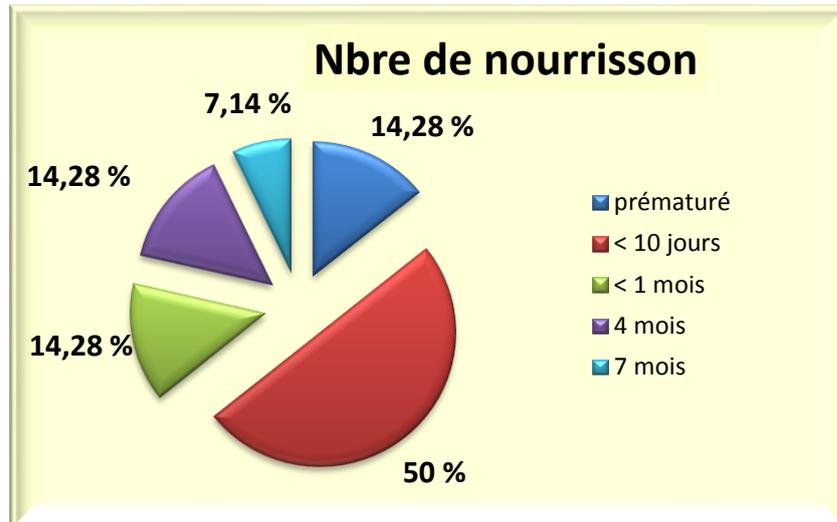


Figure 5.4 : Nombre des nourrissons selon l'âge

#### 5.1.5 Répartition des nourrissons par diagnostic

Nos malades se répartissent en 04 cas diarrhées, 02 cas méningite, 01 cas déshydratation, 02 cas prématurés et 05 cas hépatique.

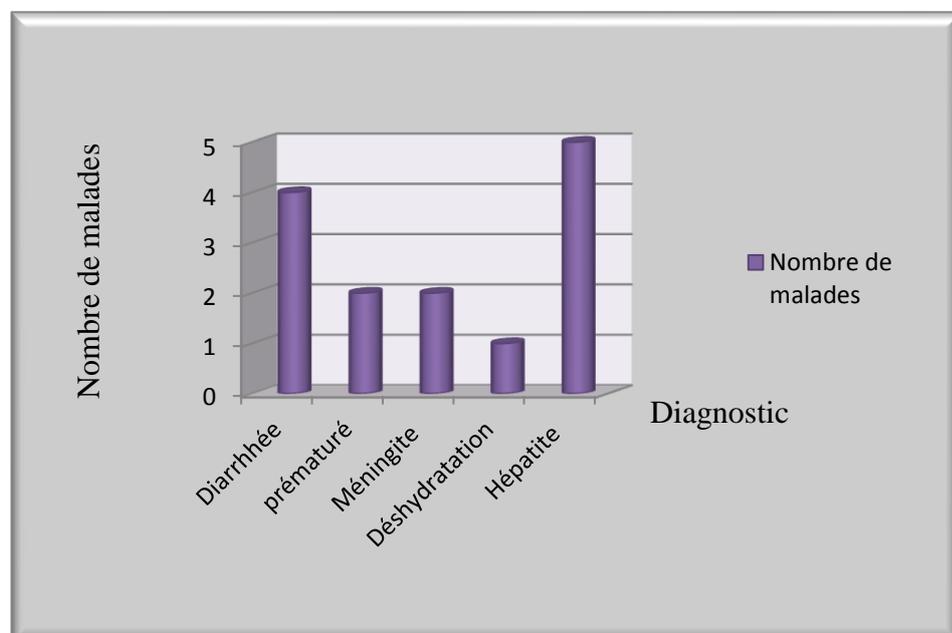


Figure 5.5 : Nombre des nourrissons par diagnostic.

Dans notre échantillon , l'hépatite constituait la forme clinique prédominante, aussi des cas diarrhéiques, tandis que des méningites et déshydratations en moins nombre (figure 5.5).

A la naissance, l'intestin est stérile, il est rapidement colonisé par une communauté microbienne provenant de la mère (flore vaginale, fécale, buccale) et de l'environnement (bactéries véhiculées par le personnel soignant, l'entourage, etc.). C'est pourquoi le mode d'accouchement de durée prolongée favorise la présence de bactéries viables dans l'estomac et la cavité buccale du nouveau-né. Une naissance par césarienne favorise l'exposition à des germes de l'environnement et de l'entourage.

Les principales populations cultivables de la flore fécale du nouveau-né entre 0 et 3 jours incluent des entérobactéries (dont *E. coli*) transitoirement dominants, et quelques mais pas systématiquement des bifidobactéries [247, 357].

Plusieurs études ont montré que la flore des enfants nourris exclusivement au sein était dominée par des bifidobactéries, alors que la flore des enfants nourris avec des préparations lactées contenait plus de *Bactéroides*, de clostridies et d'entérobactéries [357-362].

Une étude effectuée par Harmsen et al (2000) [363] qui consiste à analyser la composition de la flore de 12 nourrissons, nés à terme, entre 1 et 20 jours. Six enfants étaient nourris au sein et les six autres recevaient une préparation lactée classique. Chez les enfants allaités au sein, le pourcentage moyen de bifidobactéries était inférieur à 40% à la naissance, les *Bactéroides* étaient compris entre 0 et 80% par des bifidobactéries qui représentaient entre 60 et 91% de la flore. Chez les enfants nourris avec une préparation, la composition initiale de la flore était comparable à celle des nourrissons au sein. En revanche, l'évolution était différente et *E. coli* entre 0 et 30%. Dès le 4ème jour, la flore de tous les enfants nourris au sein était dominée par des bifidobactéries qui représentaient entre 60 et 91% de la flore. Les autres genres bactériens occupaient une position sous-dominante dans le même temps.

RINNE *et al.*, (2005) [364] ont montrés que les bactéries considérées comme bénéfiques, en particulier celles appartenant au genre *Bifidobacterium* sont présentes en proportion plus faible dans l'écosystème microbien intestinal des enfants nourris avec des formules lactées, comparés aux enfants nourris au lait maternel. Ceci est la conséquence des compositions différentes en glucides, les aliments artificiels ne contiennent quasi exclusivement que du lactose alors que plus de 10% des glucides du lait maternel sont constitués d'oligosides indigestibles [365].

La première mesure qui vise à prévenir ou à réduire la fréquence des diarrhées chez un enfant sain est l'allaitement maternel exclusif. L'allaitement au sein est hygiénique : il ne nécessite ni biberon ni tétine, ni préparation pour nourrisson qui sont facilement contaminés par des germes pathogènes et qui peuvent donc entraîner la diarrhée. Aussi le lait maternel exerce un effet protecteur vis à vis de certaines pathologies (diarrhées, entérocolites ulcéronécrosantes...), effet protecteur que certains attribuent tout au moins en partie à cet équilibre particulier de la flore intestinale de l'enfant allaité [365, 366].

Le lait maternel a des propriétés immunologiques qui protègent le nourrisson de l'infection et en particulier de la diarrhée. DIALLO et CAMABA (1998) [356] ont affirmés sur la base de leur enquête sur 107 nourrissons que les diarrhées aiguës du nourrisson représentent un réel problème de santé publique.

L'équilibre de l'écosystème microbien intestinal peut ainsi être rompu sous l'effet de l'activité antibiotique qui parvient dans la lumière intestinale. L'amoxicilline qui est un antibiotique très fréquemment prescrit chez l'enfant active *in vitro* sur la plupart des souches de bifidobactéries [367].

Une étude effectuée par POCHART (1990) [234] sur Des enfants nés à terme, âgés de 12 à 24 mois, n'étant plus allaités et souffrant de bronchite aiguë pour laquelle un traitement oral par amoxicilline (50 mg/kg/jour en 3 doses) pendant 7 jours a été prescrit. Cette étude montre qu'une diminution du genre *Bifidobacterium* est attendue les premiers jours, puis selon la sensibilité à

l'antibiotique, des souches de bifidobactéries résistantes pourraient apparaître après 7 jours de traitement antibiotique.

Les souches *Escherichia coli* pathogènes sont en général sensibles au chloramphénicol et l'association sulfaméthoxazole/ triméthoprime.

## **5.2 Isolement et dénombrement des Bifidobactéries et Coliformes à partir des selles de nourrissons sous différents types d'allaitement**

### **5.2.1 Isolement et identification des espèces d'intérêt**

#### **5.2.1.1 Les bifidobactéries**

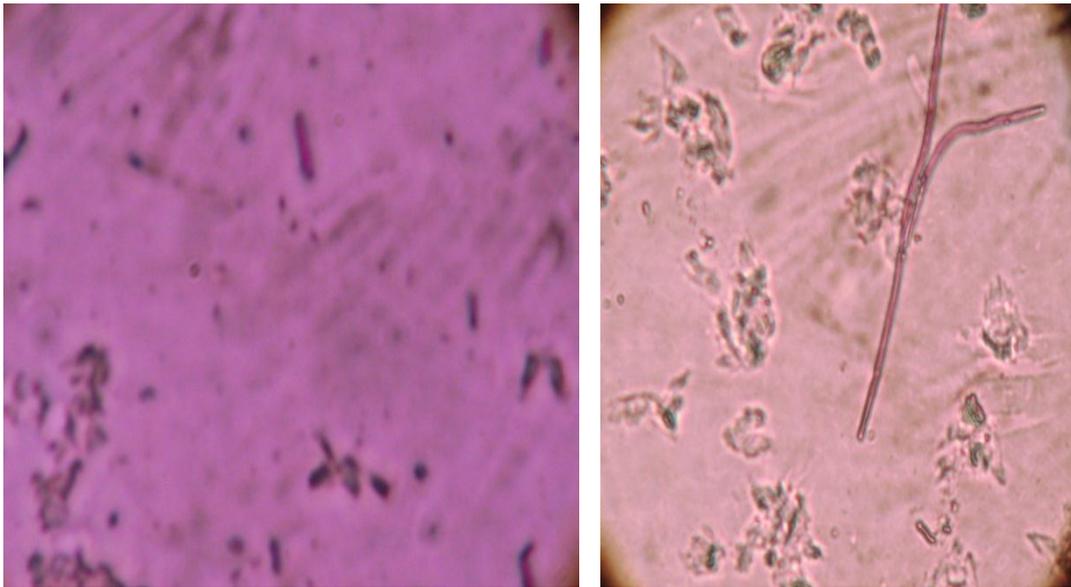
Plusieurs espèces appartenant à de la famille des bifidobactéries ont été isolées à partir des selles de nourrissons hospitalisés âgées de moins de 6 mois allaités exclusivement au sein ou artificiellement ou sous allaitement mixte. Les colonies du genre *Bifidobacterium* cultivées sur gélose MRS apparaissent sous forme de colonie lisse, convexe, à contour régulier, de couleur blanche ou crème, de 1 à 2 mm de diamètre (Tableau 5.4, Figure 5.6). L'aspect microscopique après coloration de Gram révèle la présence de cellules sous la forme de bâtonnets bifurqués. Les résultats des tests effectués sont les suivants : Gram +, (Figure 5.7), catalase -.

#### **5.2.1.2 Les coliformes**

Les coliformes ont été isolés à partir des selles de nourrisson hospitalisés. Les colonies du germe coliforme cultivé sur gélose VRBL apparaissent sous une forme de colonie ronde, convexe, à contour régulier de couleur rose à violacées, de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm après 24 heures d'incubation, cernées d'un halo de sels biliaires précipités (figure 5.8).



**Figure 5.6: Aspect macroscopique des colonies bifides ensemencées sur gélose MRS.**



**Figure 5.7 : Les souches bifides après coloration de Gram sous microscope optique G x 100 x 1,25 x 10 x 0,25**



**Figure 5.8: Aspect macroscopique des colonies coliformes ensemencées sur gélose VRBL.**

Les tableaux 5.4 et 5.5 révèlent les résultats des observations macro et microscopiques des souches bifides ainsi que les résultats d'identification biochimiques.

Tableau 5.4 : Isolement et purification des souches bifides

Origine des souches	Milieu de culture	Aspect des colonies	Aspect des cellules	Mode de regroupement des cellules	Gram
N1	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N2	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques), en forme bifide (Y et V)	+
N3	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N4	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N5	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses, de diamètre 4 mm.	Longues bâtonnets, mince	Par paires (diplocoques), en forme bifide (Y et V)	+
N6	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N7	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N8	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques), en forme bifide (Y et V)	+
N9	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N12	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques), en forme bifide (Y et V)	+
N13	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N14	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N15	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+
N16	MRS	Plus allongées, parfois rondes crémeuses de diamètre 1 à 2 mm.	Petits bacilles, mince	Par paires (diplocoques)	+

Tableau 5.5 : Résultats d'identification des bifidobactéries (galerie classique)

Tests / Souches	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B12	B13	B14	B15	B16
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
LDC		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO <sub>2</sub>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
UREE	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
INDOLE	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate-réductase	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

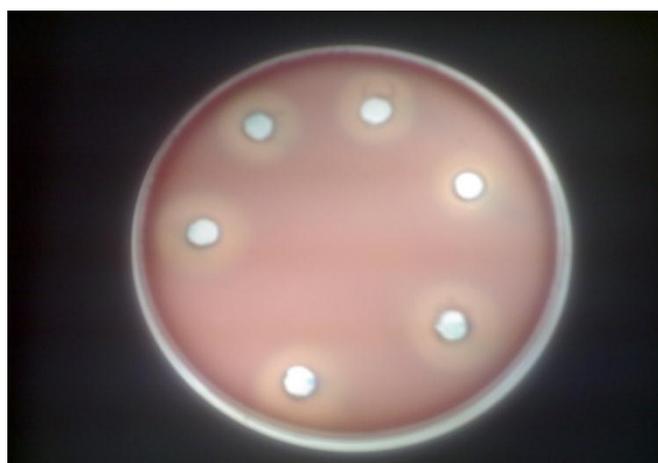
D'après les résultats biochimiques, les souches isolées à partir des selles de nourrissons montrent qu'il s'agit bien de souches bifides à l'exception des souches B<sub>4</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>8</sub>. Ainsi elles nous rapprochent des espèces *Bifidobacterium longum* (03 souches) : la souche B<sub>5</sub>, B<sub>7</sub> et B<sub>15</sub> (tableau 5.5).

### **5.2.2 La purification et contrôle de pureté des souches bifides**

Après une série de purification des souches bifides sur gélose MRS; et une coloration de Gram, ces souches apparue en couleur violette sous microscope donc ce sont des Gram positif (Figure 5.7) en bâtonnets plus ou moins allongées, quelques un en forme V ou Y.

### **5.3 Criblage des souches bifides**

L'étude du criblage des souches isolées permet de sélectionner celles productrices de bactériocines. Le criblage de souches bifides testées à l'égard de germe pathogène *Escherichia coli*. La figure 6.9 montre un exemple de zones d'inhibition de 06 souches bifides productrices de substances inhibitrices dont le diamètre d'inhibition ( $Z_i$ ) est supérieur ou égale à 02 mn. La méthode utilisée est celle de diffusion des puits [368]. Le tableau 6.6 présente l'effet antagoniste des 11 souches sélectionnées à l'égard de l'espèce pathogène (*Escherichia coli*). Les souches bifides considérées présentent une activité inhibitrice variable vis-à-vis du germe pathogène. La souche B<sub>16</sub> présente l'activité antimicrobienne la plus importante envers *Escherichia coli*.



**Figure 5.9 : Activité antimicrobienne des souches bifides à l'égard d'*Escherichia coli***

**Tableau 5.6 : Activité antimicrobienne des souches pseudo-lactiques à l'égard de germes pathogènes (diamètre d'inhibition en mm).**

Souches	<i>E. coli</i>	SBA
B <sub>1</sub>	11	17
B <sub>2</sub>	10	19
B <sub>3</sub>	11	16
B <sub>5</sub> <i>B. longum</i>	14	17
B <sub>7</sub> <i>B. longum</i>	11	19
B <sub>9</sub>	13,5	17,5
B <sub>10</sub>	10,5	18,5
B <sub>11</sub>	08	20
B <sub>12</sub>	11	21
B <sub>13</sub> <i>B. longum</i>	06	12
B <sub>16</sub>	22	44

Une première sélection des souches est effectuée sur la base de l'activité antimicrobienne. La meilleure souche retenue est la souche B<sub>16</sub>. Une deuxième sélection sera réalisée sur la base de deux paramètres technologiques : le pouvoir acidifiant et la cinétique de la croissance.

LOUCIF (1998) [369] a montré que les bifidobactéries inhibent EPEC avec un effet dose-réponse.

#### **5.4 Activité métabolique des souches bifides sélectionnées**

L'activité métabolique concerne le suivi du pH et de la croissance bactérienne. Une caractéristique du pouvoir acidifiant des 10 souches sélectionnées est réalisée sur des laits infantiles 1 ère âge reconstitué. Le suivi du pH est réalisé toutes les 100 min pendant 8 heures et après 24 h d'incubation. Les résultats du suivi du pH et de la croissance bactérienne sont présentés au niveau des tableaux D.1 et D.2 (cité en annexe). Le tableau 5.7 indique les variations de ces paramètres en 8 heures de culture.

**Tableau 5.7 : Calculs des variations de pH ( $\Delta$  pH), des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) des cultures des bactéries bifides sélectionnées**

Souches	$\Delta$ pH	V pH	G	$\mu$
<b>B1</b>	<b>02,00</b>	<b>1,2</b>	<b>0,22</b>	<b>4,55</b>
<b>B2</b>	00,93	0,55	0,93	1,08
<b>B3</b>	01,10	0,66	0,53	1,89
<b>B5</b>	00,25	0,15	0,79	1,26
<b>B7</b>	01,61	0,96	2,08	0,48
<b>B9</b>	00,27	0,126	2,49	0,40
<b>B12</b>	01,87	1,121	1,08	0,93
<b>B13</b>	01,67	1,002	1,47	0,68
<b>B14</b>	01,82	1,092	1,39	0,72
<b>B16</b>	01.82	1,092	0,33	3,03

$\Delta$  pH: pH initial – pH final

V pH: vitesse d'acidification (en mU pH/min)  $\Delta$  pH/  $\Delta$  T

G: T. Log 2/ (Log  $N_f$  – Log  $N_i$ ) (min)

$\mu$ : 1/ G ( $h^{-1}$ )

Log  $N_f$ : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final ( $T_8$ )

Log  $N_i$ : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial ( $T_0$ )

Parmi les 10 souches, la souche B<sub>1</sub> montre la meilleure vitesse d'acidification soit 1,2 h<sup>-1</sup> idem pour les paramètres de croissance, temps de génération (G) et taux de croissance ( $\mu$ ), soit 0,22 h et 4,55 h<sup>-1</sup> respectivement.

Dans cette présente étude, notre premier critère de choix est porté sur la souche B<sub>16</sub>, qui présente une meilleure activité antimicrobienne vis-à-vis la souche pathogène *Escherichia coli*; le deuxième critère de choix est porté sur la souche B<sub>1</sub> d'intérêt technologique. Donc nous avons retenu ces deux souches pour la réalisation des étapes suivantes.

## **5.5 Contrôle de pureté du lait infantile et de la spiruline**

### **5.5.1 Les résultats des analyses physico-chimiques**

Les résultats de la caractérisation de certains paramètres physicochimiques de lait infantile 1<sup>er</sup> âge sont résumés dans le tableau 5,8 et qui sont comparés à celles donnés par la littérature.

**Tableau 5.8 : Les analyses physico-chimiques du lait infantile "Biomil 1"**

<b>Les paramètres</b>	<b>Les normes</b>	<b>L'échantillon</b>
Taux d'humidité	2,5 %	2 % $\pm$ 0,01 %
Taux des cendres	3 g	3 g $\pm$ 0,7 %
Taux de M.G	28 g	28 g/l $\pm$ 0.01
Lactose	Max 26 %	19 % $\pm$ 0.01
pH	6,8 - 6,9	6,87 $\pm$ 0,01

Nous remarquons que le lait infantile 1<sup>er</sup> âge présente un pH de 6,87  $\pm$  0,01, qui est conforme à celui recommandé par les normes françaises qui se limite entre 6,8 et 6,9. Le pH bas de lait infantile peut être attribué à la forte concentration en acide gras volatils.

Pour les cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans un échantillon. La valeur trouvée est de l'ordre de 3  $\pm$  0,7 % et qui est conforme à celui indiquée sur l'emballage.

Pour l'humidité est de l'ordre de 2  $\pm$  0,01 %, elle légèrement inférieure aux normes indiqués sur l'emballage qui est de 2,5 %. Cette différence est due aux facteurs de manipulation.

Le taux de la matière grasse est de l'ordre de 28 g/L  $\pm$  0,01 qui est conforme aux normes indiqués sur l'emballage.

La teneur en lactose est de l'ordre de  $19 \pm 0,1$  g/l, et qui est conforme aux normes exigées par le *codex alimentarius*.

Les résultats de la caractérisation de certains paramètres physicochimiques de la spiruline sont résumés dans le tableau 5.9 et qui sont comparés à celles donnés par la littérature.

**Tableau 5.9 : Les résultats des analyses physico-chimiques de la spiruline sèche**

Les paramètres	Les normes *		L'échantillon
	Min	Max	
Taux d'humidité	4	7	$15,6 \% \pm 0,1$
Taux des cendres	6,4	9	$3,2 \% \pm 0,23$
Taux des protéines	50	71	$56,2 \% \pm 0,54$
Taux de sucres	13	16,5	$15,7 \% \pm 0,5$
Taux de M.G	6	9	$1 \% \pm 0,07$
pH	7	9	$7,44 \pm 0,02$

\* FOX, 1999 [30].

La spiruline est un aliment à haute valeur nutritive. Pour les protéines sont de l'ordre de  $56,2 \% \pm 0,54$ , ce taux se situe dans la fourchette de la norme.

Pour ce qui est du taux d'humidité de la spiruline sèche, il est de l'ordre de  $15,6 \pm 0,1$  %. Ce taux est élevé par rapport à celui apporté par ESPIRARD, 2002 [370] qui préconise pour les poudres un taux d'humidité allant de 4 à 6 %. Cette forte teneur en eau peut être due à un séchage insuffisant, une poudre avec un tel taux d'humidité risque de s'agglomérer [371]. Aussi, la répression sur le stockage de la spiruline en poudre serait à considérer [372].

Pour ce qui est de la matière grasse, les résultats trouvés varient de  $1 \pm 0,07$  %, ces teneurs se rapprochent de celles données par la littérature et qui varient de 4 à 7 % [373-377].

Pour les cendres, la spiruline contient  $3,2 \pm 0,23$  %, ces teneurs sont légèrement inférieures à celle de la spiruline de Madagascar : 9,8 % [378].

Pour les sucres, ils sont présents à  $15,7 \pm 0,5$  %, ces teneurs sont conformes à celles rapportées par la littérature et qui sont de l'ordre de 15 à 25 % [74, 77, 78, 371].

La valeur moyenne de pH est  $7,44 \pm 0,02$ . Le pH optimum se situe entre 9,5 et 10,5 [379].

La composition de la spiruline varie en fonction de la souche, mais aussi selon les procédés de culture utilisés (moment de récolte, mode de séchage, enrichissement des intrants.....) [92].

### 5.5.2 Les résultats des analyses microbiologiques

Les tableaux 5.10 et 5.11 résument les résultats microbiologiques de lait infantile 1<sup>er</sup> âge de la spiruline.

**Tableau 5.10 : Critères microbiologiques des aliments pour enfants en bas âge et nourrisson**

Produits déshydratés ou instantanés à consommer après adjonction de liquide	Germes recherchés	Résultats	Normes
	Germes aérobies à 30 °C	24 germes/g	$5 \cdot 10^4$
	Coliformes	Abs.	5
	<i>Escherichia coli</i>	Abs.	Abs.
	Levures et Moisissures	Abs.	Abs.
	<i>Clostridium sulfito- réducteur</i>	Abs.	Abs.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs.	Abs.
	Salmonelle	Abs.	Abs.

**Tableau 5.11 : Les résultats des analyses microbiologiques de la spiruline**

Les germes	Les normes *	L'échantillon
Germes mésophiles à 30°C	10 <sup>4</sup>	10 germes / g
Coliformes	< 10	Abs.
Coliformes fécaux	Abs.	Abs.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs.	Abs.
Clostridium sulfito-réducteur	Abs.	Abs.
Salmonelles	Abs.	Abs.
Levures et moisissures	Abs.	Abs.

\* Jourdan, (2006) [380].

Les résultats des analyses microbiologiques (germes / g) de lait infantile 1<sup>er</sup> âge et de la spiruline montrent une absence totale des germes pathogènes. Cela s'explique du fait des conditions extrêmes de culture de La spiruline qui ne favorisent pas la prolifération de ces germes et aussi les bonnes pratiques de manipulation pour le lait infantile.

Par contre nous remarquerons la présence de quelques germes mésophiles totaux qui restent heureusement dans les normes recommandées, elles sont de l'ordre de 24 germes / g et 10 germes / g pour le lait infantile et la spiruline respectivement.

En se référant aux normes imposées en France [380] et aux normes algérienne, concernant le lait infantile et notre spiruline possèdent une bonne qualité microbiologique. Généralement, l'alcalinité du milieu de culture (pH 8,5 à 11,0) constitue une excellente barrière contre la plupart des contaminants, aussi bien de bactéries.

### **5.5.3 Réactivation de la spiruline**

Après la réactivation de la spiruline, elle est observée sous microscope optique. Généralement, elle apparue sous la forme d'un filament en spirale (Figure 5.10).

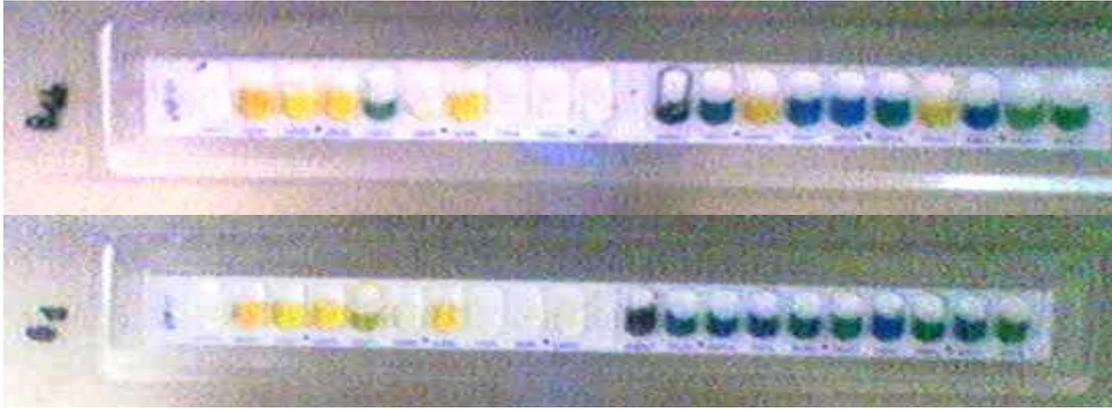


**Figure 5.10 : Aspect de la spiruline après réactivation sous microscope optique G x 100 x 1,25 x 10 x 0,25**

## **5.6 Résultats de suivi de la flore bifides in vitro sur le lait infantile et le lait enrichi en spiruline**

### **5.6.1 Résultats des tests biochimiques par galerie API 20 E des deux souches bifides sélectionnées**

Le tableau 5.12 regroupent les résultats relatifs aux tests biochimiques par la galerie API 20 E des deux souches bifides B<sub>1</sub> et B<sub>16</sub>.



**Figure 5.11 : Identification biochimique des deux souches bifides par galerie API 20 E.**

**Tableau 5.12: Résultats des tests biochimiques par la galerie API 20 E des deux souches bifide B1 et B16**

Tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
<b>Souches B1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Souches B16</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

Cependant, pour ce qui est de l'espèce, l'identification effectuée, toujours en référence aux travaux de Mitsuoka (1984) [292]. Nos résultats (Figure 5.11) laissant penser que la souche B<sub>1</sub> appartient à l'espèce *Bifidobacterium bifidum* et la souche B<sub>16</sub> appartient à l'espèce *Bifidobacterium infantile* var *lactencis* (appendice F).

*Bifidobacterium bifidum* étant la principale espèce isolée chez les enfants nourris au lait maternel [381].

À ce stade d'identification, il nous est impossible de confirmer l'appartenance de la souche isolée, sans des tests complémentaires plus poussés (composition du peptidoglycane, technique d'hybridation ADN – ADN).

Le lait infantile 1<sup>er</sup> âge répond par sa composition (appendice B) aux besoins nutritionnels du nourrisson, donc ce lait peut servir à l'élaboration du lait fermenté 1<sup>er</sup> âge d'autant que la présence de vitamines telles que l'acide ascorbique, l'acide pantothénique et la biotine, répond aux exigences nutritionnelles des bifidobactéries [269].

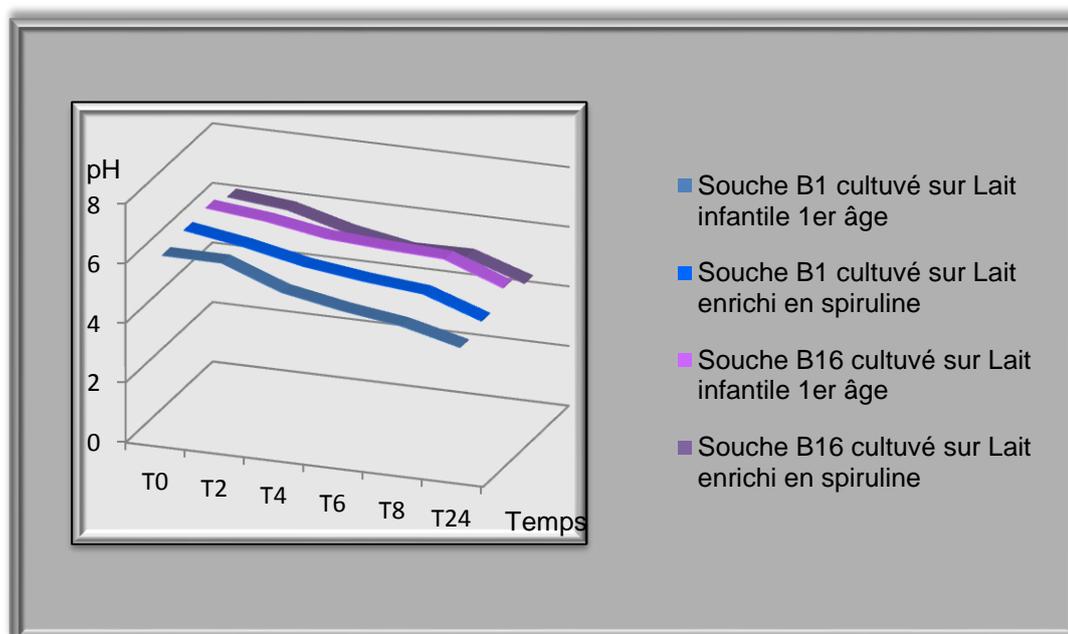
Le lactose comme substrat dans les cultures témoin, est très bien métabolisé, car c'est une bonne source de carbone et d'énergie pour les bifidobactéries [382].

Les laits infantiles contenant les bifidobactéries possèdent de nombreux avantages nutritionnels et technologiques [383]. DEZKOROVAINY (2001) [246] a rapporté que les facteurs bifidogènes peuvent optimiser la croissance des bifidobactéries dans l'intestin. D'autre part en présence de spiruline, la capacité des souches bifides à croître sur milieu lait étant donné que leur phase de latence est raccourcie à seulement 2 h [384].

La spiruline comme source d'azote pour les bifidobactéries.

### **5.6.2 Résultats de suivi du pH des deux souches bifides sélectionnées**

La figure 5.12 montre la variation de pH du lait infantile 1<sup>er</sup> âge et de lait enrichi en spirulineensemencées avec les deux souches bifides B<sub>1</sub> et B<sub>16</sub>.



**Figure 5.12 :**  
**Évolution de pH du lait infantile cultivé avec les deux souches bifides B<sub>1</sub> et B<sub>16</sub>.**

Le tableau 5.13 regroupe les résultats relatifs aux variations de pH ( $\Delta$  pH), les vitesses d'acidification (V pH), le temps de génération (G) et le taux de croissance ( $\mu$ ) de la souche bifide B<sub>1</sub>.

**Tableau 5.13: Résultats des variations de pH ( $\Delta$  pH), des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) des cultures de la souche bifide B<sub>1</sub>**

Souche bifide B <sub>1</sub>	$\Delta$ pH	V pH	G	$\mu$
lait infantile 1 <sup>ère</sup> âge seul	01,86	1,116	0,16	06,25
Lait infantile 1 <sup>ère</sup> âge enrichi en spiruline	01,82	1,092	01,02	00,98

L'activité de synthèse d'acides organiques (acide lactique et acide acétique) à partir du lactose traduite en termes d'abaissement de valeurs de pH dans un rapport moléculaire de 3/2. D'après nos résultats, nous remarquons une baisse de pH de lait infantile et de lait enrichi en spiruline avec le temps, il atteint 4,32 et 4,53 respectivement. On a eu des  $\Delta$  pH de l'ordre de 1,86 et 1.82 dans le lait infantile et le lait enrichi en spiruline respectivement (tableau 5.13). L'abaissement de pH se trouve significative ( $P < 0,05$ ) dans le lait infantile à celui enrichi en spiruline. De ce faite la spiruline alcalise le pH du lait infantile.

Le tableau 5.14 regroupe les résultats relatifs aux variations de pH ( $\Delta$  pH), les vitesses d'acidification (V pH), le temps de génération (G) et le taux de croissance ( $\mu$ ) de la souche bifide B<sub>16</sub>.

**Tableau 5.14: Résultats des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) des cultures de la souche bifide B<sub>16</sub>**

Souche bifide B <sub>16</sub>	$\Delta$ pH	V pH	G	$\mu$
lait infantile 1 <sup>ère</sup> âge seul	01,68	1,008	1,79	0,56
Lait infantile 1 <sup>ère</sup> âge enrichi en spiruline	01,46	0,876	0,55	1,82

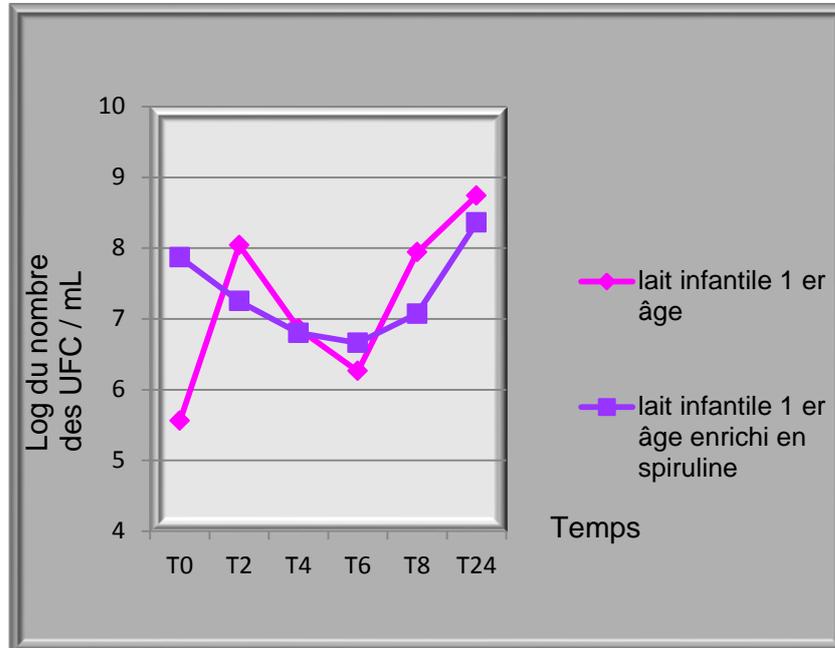
La souche bifide B<sub>16</sub> a diminué le pH du lait infantile à 5,05 en 6 h de fermentation (tableau D.4 cité en annexe), elle arrive à donner un caillé de texture acceptable en un temps de fermentation remarquable. Les valeurs des vitesses d'acidification dans le lait infantile et celui enrichi en spiruline sont significative ( $P < 0,05$ ).

En revanche, la souche bifide B<sub>1</sub> est la souche idéale de pouvoir acidifiant, nos résultats vont de pair avec ceux de [384-386].

### **5.6.3 Résultats de suivi de cinétique de la croissance des deux souches bifides sélectionnées**

Nous avons observé une meilleure croissance de la souche bifide B<sub>1</sub>, lorsqu'elle estensemencée dans le lait seul et très significativement par rapport à celle cultivée sur le lait infantile enrichi en spiruline ( $P < 0,05$ ). D'après les analyses bactériologiques, nous avons noté une augmentation de nombre des UFC / mL de 5.56 à 8.74 (Figure 5.13) soit une vitesse de croissance en moyenne de l'ordre de 1,008 h<sup>-1</sup> sur le lait seul. Avec une augmentation de nombre des UFC / mL de 7,87 à 8,36 soit une vitesse de croissance de l'ordre de 0,876 h<sup>-1</sup> pour le lait enrichi en spiruline. Cela il peut être dû au non digestibilité des protéines de la spiruline par le système enzymatique de la souche bifide B<sub>1</sub>.

Concernant le taux moyen d'accroissement ( $\mu$ ) de la souche bifide B<sub>1</sub> était de  $6,25 \pm 0,02$  dans le lait seul mais il était très faible dans le lait enrichi, de l'ordre de  $00,98 \pm 0.03$  (Tableau 5.13).

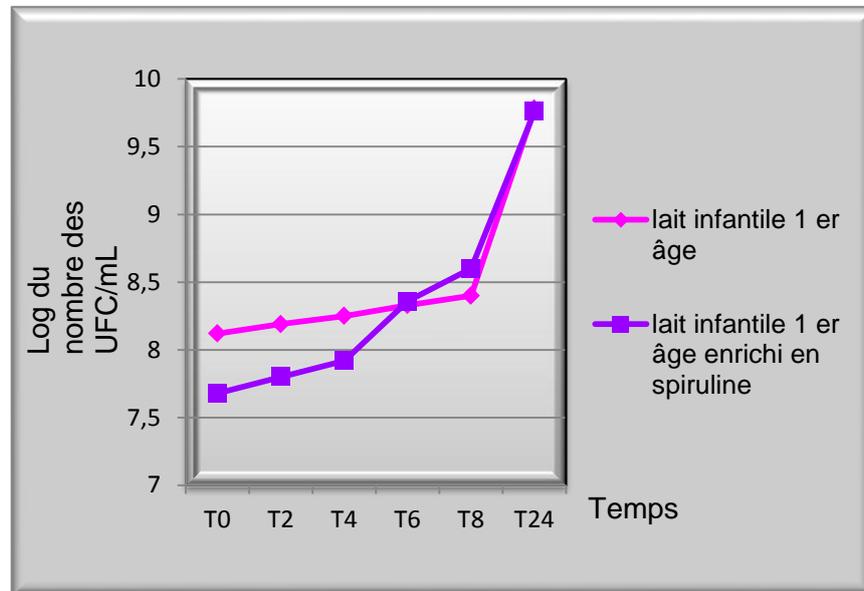


**Figure 5.13 : Evolution de Log du nombre des UFC /mL de la souche bifides B<sub>1</sub> avec le temps**

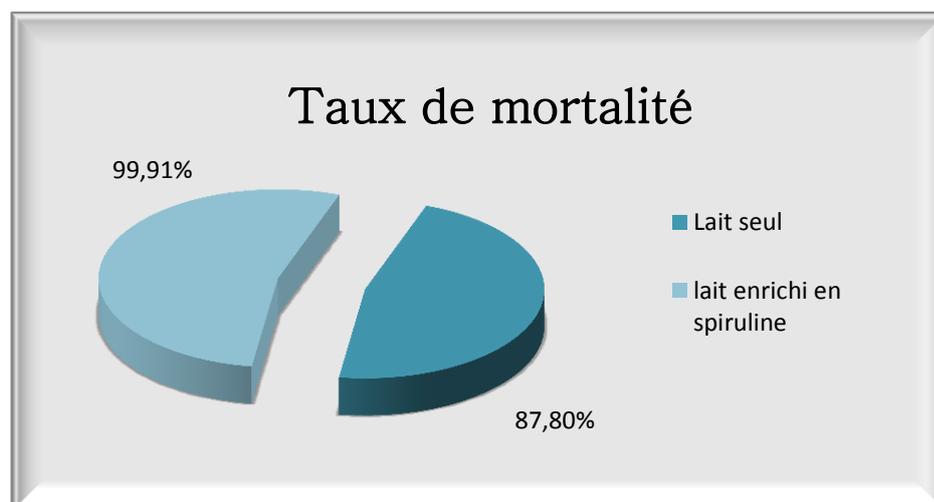


**Figure 5.14 : Le taux de mortalité de la de la souche bifide B<sub>1</sub>.**

Avec la souche bifide B<sub>16</sub>, nous avons enregistré des niveaux de biomasse de 7.68 à 9.76 UFC/ mL, et une vitesse de croissance très appréciable en moyenne de l'ordre de  $1,82 \text{ h}^{-1} \pm 0,02$ , sur le lait enrichi en spiruline et aussi le temps de génération été raccourci à 0,55 h en présence de spiruline (Tableau 5.14).



**Figure 5.15 : Evolution de Log du nombre des UFC /mL de la souche bifides B<sub>16</sub> avec le temps.**



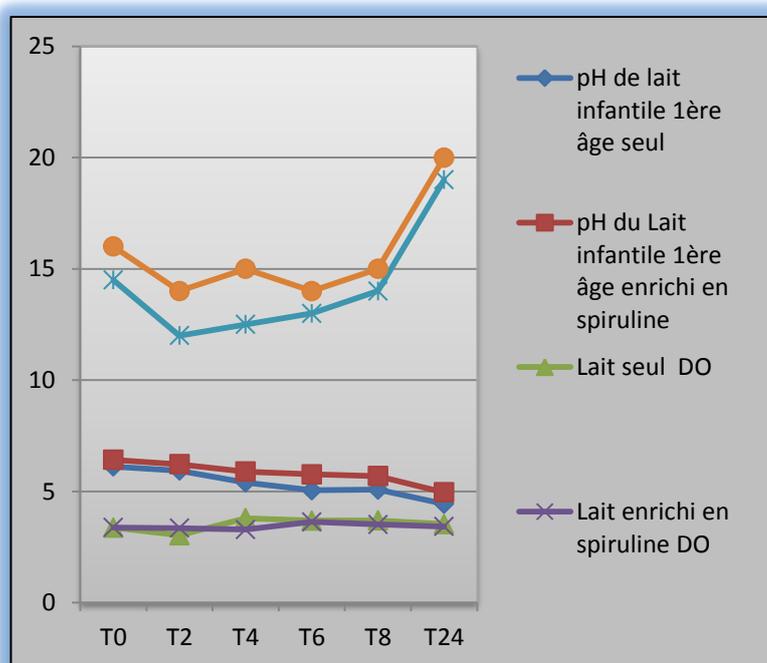
**Figure 5.16 : Le taux de mortalité de la souche de bifide B<sub>16</sub>.**

Si on compare les résultats obtenus au niveau des deux milieux, il y a lieu de remarquer que la spiruline améliore la croissance des souches bifides sur milieu lait ( $P < 0,05$ ). En effet le taux de mortalité des souches bifides B<sub>16</sub> est de 87,80 % (Figure 5.16).

En revanche, la spiruline améliore la croissance des souches bifides dans les laits fermentés.

#### **5.6.4 Résultats de suivi de l'effet antagoniste des deux souches bifides sélectionnées**

Nous observons d'après nos résultats que l'effet antagoniste de la souche bifide B<sub>16</sub> vis-à-vis la souche pathogène *Escherichia coli* est plus important lorsqu'elle est ensemencée dans le lait enrichi en spiruline que sur le lait seul (Figure 5.17). Cela est confirmé par les études de OZDEMIR G. (2004) [118] qui conclut que la spiruline sécrète des substances possédant une intéressante activité bactéricide ou au moins bactériostatique.



**Figure 5.17: Suivi de pH, la densité optique et l'effet antagoniste de la souche bifide B<sub>16</sub> cultivée sur le lait infantile enrichi en spiruline et le lait infantile seul.**

En 6 heures de fermentation, nous atteignons une DO de 3,692 et 3,628 (Tableau D.7 cité en annexe) dans le lait enrichi en spiruline et le témoin respectivement (Figure 5.17).

### **5.6.5 Résultats de la sensibilité des deux souches bifides B<sub>1</sub> et B<sub>16</sub> aux antibiotiques**

Les résultats de la sensibilité des deux souches d'intérêt vis-à-vis de 10 antibiotiques (Ampicilline, Erythromycine, Triméthoprime etc.) sont représentés au niveau des tableaux 5.15 et 5.16.

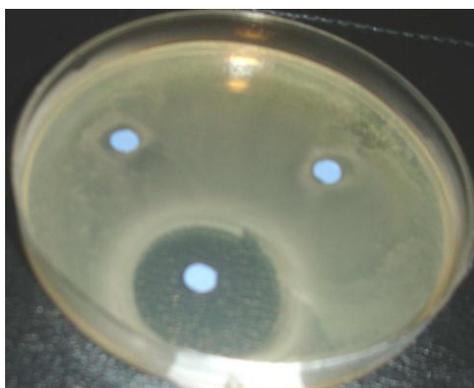
**Tableau 5.15: Étude de la sensibilité de la souche B<sub>1</sub> aux antibiotiques**

Code	Antibiotiques	Diamètre	Sensibilité
AM	Ampicilline	00	R
E	Erythromycine	04	R
FA	Acide fusidique	12	S
C	Chloramphénicol	17	I
CT	Colistin	00	R
CZ	Cefazoline	00	R
AX	Amoxicille	00	R
SXT	Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole	18	S
PI	Acide pipémidique	00	R
OX	Oxacilline	00	R
CN	Gentamicine	04	R
P	Pénicilline	00	R

**S : Sensible**

**R : Résistant**

**I : Intermédiaire**



**Figure 5.18 : Activité inhibitrice de la souche bifide B<sub>1</sub> sur trois antibiotiques.**

**Tableau 5.16: Étude de la sensibilité de la souche B<sub>16</sub> aux antibiotiques**

Code	Antibiotiques	Diamètre	Sensibilité
AM	Ampicilline	00	R
E	Erythromycine	11	R
FA	Acide fusidique	20	S
C	Chloramphénicol	25	S
CT	Colistin	00	R
CZ	Cefazoline	00	R
AX	Amoxicille	00	R
SXT	Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole	21	S
PI	Acide pipémidique	00	R
OX	Oxacilline	00	R
CN	Gentamicine	08	R
P	Pénicilline	00	R

**S : Sensible****R : Résistant****I : Intermédiaire****Figure 5.19 : Activité inhibitrice de la souche bifide B<sub>16</sub> sur trois antibiotiques.**

D'après les résultats d'antibiogramme, nous remarquons que la souche bifides B<sub>1</sub> sont sensible à certains antibiotiques tel que : Acide fusidique, Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole. Elles sont résistantes à quelques antibiotiques tel que : l'Ampicilline, Erythromycine, Colistin, Amoxicille ...etc. (Figure 5.18).

Concernant la souche bifide B16, elle est sensible aux antibiotiques tel que : Acide fusidique, Chloramphénicol et Triméthoprime/ Sulfaméthoxazole et elle est résistante à l'antibiotique : l'Ampicilline, Erythromycine, Colistin, Amoxicille ...etc. (Figure 5.19)

Dans les pays en voie de développement, il y a une diversité de croyance et de pratique qui influencent l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant [387]. Ces croyances et pratiques souvent inadéquates contribuent à la survenue très précoce de la malnutrition se traduisant par une prévalence élevée d'émaciation et de retard de croissance. Les conséquences de cette malnutrition précoce, c'est-à-dire survenant au cours des deux premières années de la vie, sont démocratiques car cette période représente celle durant laquelle les dommages causés sur la santé, la croissance de cerveau, l'intelligence, la capacité d'apprentissage et la productivité à l'âge adulte deviennent pratiquement irréversibles [388].

Selon KODIO J., (2010) [389] l'âge 0-23 mois représente une opportunité unique pour promouvoir, supporter et améliorer les quatre pratiques essentielles de l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant à savoir : l'initiation de l'allaitement dans l'heure qui suit la naissance ; l'administration du colostrum durant les trois premiers jours après la naissance ; l'allaitement maternel exclusif jusqu'à l'âge de 6 mois et l'introduction des aliments de complément denses en énergie et riches en micronutriments après cet âge.

La supplémentation de notre étude est basée sur l'enrichissement du lait infantile en spiruline dans le but de confirmer son efficacité en tant que supplément multi-micro éléments. D'une manière générale elle nous a permis d'accélérer la croissance des souches bifides.

La diarrhée d'origine infectieuse est un grave problème sanitaire mondial, responsable chaque année de la mort de plusieurs millions de personnes. Si la majorité des décès se produit parmi les enfants des pays en développement, on estime que jusqu'à 30% de la population même dans les pays développés souffre

chaque année de diarrhée d'origine nutritionnelle. Les probiotiques pourraient constituer un important moyen de réduire ces problèmes [307].

#### **5.6.6 Résultats de criblage des souches bifides par la spiruline**

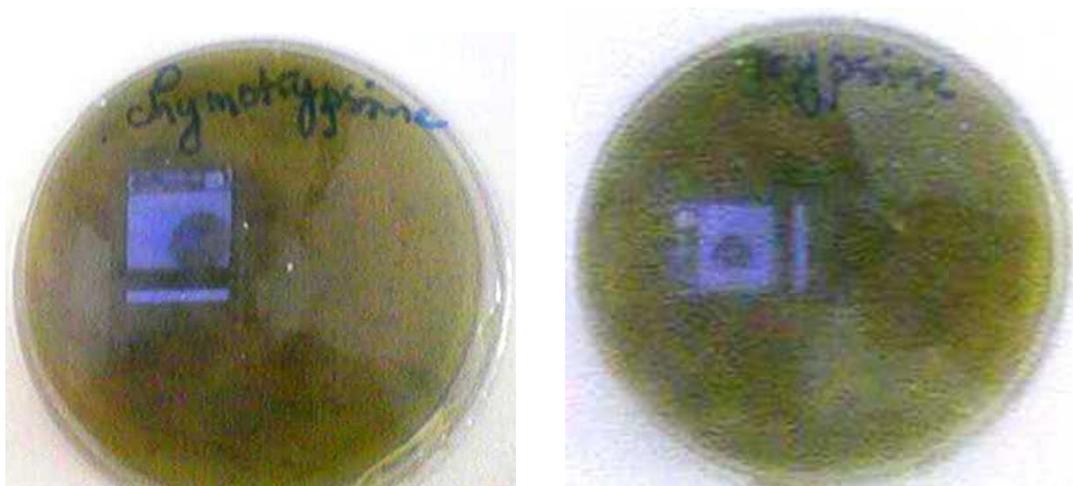
Les résultats de l'étude de l'effet antimicrobien de la spiruline vis-à-vis les bifidobactéries ont montré que la spiruline n'exerce aucun effet inhibiteur. Ou bien les bifidobactéries ont développés une certaine résistance envers les substances bactériocines ou bactériostatiques secrété par la spiruline (Figure 5.20).

#### **5.6.7 Résultats d'étude de la digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes protéolytique**

Nos résultats ont montré que les protéines de la spiruline ne sont pas digestible par les enzymes protéolytiques (Trypsine et Chymotrypsine) *in vitro* (Figure 5.21).



**Figure 5.20 : L'activité antimicrobienne de la spiruline vis-à-vis les souches bifides**



**Figure 5.21 : La digestibilité des protéines de la spiruline par les enzymes protéolytique.**

## **5.7 Résultats de l'analyse statistique**

### **5.7.1 Résultats de l'analyse statistique de la variation de pH avec les deux souches bifide**

Les tableaux 5.17 et 5.18 regroupent les résultats relatifs à la variation de pH des deux souches bifide B<sub>1</sub> et B<sub>16</sub>.

**Tableau 5.17 : Variation de pH avec la souche bifide B1**

Source variable	F obs.	F th	P	E.T	C.V
Var. totale					
Var. milieu	22	4,75	0,0000		
Var. temps	192	3,11	0,0000		
Var. interaction	03	3,11	0,0000		
Var. résiduelle				0,01	0,3 %

**Tableau 5.18 : Variation de pH avec la souche bifide B16**

Source variable	F obs.	F th	P	E.T	C.V
Var. totale					
Var. milieu	143	4,75	0,0000		
Var. temps	125	3,11	0,0000		
Var. interaction	03	3,11	0,0000		
Var. résiduelle				0,01	0,3 %

D'après le tableau 6.17, nous observons que le F obs. >>> F th. (22 >>> 4,75 et 192 >>> 3,11) et  $P = 0,0000 < 0,01$ , cela signifie que les deux facteurs étudiés (milieu et temps) ont un effet très remarqué sur la variation de pH. Les résultats obtenus dans le tableau 5.18 confirment nos conclusions.

Donc c'est on passe à la comparaison des moyennes CMM, pour répondre à la question quel milieu et quel temps qui donne une meilleure variation de pH. Le test de NEWMAN-KEUIL seuil 5 % montre 11 groupes bien distincts, si on remarque la PPAS on peut observer que le lait infantile enrichi en spiruline est le meilleur milieu et le meilleur temps est après 4 heures de fermentation pour la souche B16.

### **5.7.2 Résultats de l'analyse statistique de la variation de temps de génération, le taux de croissance et le taux de mortalité avec les deux souches bifide**

Les tableaux 5.19 et 5.20 regroupent les résultats relatifs aux variations de temps de génération (G) et le taux de croissance ( $\mu$ ).

**Tableau 5.19 : Variation du temps de génération G**

Source variable	F obs.	F th	P	E.T	C.V
Var. totale					
Var. milieu	07	7,71	0,0000		
Var. temps	67	7,71	0,0000		
Var. interaction	221	7,71	0,0000		
Var. résiduelle				0,01	0,3 %

D'après le tableau 6.19, nous observons que le F obs. >>> F th. (67 >>> 7,71 et  $P = 0,0000 < 0,01$ , cela signifié que le facteur temps étudiés a un effet très remarqué sur la variation de temps de génération (G).

Selon les résultats de l'analyse de la PPAS, nous pouvons conclure que la souche B16 présente le meilleur temps de génération dans le milieu lait enrichi en spiruline.

**Tableau 5.20 : Variation de taux de croissance  $\mu$** 

Source variable	F obs.	F th	P	E.T	C.V
Var. totale					
Var. milieu	1176	7,71	0,0000		
Var. temps	804	7,71	0,0000		
Var. interaction	213200	7,71	0,0000		
Var. résiduelle				0,01	0,3 %

D'après le tableau 6.20, nous observons que le F obs. >>> F th. (1176 >>> 7,71 et 804 >>> 7,71) et  $P = 0,0000 < 0,01$ , cela signifié que les deux facteurs étudiés (milieu et temps) ont un effet très remarqué sur variation de taux de croissance ( $\mu$ ).

Selon les résultats de l'analyse de la PPAS, nous pouvons conclure que la souche B16 présente le meilleur taux de croissance dans le milieu lait enrichi en spiruline.

**Tableau 5.21 : Variation de taux de mortalité**

Source variable	F obs.	F th	P	E.T	C.V
Var. totale					
Var. milieu	4032	7,71	0,0000		
Var. temps	3925	7,71	0,0000		
Var. interaction	1163500	7,71	0,0000		
Var. résiduelle				0,01	0,3 %

D'après le tableau 5.21, nous observons que le F obs. >>> F th. (4032 >>> 7,71 et 3925 >>> 7,71) et  $P = 0,0000 < 0,01$ , cela signifie que les deux facteurs étudiés (milieu et temps) ont un effet très remarqué sur le taux de mortalité.

Selon les résultats de l'analyse de la PPAS, nous pouvons conclure que la souche B16 présente le meilleur taux de mortalité dans le milieu lait enrichi en spiruline.

### **5.7.3 Résultats de l'analyse statistique de la variation l'effet antagoniste de la souche B16**

**Tableau 5.22 : Variation de l'effet antagoniste de la souche B16**

Source variable	F obs.	F th	P	E.T	C.V
Var. totale					
Var. milieu	8,08	4,75	0,0000		
Var. temps	13,57	3,11	0,0000		
Var. interaction	0,23	3,11	0,0000		
Var. résiduelle				1,29	8,7 %

D'après le tableau 6.22, nous observons que le  $F_{obs.} > F_{th.}$  ( $8,08 \gg 4,75$  et  $13,57 \gg 3,11$ ) et  $P = 0,0000 < 0,01$ , cela signifie que les deux facteurs étudiés (milieu et temps) ont un effet significatif sur l'effet antagoniste de la souche B16.

Selon les résultats de l'analyse de la PPAS, nous pouvons conclure que le milieu lait enrichi en spiruline est le meilleur pour que la souche bifide B16 exerce son effet antimicrobien vis-à-vis la souche pathogène *Escherichia coli* et surtout après 24 heures de fermentation.

## CONCLUSION

L'objectif de nos travaux était de valider *in vitro* de la spiruline comme aliment fonctionnel nourrissant la flore intestinale. Pour cela, nous avons tenté d'apporter une meilleure connaissance à l'évolution de la flore colique aux différents stades d'allaitement. L'étude préliminaire consiste à collecter des renseignements par le biais d'une enquête réalisée auprès de quinze nourrissons hospitalisés ou auprès de ceux qui sont venus en consultation externe (pour un contrôle de croissance, conseils diététiques, prise en charge des cas de pathologies courantes). Cette étude a montré:

- Une dominance des bifidobactéries chez les nourrissons sous allaitement maternel exclusif
- La présence des entérobactéries chez les enfants nourris avec des préparations lactées.
- Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes autochtones isolées sont généralement sensible aux antibiotiques tel que: les chloramphénicols.

Les quatorze espèces pseudo-lactiques ont été isolées à partir des selles de nourrisson sous différents types allaitements. Les analyses physico-chimiques, nous avons permis de sélectionner onze (11) souches appartenant à la famille des bifidobactéries dont l'espèce *Bifidobacterium longum* (03 souches).

Une première sélection est basée sur l'activité antimicrobienne des onze (11) souches à l'égard de l'espèce pathogène *Escherichia coli* suivant la méthode de diffusion des puits. En effet, une forte activité est observée dans les surnagants bruts actifs (SBA). Seule la souche bifide (B16) a été retenue. Une deuxième

sélection des dix (10) souches est réalisée sur la base des deux paramètres technologiques, le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance. Seule la souche bifide (B1) a été retenue. Donc les deux souches B1 et B16 sélectionnées ont fait l'objet de suivi *in vitro* dans du lait infantile 1<sup>er</sup> âge seul et enrichi en spiruline.

Un suivi du pouvoir acidifiant tout les 100 mn et pendant 24 h pour les deux souches bifides montre que la souche B1 présente un pouvoir acidifiant très appréciable ( $\Delta \text{pH} = 1,86$ ) après 24 h de fermentation dans le lait infantile 1<sup>er</sup> âge. Concernant le suivi de la cinétique de croissance de la souche B16 montre qu'il y a une augmentation de biomasse de 7,68 à 9,76 UFC / mL avec un taux de croissance de  $1,82 \text{ h}^{-1}$  et un temps de génération de l'ordre de 0,55 h lorsqu'elle est cultivée dans le lait infantile enrichi en spiruline. Pour la souche B1, il y a eu une augmentation de biomasse de 5,56 à 8,74 UFC / mL avec un taux de croissance de  $6,25 \text{ h}^{-1}$  et un temps de génération de l'ordre de 0,16 h lorsqu'elle est cultivée dans le lait infantile seul.

D'après nos résultats l'ajout de spiruline en raison de 3 g/L dans le lait infantile d'un nourrisson d'une semaine améliore significativement la croissance de la souche bifide B16 ( $P < 0,05$ ).

La spiruline peut être utilisée en alimentation infantile au tant que complément alimentaire en raison de ses valeurs thérapeutique idéal et aussi comme fortifiant, dont on peut l'utilisées aux traitements de diverses pathologies en se basant sur la composition de cet organisme et les études sur les activités de ses composants. Elle devrait être administrée très tôt chez le nourrisson et le jeune enfant pour empêcher l'installation des carences qui surviennent surtout à partir du sevrage et tout ce qui est pathogène, elle rééquilibre la composition de la flore intestinale en favorisant l'implantation des bifidus en raison de sa richesse en fibres et en glucosamine.

## PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

- Il est alors très intéressant d'envisager l'utilisation de la spiruline dans le cadre d'une complémentation protéique pour améliorer sa valeur biologique en l'associant par exemple à des céréales (mil, riz, millet, ...). Et des oléagineux (pois, sésame,...) respectivement riches en acides aminés soufrés et en Lysine.
  
- Continuer les recherches sur :
  - Les composants de la spiruline, leur extraction et leur biodisponibilité.
  
- L'amélioration des systèmes de culture :
  - Développer la formation
  - Convaincre les nutritionnistes de l'intérêt de la spiruline, notamment en rédigeant une synthèse bibliographique critique des effets de la spiruline sur la santé et l'état nutritionnel des populations ainsi que sur la faisabilité de sa culture.
  - Encourager la culture industrielle dans les pays du sud.
  
- Il est nécessaire de perfectionner les tests *in vivo* afin de mieux prévoir l'aptitude des souches bifides sur le lait infantile enrichi en spiruline.
- Il est recommandé de poursuivre les travaux concernant la vulgarisation de la spiruline.

- Des efforts soutenus et ciblés soient investis dans l'éducation nutritionnelle pour amélioration des pratiques de l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant dans la zone d'étude.

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

**%** : Pourcentage

**°C** : Degré Celsius

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine diphosphate

**AM** : Allaitement maternel

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine triphosphate

**Bf.**: *Bifidobacterium*

**Ca<sup>++</sup>** : Calcium

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**Cl<sup>-</sup>** : Chlore

**Cm** : Centimètre

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**DO** : Densité Optique

**FAO**: Food and Agricultural Organization

**FOS**: Fructo-oligosaccharides

**G**: Gramme

**GOS**: Galactose oligosaccharide

**H**: Heure

**ISO**: International organisation for standardisation

**K<sup>+</sup>**: Potassium

**Kg**: Kilogramme

**L**: Litre

**Log**: Logarithme

**MG**: Matière grasse

**Mg<sup>+</sup>**: Magnésium

**Mm**: Millimètre

**MS**: Matière sèche

**MRS**: Man Rogosa et Sharp

**NA**: Norme Algérienne

**Na<sup>+</sup>**: Sodium

**NaDP**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**NF**: Norme Française

**Nm**: Nanomètre

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé

**P**: Phosphore

**pH**: Potentiel hydrique

**SBA**: Surnagent Brut Actif

**TOS**: Transgalactosylate oligosaccharide

**TSE** : Tryptone-sel-eau

**UFC** : Unité formant colonie

**Var.** : Variance

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## APPENDICE A

Référence \_\_\_\_\_  
Questionnaire clinique et biologique  
Nom de l'hôpital :  
Nombre de nourrissons :

Service gynécologie

-----

Service pédiatrique

### QUESTIONNAIRE SUR LES DIARRHÉE INFANTILE

Enquête	Réponse
Type d'accouchement	
Antibiothérapie de la mère	
Antibiothérapie du nourrisson	
Age du nourrisson	
Sexe du nourrisson	
Poids du nourrisson	
Type d'allaitement : -Maternel -Artificiel -Mixte	
Nom du lait infantile 1 <sup>er</sup> age	
Adaptation au lait	
Nature des selles	
Durée de diarrhée	
Signes généraux d'infection -Vomissements -Diarrhée -Douleurs abdominales	
Autre trouble gastro-entérites	

## APPENDICE B

### Composition de lait adapté 1<sup>er</sup> âge « Biomil » indiqué sur l'emballage

COMPOSITION Moyenne		Par 100 g	Par 100 ml (13,5 %)
<b>Énergie</b>	K cal	518	69,9
	Kj	2165	292
<b>Protéines</b>	g	12,5	1,69
<b>Lipides</b>	g	28,0	3,78
<b>Acide linoléique (ω 6)</b>	mg	4290	579
<b>Acide linoléique (ω 3)</b>	mg	455	61
<b>Glucides</b>	g	54,0	7,29
<b>Minéraux (cendres)</b>	g	3,0	0,41
<b>Humidité</b>	g	2,5	-
<b>Minéraux</b>			
<b>Sodium</b>	mg	180	24
<b>Potassium</b>	mg	550	74
<b>Chlore</b>	mg	400	54
<b>Calcium</b>	mg	500	68
<b>Phosphore</b>	mg	310	42
<b>Magnésium</b>	mg	41	5,5
<b>Fer</b>	mg	5,0	0,68
<b>Zinc</b>	mg	3,8	0,51
<b>Cuivre</b>	mcg	350	47
<b>Manganèse</b>	mcg	36	4,9

<b>Iode</b>	mcg	65	8,8
<b>Sélénium</b>	mcg	11	1,5
<b>Vitamines</b>			
<b>A</b>	IU	1800	243
<b>D</b>	IU	300	41
<b>E</b>	IU	5,0	0,68
<b>C</b>	mg	100	13,5
<b>Niacine</b>	mg	5,0	0,68
<b>Acides pantothénique</b>	mg	3,1	0,42
<b>B1</b>	mcg	350	47
<b>B2</b>	mcg	500	68
<b>B6</b>	mcg	300	41
<b>B12</b>	mcg	1,0	0,1
<b>K</b>	mcg	39	5,3
<b>Acide folique</b>	mcg	78	10,5
<b>Biotine</b>	mcg	10	1,4
<b>Choline</b>	mg	40	5,4
<b>Taurine</b>	mg	40	5,4
<b>L – Carnitine</b>	mg	7,2	1,0
<b>Inositol</b>	mg	25	3,4

## APPENDICE C

### Tests biochimiques classiques des souches bifides

Tests	Technique	Caractères recherchés	Résultats
<b>Catalase</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes,</li><li>- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien</li><li>- Observer immédiatement.</li><li>- Au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose, déposer une goutte d'eau oxygénée</li><li>- Observer immédiatement.</li></ul>	La catalase	Effervescence
		Mise en évidence	Virage de couleur de rouge

<b>Mannitol mobilité</b>	Ensemencement en profondeur et par piqueur centrale de la préculture. Le but de tester la dégradation du mannitol, et la mobilité	de la fermentation du mannitol et la mobilité des souches.	vers le jaune, et la création d'un trouble dans le milieu.
<b>TSI</b>	Ensemencement en profondeur et par piqûre centrale de la préculture. Le but est de tester la dégradation des trois sucre, dégagement de gaz et la réduction de H <sub>2</sub> S.	La B-galactosidase	Virage de couleur de rouge vers jaune, déplacement de milieu solide vers le haut et noircissement autour de la piqûre centrale
<b>Urée</b>	introduire une ou deux gouttes de la préculture dans le tube + une couche de l'huile de vaseline stérile pour l'anaérobiose	<b>l'uréase</b> , enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation	La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium : <b>uréase+</b>  Si le milieu persiste orange alors pas d'alcalinisation test <b>uréase -</b>
		<b>la tryptophanase,</b>	

<b>Indole</b>	Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane Etuver	après addition du réactif de Kovacs. Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.	Formation d'un anneau rouge: <b>indole +</b>  Absence de coloration rouge : <b>indole -</b>
<b>Citrate de Simmons</b>	Ensemencement sous forme de stries sur la ponte et en profondeur par piqûre centrale de la préculture.		Changement de couleur vert vers le bleue
<b>TDA</b>	Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane Etuver	la tryptophane désaminase (TDA), après addition de chlorure de Fer III. Le Fer III forme un complexe avec le produit de l'activité	Obtention d'un précipité brun foncé : <b>TDA +</b>

		de la TDA, l'acide indole-pyruvique, complexe décelable par la formation d'un précipité marron	- Absence de précipité : <b>TDA -</b>
<b>VP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ensemencer largement.</li> <li>-Incuber 24 h à t°C optimale.</li> <li>-Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse).</li> <li>-Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.</li> <li>-Attendre quelques min à 1 heure.</li> </ul>	La réaction de Voges Proskauer (VP) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butanediol et l'acétoïne.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rouge : VP+</li> <li>- Jaune : VP-</li> </ul>
<b>RM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ensemencer largement.</li> <li>-Incuber 24-48 h à t°C optimale.</li> <li>-Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle,</li> <li>-La lecture est immédiate</li> </ul>	les bactéries produisant des acides organiques (éthanoïque...) par la voie des acides mixtes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rouge : RM+</li> <li>- Jaune : RM-</li> </ul>

<p>Décarboxylase ODC, LDC, ADC... et des dihydrolase ADH bactériennes</p>	<p>Ensemencer le milieu de Moeller avec une goutte de suspension. Agiter (si le tube n'est pas plein le recouvrir de vaseline stérile). Fermer le tube entièrement afin de créer une anaérobiose relative. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.</p>	<p>Les décarboxylases</p>	<p>une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.</p> <p>- 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 : le milieu restera violet.</p>
---	---	---------------------------	---

## APPENDICE D

**Tableau D.1 : Variation du pH du lait infantileensemencé avec 12 souches bifides en fonction du temps (heures)**

Souches	0	2	4	6	8	24
<b>B1</b>	06,29	06,07	05,50	04,91	04,58	04,92
<b>B2</b>	06,55	06,46	06,52	06,36	06,22	05,62
<b>B3</b>	06,48	05,42	06,46	06,34	06,18	05,38
<b>B5</b>	06,21	06,08	05,84	05,70	05,55	05,96
<b>B7</b>	06,43	06,03	06,23	06,15	06,08	04,82
<b>B9</b>	06,68	06,62	06,49	06,36	06,25	06,41
<b>B12</b>	06,23	05,94	05,59	05,41	05,14	04,36
<b>B13</b>	06,21	05,88	05,90	05,60	05,30	04,54
<b>B14</b>	06,15	05,84	05,54	05,14	04,92	04,33
<b>B16</b>	06,27	06,06	05,86	05,62	05,51	04,45

**Tableau D.2: comptage des colonies des 12 souches bifidesensemencées sur le lait infantile 1<sup>er</sup> âge**

Souches	0	2	4	6	8	24
<b>B1</b>	$08.10^6$	$4,45.10^6$	$02,52.10^8$	$05,10.10^8$	$01,76.10^9$	$04,55.10^8$
<b>B2</b>	$01,81.10^6$	$3,78.10^6$	$2,15.10^7$	$09,10.10^6$	$5,24.10^6$	$09,01.10^5$
<b>B3</b>	$07,27.10^5$	$09.10^5$	$4,68.10^6$	$09,10.10^7$	$06,36.10^6$	$01,82.10^6$
<b>B5</b>	$01,20.10^6$	$01,91.10^6$	$05,45.10^6$	$09.10^6$	$05,18.10^6$	$05,10^6$
<b>B7</b>	$01,30.10^7$	$09,63.10^6$	$01,91.10^6$	$07,27.10^6$	$02,27.10^7$	$06,27.10^6$
<b>B9</b>	$01,45.10^6$	$02,30.10^7$	$02,80.10^6$	$6,56.10^6$	$3,96.10^6$	$01,55.10^5$
<b>B12</b>	$03,16.10^7$	$05,18.10^7$	$02,55.10^7$	$06,18.10^7$	$5,35.10^7$	$01,18.10^7$
<b>B13</b>	00	$1,31.10^8$	$05.10^7$	$01,83.10^8$	$02,93.10^8$	$08,90.10^7$
<b>B14</b>	$01.10^8$	$01,36.10^8$	$01,18.10^8$	$03,45.10^8$	$02,27.10^8$	$5,62.10^8$
<b>B16</b>	$01,02.10^7$	$05,06.10^7$	$02,06.10^8$	$02,45.10^8$	$03,45.10^8$	$01,82.10^7$

## APPENDICE D (SUITE)

**Tableau D.3: Suivi de la cinétique de croissance de la souche bifide B1 par évolution de pH**

Milieu / Temps	Lait seul	Lait enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	6,18	6,35
T <sub>2</sub>	6,17	6,04
T <sub>4</sub>	5,43	5,63
T <sub>6</sub>	5,07	5,38
T <sub>8</sub>	4,80	5,20
T <sub>24</sub>	4,32	4,53

**Tableau D.4 : Suivi de la cinétique de croissance de la souche bifide B16 par évolution de pH**

Milieu / Temps	Lait seul	Lait enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	6,42	6,12
T <sub>2</sub>	6,22	5,93
T <sub>4</sub>	5,89	5,40
T <sub>6</sub>	5,77	5,05
T <sub>8</sub>	5,69	5,08
T <sub>24</sub>	4,96	4,44

## APPENDICE D (SUITE)

**Tableau D.5 : Suivi de la cinétique de croissance de la souche bifide B1 par comptage des colonies (UFC / mL)**

Milieu / Temps	Lait seul	Lait enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	3,64.10 <sup>5</sup>	7,5.10 <sup>7</sup>
T <sub>2</sub>	1,1.10 <sup>8</sup>	2,13.10 <sup>8</sup>
T <sub>4</sub>	7,27.10 <sup>6</sup>	6,36.10 <sup>6</sup>
T <sub>6</sub>	1,82.10 <sup>6</sup>	4,55.10 <sup>6</sup>
T <sub>8</sub>	8,82.10 <sup>7</sup>	1,18.10 <sup>7</sup>
T <sub>24</sub>	5,45.10 <sup>8</sup>	2,29.10 <sup>8</sup>

**Tableau D.6 : Suivi de la cinétique de croissance de la souche bifide B16 par comptage des colonies (UFC / mL)**

Milieu / Temps	Lait seul	Lait enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	1,32.10 <sup>8</sup>	4,8.10 <sup>7</sup>
T <sub>2</sub>	1,43.10 <sup>8</sup>	5,61.10 <sup>7</sup>
T <sub>4</sub>	1,96.10 <sup>8</sup>	8,56.10 <sup>7</sup>
T <sub>6</sub>	2,15.10 <sup>8</sup>	3,2.10 <sup>8</sup>
T <sub>8</sub>	2,50.10 <sup>8</sup>	4.10 <sup>8</sup>
T <sub>24</sub>	6.10 <sup>9</sup>	5,73.10 <sup>9</sup>

## APPENDICE D (SUITE)

**Tableau D.7 : Suivi de la Densité optique de la souche B<sub>16</sub>**

Souches	lait infantile 1 <sup>er</sup> âge	lait infantile 1 <sup>er</sup> âge enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	3,379	3,373
T <sub>2</sub>	3,348	3,028
T <sub>4</sub>	3,288	3,798
T <sub>6</sub>	<b>3,628</b>	<b>3,692</b>
T <sub>8</sub>	3,518	3,693
T <sub>24</sub>	3,423	3,530

**Tableau D.8 : Évolution de Log du nombre des UFC / mL de la souche bifide B<sub>1</sub>**

	lait infantile 1 <sup>er</sup> âge	lait infantile 1 <sup>er</sup> âge enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	5,56	7,87
T <sub>2</sub>	8,04	7,25
T <sub>4</sub>	6,86	6,8
T <sub>6</sub>	6,26	6,66
T <sub>8</sub>	7,94	7,07
T <sub>24</sub>	8,74	8,36

**Tableau D.9 : Évolution de Log du nombre des UFC / mL de la souche bifide B<sub>16</sub>**

	lait infantile 1 <sup>er</sup> âge	lait infantile 1 <sup>er</sup> âge enrichi en spiruline
T <sub>0</sub>	8,12	7,68
T <sub>2</sub>	8,19	7,8
T <sub>4</sub>	8,25	7,92
T <sub>6</sub>	8,33	8,36
T <sub>8</sub>	8,4	8,6
T <sub>24</sub>	9,78	9,76

## APPENDICE F

### Fermentation des sucres par 9 espèces de *Bifidobacterium* [292]

Species	Growth at 46,5 °C	Clot of humus milk	Mono-		Saccharide										Poly – alcohol			Glucoside										
			Pentose			Hexose		Di-					Tri-		Poly-			Mannitol	Sorbitol	Inositol	Esculin	Salicin	Amygdalin	a-Methyl glucoside				
			Arabinose	Xylose	Ribose	Mannose	Fructose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Lactose	Trehalose	Melibiose	Raffinose	Melezitose	Dextrin	Starch								Glycogen	Inulin		
<i>bifidum</i>	-	+	-	-	-	-	+	+s	-	-	+	-	+s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>infantis</i>	-	+	-	V	+	+	+	+	+	+s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	±	-	-	±	-	v	-
<i>breve</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	s	+	+	+s	V	V	V	+s	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>parvulorum</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	V	V	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>thermophilus</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	V	+	-	+	+	V	+	±	±	±	±	-	-	-	+s	+s	+s	+s	+s
<i>adolescentis</i>	-	V	+s	+	+	+	+	+	+	+s	+	V	+	+	+s	+s	V	V	V	±	±	-	+	+	+	+	+	+
<i>longum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+s
<i>animalis</i>	-	V	+	+	+	V	+	+	+	-	+	-	+	+	-	±	±	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±
<i>pseudolongum</i>	-	+	+	+	+	V	+	+	+	+s	+	-	+s	+	-	±	±	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±

+ : Réaction positive, - : Réaction négative, v : Variable, +s : Réaction lentement positive

## APPENDICE E

**Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E**

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
<b><u>ADH</u></b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<b><u>LDC</u></b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b><u>ODC</u></b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<b><u>CIT</u></b>	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
<b><u>H2S</u></b>	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
<b><u>URE</u></b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	<b>TDA / Immédiat</b>	
			jaune	Marron foncé
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	<b>IND / 2 mn, maxi</b>	
			jaune	Anneau

				rouge
<u>VP</u>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP 1 + VP 2 / 10 mn</b>	
			incoloré	Rosé-rouge
<u>GEL</u>	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/ oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

**APPENDICE G**  
**TABLE DE BERTERAND**

<b>KMnO4 0,1 N</b>	<b>Glucose (mg)</b>	<b>Sucres intervertis (mg)</b>
3,2	10,0	9,8
3,1	9,7	9,5
3,0	9,4	9,2
2,9	9,1	8,9
2,8	8,8	8,87
2,7	8,5	8,57
2,6	8,2	8,27
2,5	7,9	7,97
2,4	7,6	7,95
2,3	7,3	7,93
2,2	7,0	7,90
2,1	6,7	7,60
2,0	6,4	7,58
1,9	6,1	7,55
1,8	5,8	7,26
1,7	5,5	6,96
1,6	5,2	6,65
1,5	4,9	6,36
1,4	4,6	6,05
1,3	4,3	5,76
1,2	4,0	5,46
1,1	3,7	5,16
1,0	3,4	4,86

0,9	3,1	4,56
0,8	2,8	4,25
0,7	2,5	3,96
0,6	2,2	3,66
0,5	1,9	3,36
0,4	1,6	3,06
0,3	1,3	2,76
0,2	1,0	2,46
0,1	0,7	2,16

# APPENDICE H

## TABLE F

### TABLE DE F

Les valeurs de F 5% sont imprimées en caractère ordinaire, tandis que celles de F 1% sont en caractères gras.

$n_2^{**}$	$n_1^*$																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	30	40	50	100	$\infty$
1	161 <b>4.052</b>	200 <b>4.999</b>	216 <b>5.403</b>	225 <b>5.625</b>	230 <b>5.764</b>	234 <b>5.859</b>	237 <b>5.928</b>	239 <b>5.981</b>	241 <b>6.022</b>	242 <b>6.056</b>	243 <b>6.082</b>	244 <b>6.106</b>	245 <b>6.142</b>	246 <b>6.169</b>	248 <b>6.208</b>	250 <b>6.258</b>	251 <b>6.286</b>	252 <b>6.302</b>	253 <b>6.334</b>	254 <b>6.366</b>
2	18,51 <b>98,49</b>	19,00 <b>99,10</b>	19,16 <b>99,17</b>	19,25 <b>99,25</b>	19,30 <b>99,30</b>	19,33 <b>99,33</b>	19,36 <b>99,34</b>	19,37 <b>99,36</b>	19,38 <b>99,38</b>	19,39 <b>99,40</b>	19,40 <b>99,41</b>	19,41 <b>99,42</b>	19,42 <b>99,43</b>	19,43 <b>99,44</b>	19,44 <b>99,45</b>	19,46 <b>99,47</b>	19,47 <b>99,48</b>	19,47 <b>99,48</b>	19,49 <b>99,49</b>	19,50 <b>99,50</b>
3	10,13 <b>34,12</b>	9,55 <b>30,81</b>	9,28 <b>29,46</b>	9,12 <b>28,71</b>	9,01 <b>28,24</b>	8,94 <b>27,91</b>	8,88 <b>27,67</b>	8,81 <b>27,49</b>	8,81 <b>27,34</b>	8,78 <b>27,23</b>	8,76 <b>27,13</b>	8,74 <b>27,05</b>	8,71 <b>26,92</b>	8,69 <b>26,81</b>	8,66 <b>26,69</b>	8,62 <b>26,50</b>	8,60 <b>26,41</b>	8,58 <b>26,35</b>	8,56 <b>26,33</b>	8,53 <b>26,12</b>
4	7,71 <b>21,20</b>	6,94 <b>18,00</b>	6,59 <b>16,69</b>	6,39 <b>15,98</b>	6,26 <b>15,52</b>	6,16 <b>15,21</b>	6,09 <b>14,98</b>	6,04 <b>14,80</b>	6,00 <b>14,66</b>	5,96 <b>14,54</b>	5,93 <b>14,45</b>	5,91 <b>14,37</b>	5,87 <b>14,24</b>	5,84 <b>14,15</b>	5,80 <b>14,02</b>	5,74 <b>13,83</b>	5,71 <b>13,74</b>	5,70 <b>13,69</b>	5,66 <b>13,57</b>	5,63 <b>13,46</b>
5	6,61 <b>16,26</b>	5,79 <b>13,27</b>	5,41 <b>12,06</b>	5,19 <b>11,39</b>	5,05 <b>10,97</b>	4,95 <b>10,67</b>	4,88 <b>10,45</b>	4,82 <b>10,27</b>	4,78 <b>10,15</b>	4,74 <b>10,05</b>	4,70 <b>9,96</b>	4,68 <b>9,89</b>	4,64 <b>9,77</b>	4,60 <b>9,68</b>	4,56 <b>9,55</b>	4,50 <b>9,38</b>	4,46 <b>9,29</b>	4,41 <b>9,24</b>	4,40 <b>9,13</b>	4,36 <b>9,02</b>
6	5,99 <b>13,74</b>	5,14 <b>10,92</b>	4,76 <b>9,78</b>	4,53 <b>9,15</b>	4,39 <b>8,75</b>	4,28 <b>8,47</b>	4,21 <b>8,26</b>	4,15 <b>8,10</b>	4,10 <b>7,98</b>	4,06 <b>7,87</b>	4,03 <b>7,79</b>	4,00 <b>7,72</b>	3,96 <b>7,60</b>	3,92 <b>7,52</b>	3,87 <b>7,39</b>	3,81 <b>7,23</b>	3,77 <b>7,14</b>	3,75 <b>7,09</b>	3,71 <b>6,99</b>	3,67 <b>6,88</b>
7	5,59 <b>12,25</b>	4,74 <b>9,55</b>	4,35 <b>8,45</b>	4,12 <b>7,85</b>	3,97 <b>7,46</b>	3,87 <b>7,19</b>	3,79 <b>7,00</b>	3,73 <b>6,84</b>	3,68 <b>6,71</b>	3,63 <b>6,62</b>	3,60 <b>6,54</b>	3,57 <b>6,47</b>	3,52 <b>6,35</b>	3,49 <b>6,27</b>	3,44 <b>6,15</b>	3,38 <b>5,98</b>	3,34 <b>5,90</b>	3,32 <b>5,85</b>	3,28 <b>5,75</b>	3,23 <b>5,65</b>
8	5,32 <b>11,26</b>	4,46 <b>8,65</b>	4,07 <b>7,59</b>	3,84 <b>7,01</b>	3,69 <b>6,63</b>	3,58 <b>6,37</b>	3,50 <b>6,19</b>	3,44 <b>6,03</b>	3,39 <b>5,91</b>	3,34 <b>5,82</b>	3,31 <b>5,74</b>	3,28 <b>5,67</b>	3,23 <b>5,56</b>	3,20 <b>5,48</b>	3,15 <b>5,36</b>	3,08 <b>5,20</b>	3,05 <b>5,11</b>	3,03 <b>5,06</b>	2,98 <b>4,96</b>	2,93 <b>4,86</b>
9	5,12 <b>10,56</b>	4,26 <b>8,02</b>	3,86 <b>6,99</b>	3,63 <b>6,42</b>	3,48 <b>6,06</b>	3,37 <b>5,80</b>	3,29 <b>5,62</b>	3,23 <b>5,47</b>	3,18 <b>5,35</b>	3,13 <b>5,26</b>	3,10 <b>5,18</b>	3,07 <b>5,11</b>	3,02 <b>5,00</b>	2,98 <b>4,92</b>	2,93 <b>4,80</b>	2,86 <b>4,54</b>	2,82 <b>4,56</b>	2,80 <b>4,51</b>	2,76 <b>4,41</b>	2,71 <b>4,31</b>
10	4,96 <b>10,04</b>	4,10 <b>7,56</b>	3,71 <b>6,55</b>	3,48 <b>5,99</b>	3,33 <b>5,64</b>	3,22 <b>5,39</b>	3,14 <b>5,21</b>	3,07 <b>5,06</b>	3,02 <b>4,95</b>	2,97 <b>4,85</b>	2,94 <b>4,78</b>	2,91 <b>4,71</b>	2,86 <b>4,60</b>	2,82 <b>4,52</b>	2,77 <b>4,41</b>	2,70 <b>4,25</b>	2,67 <b>4,17</b>	2,64 <b>4,12</b>	2,59 <b>4,01</b>	2,54 <b>3,91</b>
11	4,84 <b>9,65</b>	3,98 <b>7,20</b>	3,59 <b>6,22</b>	3,36 <b>5,67</b>	3,20 <b>5,32</b>	3,09 <b>5,07</b>	3,01 <b>4,88</b>	2,95 <b>4,74</b>	2,90 <b>4,63</b>	2,86 <b>4,51</b>	2,82 <b>4,46</b>	2,79 <b>4,40</b>	2,74 <b>4,29</b>	2,70 <b>4,21</b>	2,65 <b>4,10</b>	2,57 <b>3,94</b>	2,53 <b>3,86</b>	2,50 <b>3,80</b>	2,45 <b>3,70</b>	2,40 <b>3,60</b>
12	4,75 <b>9,33</b>	3,88 <b>6,93</b>	3,49 <b>5,95</b>	3,26 <b>5,41</b>	3,11 <b>5,06</b>	3,00 <b>4,82</b>	2,92 <b>4,65</b>	2,85 <b>4,50</b>	2,80 <b>4,39</b>	2,76 <b>4,30</b>	2,72 <b>4,22</b>	2,69 <b>4,16</b>	2,64 <b>4,05</b>	2,60 <b>3,98</b>	2,54 <b>3,88</b>	2,46 <b>3,70</b>	2,42 <b>3,61</b>	2,40 <b>3,56</b>	2,35 <b>3,46</b>	2,30 <b>3,36</b>
13	4,67 <b>9,07</b>	3,80 <b>6,70</b>	3,41 <b>5,74</b>	3,18 <b>5,20</b>	3,02 <b>4,86</b>	2,92 <b>4,62</b>	2,84 <b>4,44</b>	2,77 <b>4,30</b>	2,72 <b>4,19</b>	2,67 <b>4,10</b>	2,63 <b>4,02</b>	2,60 <b>3,96</b>	2,55 <b>3,85</b>	2,51 <b>3,78</b>	2,46 <b>3,67</b>	2,38 <b>3,51</b>	2,34 <b>3,42</b>	2,32 <b>3,37</b>	2,26 <b>3,27</b>	2,21 <b>3,16</b>
14	4,60 <b>8,86</b>	3,74 <b>6,51</b>	3,34 <b>5,56</b>	3,11 <b>5,03</b>	2,96 <b>4,69</b>	2,85 <b>4,46</b>	2,77 <b>4,28</b>	2,70 <b>4,14</b>	2,65 <b>4,03</b>	2,60 <b>3,94</b>	2,56 <b>3,86</b>	2,53 <b>3,80</b>	2,48 <b>3,70</b>	2,44 <b>3,62</b>	2,39 <b>3,51</b>	2,31 <b>3,34</b>	2,27 <b>3,26</b>	2,24 <b>3,21</b>	2,19 <b>3,11</b>	2,13 <b>3,00</b>
15	4,54 <b>8,68</b>	3,68 <b>6,36</b>	3,29 <b>5,42</b>	3,06 <b>4,89</b>	2,90 <b>4,56</b>	2,79 <b>4,32</b>	2,70 <b>4,14</b>	2,64 <b>4,00</b>	2,59 <b>3,89</b>	2,55 <b>3,80</b>	2,51 <b>3,73</b>	2,48 <b>3,67</b>	2,43 <b>3,56</b>	2,39 <b>3,48</b>	2,33 <b>3,36</b>	2,25 <b>3,20</b>	2,21 <b>3,12</b>	2,18 <b>3,07</b>	2,12 <b>2,97</b>	2,07 <b>2,87</b>
16	4,49 <b>8,53</b>	3,63 <b>6,23</b>	3,24 <b>5,29</b>	3,01 <b>4,77</b>	2,85 <b>4,44</b>	2,74 <b>4,20</b>	2,66 <b>4,03</b>	2,59 <b>3,89</b>	2,54 <b>3,78</b>	2,49 <b>3,69</b>	2,45 <b>3,61</b>	2,42 <b>3,55</b>	2,37 <b>3,45</b>	2,33 <b>3,37</b>	2,28 <b>3,25</b>	2,20 <b>3,10</b>	2,16 <b>3,01</b>	2,13 <b>2,96</b>	2,07 <b>2,86</b>	2,01 <b>2,75</b>
17	4,45 <b>8,40</b>	3,59 <b>6,11</b>	3,20 <b>5,18</b>	2,96 <b>4,67</b>	2,81 <b>4,34</b>	2,70 <b>4,10</b>	2,62 <b>3,98</b>	2,55 <b>3,79</b>	2,50 <b>3,68</b>	2,45 <b>3,59</b>	2,41 <b>3,52</b>	2,38 <b>3,45</b>	2,33 <b>3,35</b>	2,29 <b>3,27</b>	2,23 <b>3,16</b>	2,15 <b>3,00</b>	2,11 <b>2,92</b>	2,08 <b>2,86</b>	2,02 <b>2,76</b>	1,96 <b>2,65</b>
18	4,41 <b>8,28</b>	3,55 <b>6,01</b>	3,16 <b>5,09</b>	2,93 <b>4,58</b>	2,77 <b>4,25</b>	2,66 <b>4,01</b>	2,58 <b>3,85</b>	2,51 <b>3,71</b>	2,46 <b>3,60</b>	2,41 <b>3,51</b>	2,37 <b>3,44</b>	2,34 <b>3,37</b>	2,29 <b>3,27</b>	2,25 <b>3,19</b>	2,19 <b>3,07</b>	2,11 <b>2,91</b>	2,07 <b>2,83</b>	2,04 <b>2,78</b>	1,98 <b>2,62</b>	1,92 <b>2,57</b>
19	4,38 <b>8,18</b>	3,52 <b>5,93</b>	3,13 <b>5,01</b>	2,90 <b>4,50</b>	2,74 <b>4,17</b>	2,63 <b>3,94</b>	2,55 <b>3,77</b>	2,48 <b>3,63</b>	2,43 <b>3,52</b>	2,38 <b>3,43</b>	2,34 <b>3,36</b>	2,31 <b>3,30</b>	2,26 <b>3,19</b>	2,22 <b>3,12</b>	2,15 <b>3,00</b>	2,07 <b>2,84</b>	2,02 <b>2,76</b>	2,00 <b>2,70</b>	1,94 <b>2,60</b>	1,88 <b>2,49</b>
0	4,35 <b>8,10</b>	3,49 <b>5,85</b>	3,10 <b>4,94</b>	2,87 <b>4,43</b>	2,71 <b>4,10</b>	2,60 <b>3,87</b>	2,52 <b>3,71</b>	2,45 <b>3,56</b>	2,40 <b>3,45</b>	2,35 <b>3,37</b>	2,31 <b>3,30</b>	2,28 <b>3,23</b>	2,23 <b>3,13</b>	2,18 <b>3,05</b>	2,12 <b>2,94</b>	2,04 <b>2,77</b>	1,99 <b>2,69</b>	1,96 <b>2,63</b>	1,90 <b>2,53</b>	1,84 <b>2,42</b>

nombre de degrés de liberté de la variance à comparer avec celle de l'erreur (Blancs, Traitements).  
nombre de degrés de liberté de la variance de l'erreur.

**APPENDICE H**  
**TABLE F (SUITE)**

TABLE DE F (suite).

$n_2$	$n_1$																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	30	40	50	100	$\infty$
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,47	2,40	2,35	2,30	2,26	2,23	2,18	2,13	2,07	1,98	1,93	1,91	1,81	1,78
	7,94	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26	3,18	3,12	3,02	2,94	2,83	2,67	2,58	2,53	2,42	2,31
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,43	2,36	2,30	2,26	2,22	2,18	2,13	2,09	2,02	1,94	1,89	1,86	1,80	1,73
	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,25	3,17	3,09	3,03	2,93	2,85	2,74	2,58	2,49	2,44	2,33	2,21
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,18	2,15	2,10	2,05	1,99	1,90	1,85	1,82	1,76	1,69
	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,17	3,09	3,02	2,96	2,86	2,77	2,66	2,50	2,41	2,36	2,25	2,13
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,36	2,29	2,24	2,19	2,15	2,12	2,06	2,02	1,96	1,87	1,81	1,78	1,72	1,65
	7,46	5,45	4,57	4,07	3,76	3,53	3,36	3,23	3,11	3,03	2,95	2,90	2,80	2,71	2,60	2,44	2,35	2,30	2,18	2,08
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,34	2,27	2,21	2,16	2,12	2,09	2,04	1,99	1,93	1,84	1,79	1,76	1,69	1,62
	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,06	2,98	2,90	2,84	2,74	2,66	2,55	2,38	2,29	2,24	2,13	2,01
32	4,15	3,30	2,90	2,67	2,51	2,40	2,32	2,25	2,19	2,14	2,10	2,07	2,02	1,97	1,91	1,82	1,76	1,74	1,67	1,59
	7,50	5,34	4,46	3,97	3,66	3,42	3,25	3,12	3,01	2,94	2,86	2,80	2,70	2,62	2,51	2,34	2,25	2,20	2,08	1,96
34	4,13	3,28	2,88	2,65	2,49	2,38	2,30	2,23	2,17	2,12	2,08	2,05	2,00	1,95	1,89	1,80	1,74	1,71	1,64	1,57
	7,44	5,29	4,42	3,93	3,61	3,38	3,21	3,08	2,97	2,89	2,82	2,76	2,66	2,58	2,47	2,30	2,21	2,15	2,04	1,91
36	4,11	3,26	2,86	2,63	2,48	2,36	2,28	2,21	2,15	2,10	2,06	2,03	1,98	1,93	1,87	1,78	1,72	1,69	1,62	1,55
	7,39	5,25	4,38	3,89	3,58	3,35	3,18	3,04	2,94	2,86	2,78	2,72	2,62	2,54	2,43	2,26	2,17	2,12	2,00	1,87
38	4,10	3,25	2,85	2,62	2,46	2,35	2,26	2,19	2,14	2,09	2,05	2,02	1,96	1,92	1,83	1,76	1,74	1,67	1,60	1,53
	7,35	5,21	4,34	3,86	3,54	3,32	3,15	3,02	2,91	2,82	2,75	2,69	2,59	2,51	2,40	2,22	2,14	2,08	1,97	1,84
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,07	2,04	2,00	1,95	1,90	1,84	1,74	1,69	1,66	1,59	1,51
	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,88	2,80	2,73	2,66	2,56	2,49	2,37	2,20	2,11	2,05	1,94	1,81
42	4,07	3,22	2,83	2,59	2,44	2,32	2,24	2,17	2,11	2,06	2,02	1,99	1,94	1,89	1,82	1,71	1,66	1,64	1,57	1,49
	7,27	5,15	4,29	3,80	3,49	3,26	3,10	2,96	2,86	2,77	2,70	2,64	2,54	2,46	2,35	2,17	2,08	2,02	1,91	1,78
44	4,06	3,21	2,82	2,58	2,43	2,31	2,23	2,16	2,10	2,05	2,01	1,98	1,92	1,88	1,81	1,72	1,66	1,63	1,56	1,48
	7,24	5,12	4,26	3,78	3,46	3,24	3,07	2,94	2,84	2,75	2,68	2,62	2,52	2,44	2,32	2,15	2,06	2,00	1,88	1,75
46	4,05	3,20	2,81	2,57	2,42	2,30	2,22	2,14	2,09	2,04	2,00	1,97	1,91	1,87	1,80	1,71	1,65	1,62	1,54	1,46
	7,21	5,10	4,24	3,76	3,44	3,22	3,05	2,92	2,82	2,73	2,66	2,60	2,50	2,42	2,30	2,13	2,04	1,98	1,86	1,72
48	4,04	3,19	2,80	2,56	2,41	2,30	2,21	2,14	2,08	2,03	1,99	1,96	1,90	1,86	1,79	1,70	1,64	1,61	1,53	1,45
	7,19	5,08	4,22	3,74	3,42	3,20	3,04	2,90	2,80	2,71	2,64	2,58	2,48	2,40	2,28	2,11	2,02	1,96	1,84	1,70
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,20	2,13	2,07	2,02	1,98	1,95	1,90	1,85	1,78	1,69	1,63	1,60	1,52	1,44
	7,17	5,06	4,20	3,72	3,41	3,18	3,02	2,88	2,78	2,70	2,62	2,56	2,46	2,39	2,26	2,10	2,00	1,94	1,82	1,68
50	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,95	1,92	1,86	1,81	1,75	1,65	1,59	1,56	1,48	1,39
	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72	2,63	2,56	2,50	2,40	2,32	2,20	2,03	1,93	1,87	1,74	1,60
0	3,98	3,13	2,74	2,50	2,35	2,23	2,14	2,07	2,01	1,97	1,93	1,89	1,84	1,79	1,72	1,62	1,56	1,53	1,45	1,35
	7,01	4,92	4,08	3,60	3,29	3,07	2,91	2,77	2,67	2,59	2,51	2,45	2,35	2,28	2,15	1,98	1,88	1,82	1,69	1,53
10	3,94	3,09	2,70	2,46	2,30	2,19	2,10	2,03	1,97	1,92	1,88	1,85	1,79	1,75	1,68	1,57	1,51	1,48	1,39	1,28
	6,90	4,82	3,98	3,51	3,20	2,99	2,82	2,69	2,59	2,51	2,43	2,36	2,16	2,19	2,06	1,89	1,79	1,73	1,59	1,43
0	3,89	3,04	2,65	2,41	2,26	2,14	2,05	1,98	1,92	1,87	1,83	1,80	1,74	1,69	1,62	1,52	1,45	1,42	1,32	1,19
	6,76	4,71	3,88	3,41	3,11	2,90	2,73	2,60	2,50	2,41	2,34	2,28	2,17	2,09	1,97	1,79	1,69	1,62	1,48	1,28
0	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	2,01	1,94	1,88	1,83	1,79	1,75	1,69	1,64	1,57	1,46	1,40	1,35	1,24	1,09
	6,64	4,60	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32	2,24	2,18	2,07	1,99	1,87	1,69	1,59	1,52	1,36	1,09

## REFERENCES

- [1] Zarrouk, C., "Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler", Thèse de doctorat, Faculté des sciences de l'Université de Paris (1966).
- [2] Cifferri, O. et Tiboni, O., "The Biochemistry and Industrial Potential of *Spirulina*", *Ann. Rev. Microbiol.*, n° 39, (1985), 503-526.
- [3] Kay, R.A., "Microalge as Food and Supplement", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, n° 30(6), (1991), 555-573.
- [4] Dillon, J.C., Phan, P.A., et Dubacq, J.P., "Nutritional value of the alga *Spirulina*", in SIMOPOULOS A.P. (ed) *Word Rev. Nutr. Diet.*, Besel: Karger, n°77, (1995), 32- 46.
- [5] Kozlenko, R., Henson, R.H., "Les dernières recherches sur la *Spirulina* : effets sur le virus du SIDA, le cancer et le système immunitaire", (1996) Disponible sur : [www.spirulina.com/SPLNews96Fr.html](http://www.spirulina.com/SPLNews96Fr.html), consulté le 15 décembre 2004.
- [6] Henrikson, R., "Earthfood *Spirulina*: How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet" (th ed). Petaluma: Ronore Entreprise Inc. (1999) Disponible sur: <http://www.spirulinasource.com/earthfood.html>

- [7] Cornet, J.F., "Les photobioréacteurs". Le technoscope de BIOFUTU, n° 176, cahier n° 101, (1998).
- [8] Jordan, J.P., "Cultivez votre spiruline", Manuel de culture artisanale de la spiruline, (2005) Disponible sur <http://www.spirulinasource.com/cultivez.html>
- [9] Melissa, "Final report for 1995 activity", Agence Spatial Européenne Noordwijk, Hollande, (1996), Disponible sur <http://extids.estec.esa.nl/melissa/>
- [10] Melissa, "Final report for 1996 activity", Agence Spatial Européenne, Noordwijk, Hollande, (1997) Disponible sur <http://extids.estec.esa.nl/melissa/>
- [11] Fox, R.D., "Algoculture : la spirulina, un espoir pour le monde de la faim", Edisud, Aix En Povençe, (1986)
- [12] Fox, R.D., "Spirulina, production & potential", Edisud, Aix en Provence, (1996)
- [13] Fox, R.D., "Spiruline, Technique pratique et promesse", Edisud, Aix en Provence, (1999), Page 8 sur 10.
- [14] Sautier, C. et Tremolieres, J., "Valeur alimentaire des algues spiruline chez l'homme", Ann. Nutr. Aliment, (1975), 29, 517-533.
- [15] Bucaille, P., "Intérêt et efficacité de l'algue spirulina dans l'alimentation des enfants présentant une malnutrition protéino-énergétique en milieu tropical", Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, (1990)
- [16] Delpeuch, "Clinical Experimentation With *Spirulina*", National Institut of Nutrition, Mexico City, (1975)

- [17] Miao, “*Spirulina* in Jiangxi Chin Academy of Agricultural Science”, presented at Soc. Appl. Algology, Lille France, (1987)
- [18] Proteus, Inc, “Clinical Experimentation with *Spirulina*”, National Institut of Nutrition, Mexico City, (1975)
- [19] Santillan, “Cultivation of the *Spirulina* for Human Consumption and for Animal Feed”, International Congress of Food Science and Technoloy, Madrid (Spain), (1974)
- [20] Seshacri, “Large scale nutritional supplementation with spirulina alga-All India Coordinated Project on spirulina”, Shri Amm. Murugappa Chettiar Research Center (MCRC) Madras, India, (1993)
- [21] Fox, “Le programme intergouvernemental Spirulina pour réduire la malnutrition”, (2002) disponible sur : [www.spirulina-program.Org/isp-b-FR.htm](http://www.spirulina-program.Org/isp-b-FR.htm), consulté le 05 septembre 2010.
- [22] Feziny, S. F., “Effets bénéfiques de la spiruline : suivi des différents cas de maladie en milieu urbain pour la période 2006-2008” In La spiruline et le développement, formation et transfert de technologie, en matière de culture de spiruline, Colloque international sur la spiruline; TOLIARA - SUD-OUEST MADAGASCAR, (2008)
- [23] Simpore, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., Biondi, D., Ruberto, G., Musumeci, S., “Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and MISOLA”, Nutr. J., 23, 5 (1), 3, (2006)
- [24] Anonyme, “Extrait d'un article paru dans Énergie et santé N°57, concernant la spiruline”. Disponible sur <http://www.spiruline-allaitement.com/>

- [25] <http://www.domainespiruline.com/dossiers.cfm> publié le 14/12/2010.
- [26] Chopra, K. and Bishonoi, M., "Antioxydant Profile of Spirulina : A Blue-Green Microalga in Spirulina In Gershwin & Belay (ed.) Spirulina in Human Nutrition and Health, (2007), 101-118.
- [27] Chorus, I. and Bartram, J., "Toxic cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management", Disponible sur: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/toxcyanobacteria.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxcyanobacteria.pdf), page consultée le 11 décembre 2010.
- [28] Prat R. et Vonarx V., "La structure de chloroplaste : La théorie endosymbiotique", <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/endosymbiose.htm>, page consultée le 23 janvier 2010.
- [29] Anonyme, Disponible sur : <http://www.sophienature.com/spiruline.pdf>
- [30] Fox, D., "Spiruline : technique pratique et promesse", Aix en Provence : Edi. Sud, (1999), 246 p.
- [31] Falquet, Jacques "La malnutrition", Antenna technologie, (2000).
- [32] Charpy, L., José Langlade, M. et Alliod, R., « La spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? », (2008), P 49.
- [33] Lindblad, P., Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Troshina, O., "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, (1998), 11-13.

- [34] Moreau, F., « Les cyanophytes », in Botanique, Encyclopédie de la Pléiade, nrf , (1960), 27-47.
- [35] De Reviere, B., « Biologie et phylogénies des algues », Belin, Tome (2), (2003), 255P.
- [36] Geitler, L., "Cyanophyceae. In: Rabenhorst's Kryptogamen flora von Deutschland, Osterreich und derschweiz. Kolkwits R. (Eds.) Leipzig Germany Akademische Verlagsgesellschaft, (1932), p14.
- [37] Anonyme, Disponible sur:  
<http://www.nies.go.jp/biology/mcc/images/PCD4211/0049L.jpg>
- [38] Mühling, M., Harris, N., Belay, A., Whitton, B-A, "Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*", Journal of Phycology, V. 39, (2003), 360-367.
- [39] Merceron, M., "Cyanobactéries", (2006), Site web:  
<http://www.ecosociosystemes.fr/cyanophycees.html>.
- [40] Gerschwin, E., "UC David School of Medicine", Journal of Medicinal Foods, (2000)
- [41] Marty, F., and Busson, F., "Données cytologiques et systématiques sur *Spirulina platensis* (Gom.) Ceitl. et *Spirulina Geitleri* J.De Toni (Cyanophyceae-Oscillatoriaceae)", C.R. Acad. Sc. Paris, (1970), 270-786.
- [42] Doumenge, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A., "Spiruline, algue de vie/ *Spirulina*, algae of life" Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, numéro spécial 12, Monaco : Musée Océanographique, (1993).

- [43] Tomaselli, L., Palandri, M.R. et Tani, G., "Advances in preparative techniques for observation of the fine structure of *Arthrospira maxima* Setch et Gardner (syn. *Spirulina maxima* Geitler)", Arch. Hydrobiol. Suppl. 100, Algol. Stud., V. 71, n°43, (1993).
- [44] Anonyme, « Antenna Technologies. Malnutrition. Spiruline : quelques bases scientifiques », (2007), site web :  
<http://www.antenna.ch/doicuments/biologies.pdf>.
- [45] Castenholz, R.W., Rippka, R., Herdman, M. et Wilmotte, A., From-genus, I., "Arthrospira Stizenberger 1852", Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (D.R. Boone & R.W. Castenholz, eds.), V. 1, (2001), 542-543.
- [46] Balloni, W., Tomasselli, S., Giovannetti, M-C. and Margheri, M-C., « Biologia fondamentale del genera *Spirulina* », in Materassi R. (ed.) Prospective della coltura di *Spirulina* in Italia. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome, (1980), 49-85.
- [47] Cruchot, H., "La Spiruline bilan et perspective", Thèse de doctorat, (2008) 332p.
- [48] König, C., "Les algues : première lignée végétale [en ligne]. C06/10/2007. [consulté le 11/2010]. Disponible sur :  
<http://www.futurasciences.com/fr/comprendre/dossiers/dos/t/botanique/d/les-algues-premiere-lingee-vegetale-523/c3/221/p2>
- [49] Moreau, F., Prat. R., "La photosynthèse : Localisation de la photosynthèse (en ligne) c 05/04/2005. Consulté le 04/01/2010. Disponible sur :  
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthèse-cours/02-localisation.htm>.
- [50] La plus importante réaction de la terre : la photosynthèse; Disponible sur :  
<http://www.ordiecole.com/biol/photosynthèse.pdf> ou sur :

<http://www.ordiecole.com/biol/botanique.html>

- [51] Clement, G., "Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*", Ann. Nutr. Aliment, (1975), V. 29, 477-487.
- [52] Henrikson, R., "Earth food Spirulina (Ronore enterprises, Inc.)", Disponible sur le site: <http://www.spirulina source.com>, (1994).
- [53] Borowitzka, M.A., Borowitzka L.J., "Micro-Algal biotechnology, New York : Cambridge University Press, (1988), 477pp.
- [54] Rogosa, M., "Genus III, *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In : Buchanan R., Gibbons N., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins : Baltimore, (1974) 669-676.
- [55] Hudson, B.J.F. et Karis, I.G., "The Lipids of the Alga *Spirulina*", J. Sci. Fd. Agric., 25, (1974), 759-763.
- [56] Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang, Z., Li, Z., Cai, Y., Ou, C., Lin, H. et Lmbs, A.B., "Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*", Food Chemistry, 77, (2002), 9-13.
- [57] Pascaud, M., "The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune reponse", Bull. Inst. Océano, Monaco, n° special 12, (1993).
- [59] Samuels, R., Mani, U.V., Iyer, U.M., Nayak, U.S., "Hypocholesterolemic effect of spirulina in patients with hyperlipidemic nephritic syndrome", J. Med. Food, Summer, 5 (2), (2002), 91-96.
- [60] Ciferri, O., "Spirulina, The edible micro organism", Microbiological reviews. Vol. 47, (1983), 551-578.

- [61] Cohen, Z., Reungjitchachawali, M., Siangdung, W. and Tanticharoen, M., "Production and partial purification of gamma-linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*", Journal of Applied Phycology, V. 5, (1993), 109-115.
- [62] Falquet, J. et Hurni, J.P., "Spiruline: Aspect nutritionnels ", Antenna technologie, (2006), Disponibles sur le site : [http://www.antenna.ch/documents/asp Nutr.2006.pdf](http://www.antenna.ch/documents/asp_Nutr.2006.pdf)
- [63] Kiet, P.O., and Durand- Chastel, H., "Spirulina rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids. In Charpy et al. (ed.) International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development, (2006), 111-117.
- [64] Colla, L.M., Bertolin, T.E., Costa, J.A.V., "Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations", Z. Naturforsch. C. 59, (2004), 55-59.
- [65] Quillet, M., "Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les spirulines", Ann. Nutr. Aliment, V. 29, (1975), 517-533.
- [66] Shekharam, K.M., Venkataraman, L.V. and Salimath, P.V., "Carbohydrate Composition and Characterization of To Unusual Sugars from the Blue Green Alga *Spirulina-Platensis*", Phytochemistry, V. 26, (1987), 2267-2270.
- [67] Challem, J.J., Passwater, R.A., Mindell, E.M., "Spirulina", Keats Publishing. Inc. New Canaan Connecticut, (1981)
- [68] Clement, G., Giddey, C. et Menzi, R., "Amino acid composition and nutritive value of the algae *Spirulina maxima*", J. Sci. Fd. Agric., 18, (1967), 467-501.
- [69] Jacquet, J., "Utilisation biologiques des Spirulines", Bull. Acad. Vét. XLVII,

(1974).

- [70] Lee, J.B., Hayashi, T., Hayashi, K., Sankawa, U., Maeda, M., Nemoto, T., Nakanishi, H., "Purification and structural analysis of calcium spirulina from *Spirulina platensis*", Journal of natural products, V. 61, n°9, (1998), 1101-1104.
- [71] Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, H.N., ElSohly, M.A. et Pasco, D.S., "Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*", Planta Medica, V. 67, (2001), 737-742.
- [72] Lobner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K. et Nielsen, C.H., "Enhancement of Human Adaptation Immue Responses by Administration of a High-Molecular-Weight Polysaccharide Extract from the Cyanobacterium *Arthrospira platensis*", Journal of Medicinal Food, V. 11, n°2, (2008), 313-322.
- [73] Santillon, C., "Cultivation of the Spirulina for Human Consumption and for animal Feed", International Congress of Food Science and Technology Madrid (Spain), September (1974).
- [74] Bujard, E.U., Braco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., wuhrmann, J.J. and Clément, G., «Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (Spirulina) and their Possible Use in Food Formulations 3<sup>rd</sup>», International Congress of Food Science and Technology, Washington, (1970)
- [75] Seshadri, C.V., Umesh, B.V. et Manoharan, R., « Beta-carotene studies in Spirulina Society of Applied Algology, International conference n°5, V. 38, n° 2-3, (1991), 111-113.
- [76] Vincenzini, M., Ferrari, F., Margheri, M.O. and Florenzano, G., "Quinonoid

and tocopherol levels in *Spirulina platensis*”, *Microbiologica*, V. 3, (1979), 131-136.

- [77] Gomez-Coronado, D.J.M., Ibanez, E., Ruperez, F.J. and Barbas, C., “Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin”, *J. Chromatogr. A* V. 1054, (2004), 227-233.
- [78] Yates, A.A., « National nutrition and public health policies: Issues related to bioavailability of nutrients when developing dietary reference intakes”, *Journal of Nutrition*, V. 131, (2001), 1331-1334.
- [79] Watanabe, F., « Vitamin B12 » Source and Bioavailability, *Experimental Biology and Medicine*, V. 232, (2007), 1266-1274.
- [80] Pierlovisi, C., « L’homme et la spiruline : Un avenir commun ? Composition chimique, intérêt alimentaires et activités biologiques », Paris V-rené Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, (2007), 162P.
- [81] Henrikson, R., “Microalga *Spirulina* superalimento del future”, Barcelona: Ediciones S.A. Uranop, ISBN, 84-7953-047-2, (1994).
- [82] Wang, J., Wang, Y., Wang, Z. Li, L., Qin, J., Lai, W., Fu, Y, Suter, P.M., Rusell, R.M., Grusak, M., Tang, G. and Yin, S., “Vitamin A equivalence of spirulina beta-carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method”, *American Journal of Clinical Nutrition* V. 87, n°6, (2008), 1730-1737.
- [83] Campanella, L., Crescentini, G. and avino, P., “Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina Analisis*”, V. 27, (1999), 533-540.

- [84] Johnson P. et Shubert, E., "Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green algae", *Nutrition Research*, V. 6, (1986), 85-94.
- [85] Puyfoulhoux G., Rouanet, J.M., Besançon, P., Baroux, B., Baccou, J.C. et Caporiccio, B., « Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Cacoa-2 cell culture mode », *J. Agric. Food Chem.* V. 49, (2001), 1625-1629.
- [86] Gibson, R.S., « Zinc: the missing link in combatting micronutrient malnutrition in developing countries, *Proc. Nut. Soc.*, V. 65, (2005), 51-60.
- [87] Briend, A., "La malnutrition de l'enfant", Institut Danone, rue du Duc 100, Bruxelles, (1998)
- [88] Chen, T, Zheng, W, Wong, YS, Yang, F, Bai, Y., "Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose", *Bioresour. Technol.*, (2006), 97 (18) : 2260-5.
- [89] Li, Z., Yang, S., Lin, H., Huang, J., Watkins, P.A., Mose, A.B., Desimone, C., Song, X.Y., Diehl, A.M., "Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease", *Hepatology*, 37, (2003), 343-50.
- [90] Cases, J., Puig, M., Caporiccio, B., Baroux, B., Baccou, J.C., Besancon, P. and Rouanet, J.M., "Glutathione-related enzymatic activities in rats receiving high cholesterol or standard diets supplemented with two forms of selenium", *Food Chemistry*, V. 65, n°2, (1999), 207-211.
- [91] Cases, J., Vacchina, V., Napolitano, A., Caporiccio, B., Besancon, P., Lobinski, R. and Rouanet, J.M., "Selenium from selenium-rich *Spirulina* is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine

in selenium-deficient rats”, J., Nutr., V. 131, n°9, (2001), 2343-2350.

- [92] Cases, J., Wysocka, I.A., Caporiccio, B., Jouy, N., Besancon, P., Szpunar, J. et Rouanet, J.M., “Assessment of selenium bioavailability from high-selenium spirulina subfractions in selenium deficient rats”, J. Agric., Food Chem., V. 19, n°13, (2002), 3867-3873.
- [93] Mazo, V.K., “Microalgae spirulina in human nutrition”, vopr Pitan, V. 73, (2004), 45-53.
- [94] Singh, Y., Kumar, H.D., “Adaptation of a strain of *Spirulina platensis* to grow in cobalt-and iodine-enriched media”, J-Appl-Bacteriol., V. 76, n°2, (1994), 149-154.
- [95] Vonshak, A., “*Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology Cell biology an biotechnology”, Taylor & Francis LTD, (1997).
- [96] Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C. and Chu, X.M., “Molecular immune mechanism of phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro”, Biotechnology An Applied Biochemistry, V. 43, n°3, (2006), 155-164.
- [97] Chopra, K. and Bishnoi, M., “Antioxydant Profile of Spirulina : A Blue-Green Microalga in Spirulina In Gershwin & Belay (ed.) Spirulina in Human Nutrition and Health, (2007), 101-118.
- [98] Wu, L-c. and Ho, J-a A., “Antioxydative and Hepatoprotective Effetcts of Spirulina l”, Gershwin & Belay (ed.), Spirulina in Human Nutrition and Health, (2007), 119-151.

- [99] Fedkovic, Y., Astre, C., pinguet, F., Gerber, M., Ychou, M. and Pujol, H.,  
“Spirulina and cancer”, Bull. Inst. Oceano, Monaco NS, V. 12, (1993), 117-120.
- [100] Branger, J.L., Cadudal, M., Delobel, H., Ouoba, P., Yameogo, D.,  
Ouedraogo, D., Guerin, A., Valea, les personnel's des CREN, C., Zombre, P,  
Ancel, “La spirulina comme complement alimentaire dans la malnutrition du  
nourrisson au Burkina-Faso ”, mémoire originale, Archives de pédiatrie, V.  
10, (2003), 424-431.
- [101] Wallon, Jean, Claude, “ La production de la spiruline, efficace complément  
alimentaire pour les enfants”, (2003)
- [102] Mahesh, S., Babu, M., Gopaldaswamy, G. and Chancramohan, N.,  
“Identification of an antiviral principal in *Spirulina platensis* against *Bombyx  
mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV)”, Indian Journal of Biotechnology,  
V. 4, (2005), 384-388.
- [103] Gustafson, K., AIDS, “Antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green  
algae)”, Journal of the National Cancer Institut, V. 81, n°16, (1989), 1254-1258.
- [104] Clement, G., « Production et constituants caractéristiques des algues  
*Spirulina platensis* et *maxima* », *Ann. Nutr. Aliment*, V. 29, (1975), 477-487
- [105] Shih, S.R., Tsai, K.N., Li, Y.S., Chueh, C.C. and Chan, E.C., “ Inhibition of  
enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-  
green alga *Spirulina platensis*”, Journal of Medical virology, V. 70 n°1,  
(2003), 119-125.
- [106] Sharaf, M., Amara, A., Aboul-Enein, A., Helmi, S., Ballot, A., Astani, A. and

Schnitzler, P., "Molecular authentication and characterization of the antiherpetic activity of the cyanobacterium *Arthrospira Fusiformis*, V. 65, n°2, (2010), 132-136.

- [107] Schaeffer, D.J. et Krylov, V.S., "Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria", *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 45, n°3, (2000), 208-227.
- [108] Simpure, J., Salvatore, Pignatelli, I. and Salvatore, Musumeci, "The effects of Spiruline on the immune functions of HIV-infected undernourished children", *J. Infect. Developing Countries*, V. 1, n°2, (2007), 112-117.
- [109] Ozdemir, G., Karabay, N.U., Dalay, M. and Pazarbasi, B., "Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*", *Phytother, Res.* V. 18, n°9, (2004), 754-757.
- [110] Becher, E-W., Jakover, B., Luft, D. and Schmuelling, R-M, "Clinical and biochemical evaluations of the alga spirulina with regard to its application in the treatment of obesity: a double-blind cross-over study", *Nutr. Rep. Int.* V. 33, (1986), 565-574.
- [111] Mani, U.V., Desai, S. and Lyer, U., "Studies on the long-term effect of Spirulina supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in NIDDM patients", *J. Nutraceut.* V. 2, n°3, (2000), 25-32.
- [112] Anuradha, V., et Vidhya, D., "Impact of administration of Spirulina on the blood glucose levels of selected diabetic patients", *Indian J. Nutr. Dietet.*, V. 38, (2001), 40-44.
- [113] Lyer Uma, M., Ahmedi, S. and Mani Uliyar, V., "Glycemic and lipemic responses of selected Spirulina- supplemented rice-bases recipes in normal

subjects INT. J. DIAB. DEV. Countries, V. 19, (1999), 17-22.

- [114] Takai, Y., Hosoyamada, Y., and Kato, T., "Effect of water-soluble and water-insoluble fractions of Spirulina over serum lipids and glucose resistance of rats", J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci. V. 5; (1991), P. 27-30.
- [115] Hirahashi, T., Matsumoto, M., "activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of Spirulina platensis", Int. Immunopharmacol, V. 2, n°4, (2002), 423-434.
- [116] Rasool, M. and Sabina, E.P., "Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis*: an in vivo and in vitro study", j. Nat., V. 63, (2009), 169-175.
- [117] Andreani, G., "Spiruline : système sanguine, système immunitaire et cancer", Phytothérapie, n°4, (2005), 158-161.
- [119] Schwartz J., Shklar G., Reid S. and Trickler D., 1988 "Prevention of experimental oral cancer by extracts of Spirulina-Dunaliella algae", Nutr. Cancer, V. 11, 127-134.
- [122] Lisheng L., et al. "Inhibitive effect and mechanism of polysaccharide of Spirulina platensis on transplanted tumor cells in mice. Marine Sciences, Qindao, China, V. 5, (1991), 33-38.
- [123] Schwartz J., Shklar G. "Regression of experimental hamster cancer by beta-carotene and algae extracts." J. Oral Maxillofac. Surg. V. 45, (1987), 510-515.
- [124] Wu, L-c. and Ho, J-a A., "Antioxydative and Hepatoprotective Effects of

Spirulina I" Gershwin & Belay (ed.), *Spirulina in Human Nutrition and Health*, (2007), 119-151.

- [125] Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M. et Mancini-Filho, J., "Antioxidant activity of the microalgae *Spirulina maxima*"; *Brazilian Journal of Medical and Biologiam Research*, V. 31, (1998), 1075-1079.
- [126] Ray, S., Roy, K. and Sengupta, C., "Evaluation in vitro du potentiel antiperoxydative d'extrait d'eau de *Spirulina platensis* (algues bleu-vert) sur induites par le cyclophosphamide peroxydation lipidique", *Indian Journal of pharmaceutical Sciences*, V. 69, n°2, (2007), 190-196
- [127] Ramirez D., Gonzalez R., Merino N., Rodriguez S. et Ancheta O., "Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. Mediators of Inflammation", n°11, (2002), 75-79.
- [128] Tsuchihashi, N., Watanabe, T. et Takai, Y., "Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats", *Bull. Chiba Hygiene College, Chiba. Japan*. V. 5, (1987), 27-30
- [129] Johnson, P. et Shubert, E., "Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green algae" *Nutrition Research*, V. 6, (1986), 85-94.
- [130] Sall, M.G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehuae et Kuakiwi, N., "Resultats d'un essai de rehabilitation nutritionnelle avec la spiruline à Dakar (a propos de 59 cas) ", *Medecine d'Afrique Noire*, V. 46, n°3, (1999), 143-146.
- [131] Ribadeneira, M. et Garcia, P., "Comparative analysis of the use of a 100 % vegetable iron and iron sulfate as iron source for the treatment of ferriprive anemia ", A publier; cité dans *Phytonutrition et Environnement*, J.M. Robin, (2000).

- [132] Zhang Cheng-Wu, "Effects of polysaccharide and phycocyanin from spirulina on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice Proc. of Second Asia Pacific Conf", on Algal Biotech. Univ. of Malaysia, (1994).
- [133] Mathew, B., Sankaranarayanan, R., "Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*", Nutr. Cancer, V. 24, n°2, (1995), 197-202.
- [134] Sankaranarayanan, R., Mathew, B., "Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment", Oral Oncol., V. 33, n°4, (Jul., 1997), 231-236.
- [135] Mahesh, S., Babu, M., Gopaldaswamy, G. and Chandramohan, N., "Identification of an antiviral principle in *Spirulina platensis* against Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNVP)", India Journal of Biotechnology, V, 4, (July, 2005), 384-388.
- [136] Karim, M.A. "Etude sur effet de la spiruline dans le traitement des maladies chroniques arsénicisme de la population du Bangladesh", Abstracts: 1ère Conférence internationale des Monographie de la dermatologie, Chaka, Bangladesh, Mai 8-10, Article, n°13, (1999).
- [137] Misbahuddin, M., Islam, A.Z., "Efficacy of *Spirulina* extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study", Clin. Toxicol. (Phila), V. 44, n°2, (2006), 135 - 41.
- [138] Jeyaprakash, Y. et Chinnaswamy, P. "Effect of *Spirulina* and Liv-52 on cadmium induced toxicity in albino rats", Indian J. Exp. Biol., V. 43, (2005), 773 – 781.
- [139] Yamane, Y., "L'effet de la spiruline sur la néphrotoxicité chez le rat", présenté à Symposium annuel de la Société pharmaceutique du Japon,

Avril 15, Pharmaceutiques Dept chiba Univ. Japon, ,(Avril, 1988).

- [140] Khan, M., Shobha, J.C., Mohan, I.K., Rao Naidu, M.U., Prayag, A. and Kutala, V.K., "Spirulina attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rat", J. Appl. Toxicol., V. 26, n°5 (2006), 444 - 451.
- [141] Mohan, I.k., Khan, M., Shobha, J.C., Naidu, M.U., Prayag, A., Kuppusamy, P., "Protection against cisplatin-induces nephrotoxicity by spirulina in rats. Cancer Chmothérapie and Pharmacology, V. 58, n°6, (2006), 802- 808.
- [142] Torres-Duran, P.V., Miranda-Zamora, R., Paredes-Carbajal, M.C., Mascher, D., Ble-Castillo, J., Diaz-Zagoya, J.C., "Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat", Journal of Ethnopharmacology, V. 64, n°2, (1999), 141-147.
- [143] Khan, M., Shobha, J.C., Mohan, I.K., Naidu, M.U, Sundaram, C., Singh, S., Kuppusamy, P. et Kutala, BK, "Effect of Spirulina against doxorubicin-reduced cardiotoxicity", Phytother. Rev., V. 19, n°12, (2005), 1030 – 1037.
- [144] Khan, M., Varadhara, S., Gansesa, L.P., Shobha, J.C. , Naidu, M.U., Parmandi, N.L., Tridadapani, S., Kutala, B.J. and Kuppusamy, P., "C phycocyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 and ERK signaling", Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. V. 290, n°5, (2005), H2136 – H2145.
- [145] Mark, F., "Potentiel de la spirulina Clinique en tant que source de phycocyanobiline", Journal of food medicament, V. 10, n°4, (2007), 566-570.
- [146] Wang, Y., Chang, C., Chou, J., Chen, H.L., Deng, X., Harvey, B.K., Caded, J.L. et Bickford, P.C., "Dietary supplementation with blueberries, spinach, or

Spirulina reduces ischemic brain damage”, *Exp. Neurol.*, V. 193, (2005), 75-84.

- [147] Uglitskikh, A.K., Tsokova, N.B., “Experience with a selenium-containing biological active supplement used in children with pneumonias in an intensive care unit”, Article en russe, résumé en anglais, *Anesteziol Reanimatol.*, n°1, (2006), 45-58.
- [148] Mascher, D., Paredes-Carvajal, M.C., Torres-Dura'n, P.V., Zamora-Gonza'lez, J., Di'az-zagoya, JC et Jua'rez-Oropeza, M.A, “Ethanollic extract of *Spirulina maxima* alters the vasomotor reactivity of aortic rings from obese rats”, *Arch. Med. Res.*, V. 37, n°1, (2005), 50-57.
- [149] Hsiao, G., Chou, P.H., Shen, M.Y., Chou, D.S., Lin, Ch. Et Cheu, J.R., “C-Phycocyanin, a very potent and novel platelet aggregation inhibitor from *Spirulina platensis*”, *J. Agric. Food Chem.* , V. 53, n°20, (2005), 7734-7740.
- [150] Haque, S.E., Gilani, K.M., “Effect of ambroxol, *Spirulina* and vitamin-E in naphthalene induced cataract in female rats”, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, V. 49, n°1, (2005), 57-64.
- [151] Mao, K., Van de Water, J. and Gershwin, M.E., “Effects of *Spirulina* based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients”, *J. Med. Food*, V. 8, n°1, (2005), 27-30.
- [152] Man, I., "Complementary and alternative medecine for allergie rhinitis", *Curr Opin Otolaryngol Neck Surg*, n°17, (2009), 226-231.
- [153] Cingi, C., Conk-Dalay, M., Cakli, H., Bal, C., “*Eur Arch Otorhinolaryngol*, V. 265, (2008), 1219-1223.

- [154] Chamorro, G., Pe'rez-Albiter, M., Serrano-Garci'a, N., Mares-Sa'mano, J.J et Rojas, P., "Spirulina maxima partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity", *Nutr. Neurosci.*, V. 9, n°5-6, (2006), 207-212.
- [155] Ho, M.W., "Green Algae for Carbon Capture & Biodiesel: Communiqué de presse de l'Institut ISIS en date du 25/05/2006. Consulté le 15/1/2010, Disponible sur le site internet : [www.i-sis.org.uk/GAFCCAB.php](http://www.i-sis.org.uk/GAFCCAB.php)
- [156] Voltarelli, F.A. et De Mello, M.A.R. "Spirulina enhanced the skeletal muscle protein in growing rats, *Eur. J. Nut.*, V. 47, (2008), 939-400.
- [157] Lu, H.K., Hsieh, C.C., Hsu, J.J., Yang, Y.K. et Chou, H.N., « Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress", *Eur. J. Appl. Physiol.*, V. 98, n°2, (Septembre, 2006), 220-226.
- [159] Kim, H.M., Lee, E.H., Cho, H.H. and Moon, Y.H., " Inhibitory effect of mast cellmediate immediate-type allergic reactions in rats by spirulina. *Biochem Pharmacol.*, V. 55, (1998), 1071-1076.
- [160] Pétrus, M., Assih, L., Horen, B., Lapebie, P., trigatti, A., Culerrier, R., Barre, A., Rouge, P. et Dutau, G., "Premier cas d'allergie à la spiruline chez un enfant de treize ans », *Revue française d'allergologie*, V. 50, (2010), 470-472.
- [161] Pétrus, M., Culerrier, R., Campistrone, M., Barre, A. and Rougés, P., "First case report of anaphylaxis to spirulina : identification of phycocyanin as responsible allergen". *Allergy*, (Nov. 4, 2009)
- [162] Jeeji Bai, N., "Competitive exclusion or morphological transformation? A

case study with *Spirulina fusiformis*", Arch. Hydrobiol. Suppl. 71, Algol. Stud., n° 38/ 39, (1985), 191 p.

- [163] Tissier, H., "Recherche sur la flore intestinale normale et pathogène du nourrisson, Thèse de médecine, Université de Paris, (1900).
- [164] Gournier-Château, N., Larpent, J., Castellanos, M., Larpent, J., "Les probiotiques en alimentation animale et humaine », Tec. & Doc. – Lavoisier, Paris, (1994), 106-113.
- [165] Winslow, C., Broadhurst, J., Buchanan, R., Krumwiede C., Rogers, L., Smith, G., "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., (1917), 2, 505-566
- [166] Holland, D.F., "Generic index of the commoner forms of bacteria", J.b Bacteriol., 5, (1920), 215 – 229.
- [167] Orla-Jensen, S., "La classification des bactéries lactiques", Lait, (1924), 4, 468-474.
- [168] Dehnart, "le genre *Bifidobacterium*", In Proposition pour un nouveau standard  
indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*, (1957).
- [169] Reuter, G., "Vergleichende Untersuchunge über die Bifidus-Flora im Säuglings und Erwachsenenstuhl. Zentralbl. Bakteriol. (orig. A), (1963), 191, 486-507.
- [170] De Vries, W., Stouthammer, A.H., "Pathway of glucose fermentation in

- relation to the taxonomy of Bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, (1967), 93, (2), 574-576.
- [171] Sgorbat, B., Lenaz, G., Casalicchio, F., "Purification and properties of two fructose-6-phosphate phosphoketolase in *Bifidobacterium*", *Journal of Microbiology Serology*, (1976), 42, 49-57.
- [172] Sebald, M., Gasser, F., Werner, H., "DAN base composition and Classification. Application to the group of Bifidobacteria and to related genera. *Annales de l'Institut Pasteur*, (1965) 109, 251- 269.
- [173] Rogosa, M., "Genus III, *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In : Buchanan R., Gibbons N., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins : Baltimore, (1974) 669-676.
- [174] Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V., "*Bifidobacteria*: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*, (2000), 50, 117-131.
- [175] Centre de recherche et de développement sur les aliments Adresse URL: <http://sci.agr.ca/crda/Français/microsc.htm>
- [176] <http://www.agrojob.com/dictionnaire/definition-bifidobacteries-2409.html>
- [177] Zani, G., Severi, A., "Cellular ultrastructure and morphology in *Bifidobacterium bifidum*", *Microbiologica*, (1982), 5, 225-267.
- [178] Scardovi, V., "Bifidobacterium. In "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*", 9<sup>th</sup> ed., Willams and Wilkins, Baltimore, (1986).
- [179] Glick, M.C., Sall, T., Zilliken, F., Mudd, S., "Morphological changes of *L. bifidus* var. penn. produced by a cell-wall precursor", *Biochemica Biophysica*

- Acta, (1960), 37, 363-365.
- [180] Husain, I., Poupard, J.A., Norris, R.F., "Influence of nutrition on morphology of strain of *Bifidobacterium bifidum*", Journal of Bacteriology, (1972), 3, 841-844.
- [181] Kojima M, Suda S, Hotta S, Hamada K (1968). Introduction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*", J. Bacteriol. 95: 710-711.
- [182] Kojima, M., Suda, S., Hotta, S., Hamada, K., "Induction of pleomorphology and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*", Journal of Bacteriology, (1970) 102, 217-220.
- [183] Prevot, A., Turpin, A., Kaiser, P., - Sous-genre : *Bifidobacterium*. In : Prevot A.R., Turpin A., Kaiser P., Les bactéries anaérobies", Editions Dunod : Paris, (1967), 1840-1878.
- [184] Delcenserie, V., China, B., Gavini, F., Beerens, H., Daube, G., "Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*", Ann. Méd. Vét., (2002), 146, 279-293.
- [185] Rasic, J.L., Kurmann, J.A., "Bifidobacteria and their role", Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag ed. Basel, Boston, Stuttgart, (1983).
- [186] Scardovi, V., Trovatelli, L., "The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*", Ann. Microbiol., 15, (1965), 19-29.
- [187] De Vries, W., Gerbandy, S.J., Stouthammer, A.H., "Carbohydrate

- metabolism in *Bifidobacterium bifidum*", *Biochimica Biophysica Acta*, (1967), 136, 415-425.
- [188] De Vries, W, Stouthammer, A.H., "Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by Bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, (1968), 96, 472-478.
- [189] De Vries, W., Stouthammer, A.H., "Factors determining the degree of anaerobiosis of Bifidobacterium strains. *Arch. Mikrobiol.*, (1969), 65, 275-287.
- [190] Crocinai, F., Matteuzzi, D., Ghazvinizadeh, H., "Species of the genus *Bifidobacterium* found in human vagina. *Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkd. Infektioskr*", Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A, (1973), 233, 298-302.
- [191] Biavati, B., Castagnoli, P., Cociani, F., Trovatelli, L. D., "Species of *Bifidobacterium* in the feces of infantis", *Microbiologica*, (1984), 7, 341-345.
- [192] Biavati, B., Castagnoli, P., Cociani, F., Trovatelli, L. D., "Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults", *Microbiologica*, (1986), 9, 39-45.
- [193] Poupard, J.A. Husain, I., Norris, R.F., "Biology of the Bifidobacteria", *Bacteriological Review*, (1973), 37, 136-165.
- [194] Ballongue, J., "Bifidobacteria and probiotic action", In *Lactis acid bacteria*, Eds. Salminen S. et Von Wright A., Dekker M., New York, (1993), 357-432.
- [195] Gavini, F., Pourcher, A. M., Nut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C. and Izard, D., "Phenotypic differentiation of Bifidobacteria of human and animal origin", *International Journal of Systematic Bacteriology*, (1991), 41: 548 –

557.

- [196] Gavini, F., Van Esbroeck, M., Touzel, J.P., Fourment, A. and Goossens, H., "Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt ", in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe*, (1996), 2: 191-193.
- [197] Beerens, H., "An elective and selective isolation", (1990)
- [198] Bonapate, C., Klein, G., Kneifel, W. et Reuter, G., "Evolution, biodiversité, taxonomie, développement d'un milieu sélectif pour le dénombrement des bifidobactéries dans les laits fermentés", *Lait*, (2001), 81: 227 – 235.
- [199] De Roissart, H. et Luquet, F.M, "Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques", 1, Uriage, Lorica, (1994), 605 p.
- [201] Tamime, A. Y., Marshall, U. M. E. ET Robinson, R. H., "Microbiological and technological aspects of milks fermented by *Bifidobacteria*", *J. of dairy research*, (1995), 68: 151- 187.
- [202] Deguchi, Y. Morishita, T., Mutai, M., "Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of *Bifidobacteria*", *Agric. Biol. Chem.*, (1985), 49, 13-19.
- [203] Op Den Camp, H.J.M., Peeter, P.A.M., Oosterhof, A., Veekamp, J.H., "Immunochemical studies on the lipoteichoic acids of *Bifidobacterium Bifidum* subsp. *pennsylvanicum*", *Journal of General Microbiology*, (1985), 131, 616-668.
- [204] Rasick, K., "Bifidobacterium and their role", *Experientia*, (1983), 539.

- [205] Laveau, J.V., Bouix, M., "microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel ", Paris, Lavoisier, Tec & Doc., (1993), 577 p.
- [206] Fisher, W., "Lipoteichoic acid of *Bifidobacterium bifidum* subspecies pennsylvanicus DSM 20239", *European Journal of Biochemistry*, (1987), 165, 639-646.
- [207] Iwasaki, H., Araki, Y., Ito, E., Nagaoka, M. et Yokokura, T., "Structure of Macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. /", *Bacteriology*, (1990), 172, 845-852.
- [208] Fischer, W., "Physiology of lipoteichoic acids in bacteria", *Adv. Microbiol. Physiol.*, (1988), 29, 233-302.
- [209] Lambert, P.A., Hancock, I.C. et Baddiley, J., "Occurrence and function of membrane teichoic acids", *Biochem. Biophys. Acta.*, (1977), 472, 1-12.
- [210] Veerkamp, J., "Effects of growth conditions on the lipid composition of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *Pennsylvanicum*", *J. Microbiol. Serol.*, (1977), 43, 101-110.
- [211] Rada, V., Dlebal, J., "Susceptibility of *Bifidobacteria* to nisin", *Lett. Appl. Microbiol.*, (1998), 26, 123-125.
- [212] Lim, K., Huh, C., Back, Y., "Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria*", *J. Dairy Sci.*, (1993), 76, 2168-2174.
- [213] Charteris, W., Delly, P., Morelli, L., Collins, J., "Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract", *Lett. Appl. Microbiol.*, (1998), 26, 333-337.
- [214] Faure, J.C., Schellenberg, D., Bexter, A., Wurzner, H.P., "Barrier effect of

*Bifidobacterium longum* on *Escherichia coli* in the germ-free rat",  
International Journal of Vitamin Nutrition Research, (1982), 52, 225-230.

- [215] Kageyama, T., Tanoda, T., Nagano, Y., "The effect of *Bifidobacterium* administration in patients with leukemia", *Bifidobacteria Microflora*, (1984), 3, 29-33.
- [216] Yamazaki, S., Machii, K., Tsuyuchi, S., Momose, H., Kawashima, T., Ueda, K., "Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion", *munology*, (1985), 56, 43-50.
- [217] Romond, A.F., "Apport d'un lait fermenté à *Bf. longum* dans le traitement des diarrhées à rotavirus du nourrisson", Doctorat en médecine, Lille, (1988)
- [218] Bullen, C.L., Tearle, P.V., Stexart, M.G., "The effect of humanized milks and supplemented breast feeding on the faecal flora of infants", *Journal of Medical Microbiology*, (1977), 10, 403-413.
- [219] Mayer, J.B., "Interrelationships between diet, intestinal flora and viruses", *Phys. Med. Rehabil.*, 10, (1969), 16-23.
- [220] Mizutani, T., Mitsuoka, T., "Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/HE male mice", *Journal of National Cancer Institute*, 63, (1979), 1365-1370.
- [221] Kozlova, E.P., "Intestinal microbial flora in premature infants with septicemia and its correction with *Bifidobacterium*", *Voprosy Okhr. Materin. Det.*, 21, (1976), 50-53.
- [222] Ebissawa, E., Assari, T., Takda, S., Wfatanabe, A., Nihei, K., Tamashita, T.,

- Wakiguchi, H., Watanabe, S., "Utilisation de lait fermenté additionné de Bifidus actif chez la femme enceinte", Premier Colloque *Bifidobacterium longum* et santé, Monte Carlo, Médecine et Chirurgie Digestive, 16, (1987), 9-11.
- [223] Hotta, M., Sato, Y., Iwata, S., Yhamashita, N., Sunakawa, K., Oiokawa, T., Watanabe, K., Takayawa, H., Yajima, M., Sekiguchi, S., Arai, S., Sakurai, T., Mutai, M., "Clinical effects of Bifidobacterium preparations on pediatric intractable diarrhea", (1987), Keio Journal Med., 298-314.
- [224] Crociani, F., Matteuzzi, D., " Urease activity in the genus *Bifidobacterium*", Ann. Microbiol., (1982), 133, 417- 423.
- [225] Beerens, H., Gavini, F., and Neut, C., "Effect of exposure to air on 84 strains of *Bifidobacteria*", (2000), Anaerobe, 6, 65- 67.
- [226] Desjardin, M.L., Roy, D. et Goulet, J., "Growth of *bifidobacteria* and their enzyme profiles", (1990), J. Dairy Sci., 73, 1-9.
- [227] Veerkamp, J., "Catabolism of glucose and derivatives of 2 deoxy-2-amino-glucose in *Bifidobacterium bifidum subsp. Pennsylvanicum*", (1978), Arch. Biochem. Biophys., 129, 257-263 –
- [228] Bezkorovainy, A. et Miller-Catchpole, R., "Biochemistry and physiology of Bifidobacteria", Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc, (1989)
- [229] Hartemink, R., Rombouts, F., "Comparison of media for the detection of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* and total anaerobes from faecal samples", (1999), J. Microbiol. Methods, 36, 181-192.
- [230] Romond, M.B. et Romond, C., " Bifidobactéries et facteurs bifidigènes.

Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques, Lorica, (1994), 439 - 452.

- [231] Bourlioux, P., "Écologie microbienne du tractus digestif humain, Bactéries lactiques, Aspects fondamentaux et technologies, Lorica, (1994), 369 - 381.
- [232] Petschow, B.W., Talbott, R.D., "Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk", Journal of Clinical Microbiology, (1991), 28, 287-292.
- [233] Shah, P.N., "Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods", J. Dairy. Sci., (2000), 83: 894-907
- [234] Pochart, P., Marteau, P., Bisetti, N., Goderel, I., Bourliouse, P. et Romond, J.C., " Isolement des bifidobactéries dans les selles après ingestions prolongée de lait au bifidus (LB) ", Med. Mal. Infect., (1990), 20 : 75-78.
- [235] Hudault, S., "Relation entre facteurs bifidigènes du lait humain et l'établissement d'une souche de *Bifidobacterium bifidum* dans la flore intestinale du bébé humain", Conférence à l'ADITEC, (Jan, 1991)
- [236] Martin JH, Cabbage, K.M.R. "Selection of bifidobacteria for uses ace: Dietary adjuncts in cultured dairy foods: I Tolerance to pH of yoghurt Cultured", (1992), Dairy Products J. 27(4): 21-26.
- [237] Matsuki, T., Waqtonalse, K., Tonaka, R., Fukuda, M. et Oyaiza, H., "Distribution of bifidobacteria species in human intestinal microflora examined with 16S RNA-Gene-Targeted-Specific primers", Appl. Environ. Microbiol., (1999), 65 (10): 4506-4512.
- [238] Martin, J.H., Cabbage, K.M.R., "Selection of bifidobacteria for use sace:

Dietary adjuncts in cultured dairy foods: I Tolerance to pH of yoghurt Cultured", Dairy Products, (1992). J. 27(4): 21-26.

[239] Clarck, P.A., Cotton, L.N. et Martin, J.H., "selection of Bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods II-tolerance to stimulated pH of human stomach", Cultured dairy product journal, (1993), 28, (4): 11-14.

[241] Marteau P., Pochart P., Bouhnik Y., Rambaud J.C. The fate and effects of transiting, non pathogenic microorganisms in the human intestine", World Rev. Nutr. Diet., (1993), 74:1-21.

[242] Hoskins, L.C., Agustines, M., Mc Kee W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M., Niedermeyer, G., "Mucin degradation in human colon ecosystems", Journal of Clinical Investigation, (1985), 75, 944-953.

[243] Miller, R.S., Hoskins, L.C., "Mucin degradation in human colon systems", Gastroenterology, (1981), 81, 759-765.

[244] Salyers, A.A., Leedle, J.A.Z., "Carbohydrate utilization in the human colon", In Human Intestinal Microflora in Health and Disease, Ed. D.J. Hentges, Academic Press, London, (1983), 129-146.

[245] Clarck, P.A. et Martin, J.H., "Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods : III- tolerance to stimulated Bile concentration of human small intestine", Culture dairy product journal, (1994), 29, (3): 18-21.

[246] Bezkorovainy, A., "Probiotics: determinants of survival and growth in the gut", Am. J. Clin., Nutr., (2001), 73 : 3998 - 4058.

[247] Tejada-Simon M.V., Ustunol Z., Pestka J.J., "Ex vivo effects of lactobacilli,

Streptococci and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model", J. Food Prot. (1999), 62:162-9.

[248] Heyman, M., "Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases", Journal of the American college of nutrition, (2000), 19, (2), S137-S146.

[249] Modler, H., "Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications", Int. Dairy J., (1997), 4, 383- 407.

[250] Matteuzzi, D., Crociani, F., Emaldi, O., "Amino Acids produced by Bifidobacteria and some Clostridia", Ann. Microbiol., (1978), 129 B, 175-181.

[251] Bezkorovainy, A. et Topouzain, N., "B. bifidus var. penn growth promoting activity of human milk casein and its derivatives", Int. J. Biochem., (1981), 13, 585-590.

[252] Bezkorovainy, A. et Topouzain, N., "Aspects of iron metabolism in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*", International Journal of Biochemistry, (1983), 15, 316-366.

[253] Ueda, K., Nakamoto, S., Naakai, R., Takagi, A., "Establishment of a defined minimal medium and isolation of auxotrophic mutants for *Bifidobacterium bifidum* es5", *Journal of General Microbiology*, (1983), 29, 103-114.

[254] Bezkorovainy, A., Topouzain, N., et Miller- Catchpole, R., "Mechanisms of ferric and ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*", Clin. Physiol. Biochem., (1986), 4, 150-158.

[255] Bezkorovainy, A., "Iron uptake by the microaerophilic anaerobe *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*", *Clin. Physiol. Biochem.*, (1984), 2(6), 291.

- [256] Bezkorovainy, A. et Topouzain, N., "The effect of metabolic inhibitors on the metabolism of *B. bifidum* var. penn", IRCS. Med. Science, (1982), 10, 239.
- [257] Bezkorovainy, A. et Solberg, L., "Ferrous iron uptake by *Bifidobacterium breve*", Biol. Trace El. Res., (1989), 20, 251-267.
- [258] Finkelstein, R.A., Sciortino, C. et Mac Intosch, M.A., "Role of iron in microbe-host interactions", Rev. Infect. Dis., (1983), 5 (64), 5759-5777.
- [259] Hassinen, J.B., Durbin, G.T., Tomarelli, R.M., Bernhart, F.W., "The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*", Journal of Bacteriology, (1951), 62, 771-777.
- [260] Klaver, F.A.M., Kingma, F. et Weerkamp, A.H., "Growth and survival of *Bifidobacteria* in milk", Netherland milk dairy J., (1993), 47: 151-115.
- [263] Poch, M., Bezkorovainy, A. "Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*", Journal of Dairy Science, (1991), 71, 3214-3221
- [264] Romond, A.F., Beerens, H., Neut, C., Montreuil, J., "Contribution à l'étude de la maternisation des laits", Annales de Microbiologie de l'Institut Pasteur, (1980), 131, 309-314.
- [265] Misra A.K. and Kuila , R.K., "Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity", Lait, (1992), 72: 213 – 220.
- [266] Etoth, E., Asumura, K., Obu, A., Sonomoto, K. et Ishizoki, A., "Purification and identification of a growth-stimulating peptide for *B. bifidum* from natural rubber serum powder", Biosci. Biotechnol. Biochem., (2000), 64, (10): 2083-

2088.

- [267] Beerens, H., Romond, C. and Neut, C., "Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine", *American Journal of Clinical Nutrition*, (1980), 33: 2434 – 2439.
- [268] Tamura, S., "Nutriologie of Bifidobacteria", *Bifidobacteria microflora*, (1983), 3-16.
- [269] Proulx, M., Gauthier, S.F. et Roy, D., "Utilisation of hydrolysats enzymatique de caséines pour la croissance des bifidobactéries", *Lait*, (1992), 72 : 393-404.
- [271] Modler, H.W., Mc Kellar, R.C. and Yagachi, M., "Bifidobacteria and bifidogenic factors", *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, (1990), 23: 29 – 41.
- [272] Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J., Mierau, I., "Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum* biochemical and genetic characterization", *Appl. Environ. Microbiol.*, (2000), 66(6): 2502-12.
- [273] Dorshow, S.T. and Lewitt, M.D., "Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetner", *American Journal of Clinical Nutrition*, (1987), 46: 61 – 65.
- [274] Yazawa, K., Imai, K., tamura, Z., "Oligosaccharides and polysaccharides specially by *Bifidobacteria*", *Chemical. And Pharmacology Bulletin*, Tokyo, 26, (1978), 3306-3311.
- [275] Dubeyu, K. and Mistry, V.V., "Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of Bifidobacteria in infant formulas", *Journal of Dairy Science*,

(1996), 79: 1156 – 1163.

- [276] Bouhnik, Y., Flourie, B., Pochart, P., Marteau, P., Abesour, L., Morin, M. C. and Rambaud, J. C., “Oligo-saccharides de synthèse. Aspects nutritionnels, fructo-oligosaccharides et transgalactoside-oligosaccharides”, Cahiers de Nutrition et de Diététique, (1991), 26, 6: 418- 422.
- [277] Champagne, C. P., Gardner, N. J. and Roy, D., “Challenges in the addition of probiotic cultures to Foods”, Critical Reviews in Food science and Nutrition, (2005), 45: 61 – 84.
- [278] Romond, M.B., “Bifidobacterium et facteurs bifidogènes: etude de modèle animaux permettant l’analyse de leurs interactions », Thèse de l’université de Lille, (1987)
- [279] Nagawa, M., Nakabayash, A. et Pujino, S., « Preparation of the Bifidus milk powder », J. Dairy Sci., 71, (1987), 1777-1782.
- [281] Rolfe, R.D., “The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal”, health. J. Nutr., (2000), 130: S396-S402.
- [282] Blanc, J.P., “Intérêt des bactéries probiotiques”, Disponible sur:  
[www.cabinet-de-nutrition-et-dietetique.eu](http://www.cabinet-de-nutrition-et-dietetique.eu)
- [283] De Roos, R.D. et KATAN, M.B., « Effect of probiotic bacteria on diarrhea lipid metabolism and carcinogenesis”, Am. J. Clin. Nutr., (2000), 71: 405-414.
- [284] Mack, D.R., Michail, S., Wei, S. Mc Dougall, L., Hollingsworth, M.A., “Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression”, Am. J. Physiol., (1999), 276: G941- 50.

- [285] Doumandji, A., "Effets de l'association de *Bifidobacterium* avec *Streptococcus thermophilus* vis-à-vis de l'antagoniste envers *E. coli* entéropathogène", Mémoire de Magister en science Agronomique, Institut national agronomique, El Harrach, Alger, (2000), 92p.
- [286] Lievin, V., Pieffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R. et Servin, A.I., "Bifidobacterium strains from resident infant human gastro intestinale micro flora exert antimicrobial activity", *Gut*, (2000), 47, (5): 646-652.
- [287] Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe & J.G. Holt, ed., Williams & Wilkins, Baltimore, London, (1986)
- [288] Gilliland, S.E., "Role of starter culture bacteria in food preservation", In bacterial starter cultures for food. Gilliland S.E.B. (ed.) CRC Press Inc., Boca, (1989)
- [289] Anand, S.K., "Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum* II", *Cultured dairy products journal*, (1985), 20-23.
- [292] Mitsuoka, T., "Taxonomy and ecology of Bifidobacteria", *Bifidobacteria microflora*, J., I, (1984), 11-28.
- [293] Homma, N., "*Bifidobacteria* as aresistente factor n human beings", *Bifidobacteria microflora*, (1988), 35-43
- [294] Bottazzi, V., "Activité probiotique à thérapeutique des bifidobactéries", *Revue ARBAA*, 2, (1989), 9-31.
- [295] Laroia, S. et Marin, J.H., "*Bifidobacteria* as possible dietary adjuncts in

cultured dairy products”, cultured dairy products journal, (1990), 25, (4): 18-22.

- [296] Tianon, J., Azlin, M. et Dennis, A.S., "Improvement of lactose digestion in human by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*", J. Dairy Sci., 79, (1996), 750-757.
- [297] Duffy, L.C., Lielezny, M.A., Riepuhoff-talty, M., Dayja, D., Sayahatger-Atlaie, S., Griffiths, E., Ruffin, D., Barrett, H. et Ogra, P.L., "Reduction of virus shedding by B.bifidum in experimentally induced MRV infection: statistical application for ELISA", Digestive diseases and sciences, (1994), 63, (4): 627- 631.
- [298] Chouraqui, J., "Flore intestinale et troubles digestifs chez le nourrisson", (2002), disponible sur l'adresse :  
[http://www.lesjta.com/article.php?ar\\_id=438](http://www.lesjta.com/article.php?ar_id=438)
- [299] Mackie, R., Sghir, A., Gaskins, H.R., "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract", Am. J. Clin. Nutri., (1999), 69:1035S-45S.
- [300] Drasar, B.S., "Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora", Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., (1974), 3:187-96.
- [301] Porter, E.M., Bevins, C.L., Ghosh, D., Ganz, T., "The multifaceted Paneth cell. Cell Mol. Life Sci., (2002), 59:156-70.
- [302] Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M.B. and Rowland, I., "Functional food science and gastrointestinal physiology and function", Br. J. Nutr., 80 Suppl., (1998)1:S147-71.

- [303] Gorbach, S.I, Plaut, A.G, Nahas, L., Weinstein, L., Spanknebel, G., Levitan, R., "Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora", *Gastroenterology*, (1967), 53: 856-67.
- [304] Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis In't Veld, J.H., "Overview of gut flora and probiotics", *Int. J. Food Microbiol.*, (1998), 41:85-101.
- [305] Finegold, S., Suttler, V. and Mathison, G., "Normal indigenous intestinal microflora", In: Hentdges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease*, Academic Press, New-York, (1983)
- [306] Marteau, P., Pochart, P., Dore, J., Bera-Maillet, C., Bernalier, A., Corthier, G., "Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota", *Appl. Environ. Microbiol.*, (2001), 67: 4939- 42.
- [307] Roberfroid, M.B., "Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties", *Br. J. Nutr.*, (1998), 80, S197-202.
- [308] FAO/WHO (2001) "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria", Argentina, (October 2001). Disponible sur: <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>
- [309] Descheemaeker, K., "Les probiotiques", *Nutri & phytothérapie*, Edit. Louvain Garant Belgique, (2000)
- [310] Cherbut, C., Beaufrère, M. B., Ghisolfi, M. J., Turck, M. D., Vidailhet, M. M., "Alimentation infantile et modification de la flore intestinale", *Rapport du groupe de travail, AFSSA*, (2003).

- [311] Rambaud, J.C., Bouhnik, Y., Marteau, P., Pochart, P., "Manipulation of the human gut microflora", *Proc. Nutr. Soc.*, (1993), 52:357-66.
- [312] Ait Belgnaoui, A., "Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique", Thèse de doctorat, Unité de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition, INRA Toulouse, France, (2006), 10-15.
- [313] Karimi, O. and Pena, A.S., "Probiotics: Isolated bacteria strain or mixtures of different strains? Two different approaches in the use of probiotics as therapeutics", *Drugs Today*, (2003), 39:565-97.
- [314] Spanhaak, S., Havenaar, R., Schaafsma, G., "The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans", *Eur. J. Clin. Nutr.*, (1998), 52: 899-907.
- [315] Johansson, M.I., Nobaek, S., Berggren, A., Nyman, M., Bjorck, I., Ahrne, S., Jeppsson, B., Molin, G., "Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Int. J. Food Microbiol.*, (1998), 42: 29-38.
- [315] Bengmark, S., "Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora", *Gut.*, (1998), 42:2-7.
- [316] Johansson, M.L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., Bengmark S., "Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora", *Appl. Environ. Microbiol.*, (1993), 59:15-20.
- [317] Bernet-Camarad, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L.,

- Hudault, S., "The human *Lactobacillus acidophilus* strain La-1 secretes a non bacteriocin antibacterial substances active *in vivo* and *in vitro*", Appl. Environ. Microbiol., 63, (1997), 2747-2753.
- [318] Coconnier, M.H., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., Servin, A.L., "Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB", Antimicrob. Agents Chemother; (1997), 41:1046-52.
- [319] Suzuki, T., Itoh, K., Kaneko, T., Suzuki, H., "Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*", J. Vet. Med. Sci., (1997), 59: 665-9.
- [320] Shu, Q. and Gill, H.S., "A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> infection in mice", Med. Microbiol. Immunol. (Berl.), (2001), 189: 147-52.
- [321] Mangell, P., Nejdfor, P., Wang, M., Ahrne, S., Westrom, B., Thorlacius, H., Jeppsson, B., "Lactobacillus plantarum 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability", *Dig Dis Sci.*, (2002), 47:511-6.
- [322] Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G. and Stolte, M., "Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis", *Aliment Pharmacol. Ther.* 11, (1997), 853-8.
- [323] Bry, L., Falk, P.G., Midtvedt, T., Gordon, J.I., "A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem", *Science*, 273, (1996), 1380-3.
- [234] Freitas, M., Tavan, E., Thoreaux, K., Cayuela, C., Sapin, C., G. T.,

“*Lactobacillus casei* DN-114 00 and bacteroides thetaiotamicron VPI-5482 inhibit rotavirus infection by modulating apical glycosylation pattern of cultured human HT29-MTX cells”, *Gastroenterology*, 124 (Suppl 1), (2003), A475- A476.

- [325] Ruseler-Van Embden, J.G., Van, Lieshout, L.M., Gosselink, M.J., Marteau, P., “Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins”, *Scand. J. Gastroenterol.*, 30, (1995) 675-80.
- [326] Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., Rambaud, J.C., “The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine”, *World Rev. Nutr. Diet.*, 74, (1993), 1-21.
- [327] Fabia, R., Ar'rajab, A., Johansson, M.L., Willen, R., Andersson, R., Molin, G., Bengmark, S., “The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat”, *Scand. J. Gastroenterol.*, 28, (1993), 155-62.
- [328] Madsen, K.L., “Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse”, *Clin. Invest. Med.*, 24, (2001), 250-7.
- [329] Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., Malagelada, J.R., “Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat”, *Gut.*, 48, (2001), 503-7.
- [330] Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., Rantala, I., Virtanen, E. Arvilommi, H., “*Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats”, *Gastroenterology*, 105, (1993), 1643-50.

- [331] Ait Belgnaoui, A., "Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique", Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique, Toulouse, (Décembre 2006), 203 P.
- [332] Berg Miller, M.E., Antonopoulos, D.A., Rincon, M.T., Band, M., Bari, A., Akraiko, T., "Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-", *PLoS ONE* 4, (2009), e6650.
- [333] Marin, M.I., Tejada-Simon, M.V., Lee J.H., Murtha, J., Ustunol, Z., Pestka, J., "Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus bulgaricus*", *J. Food Prot.*, 61, (1998), 859-64.
- [334] Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., Varkila, K., "Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria", *Infect. Immun.*, 64, (1996), 5403-5.
- [335] Arunachalam, K., Gill, H.S. and Chandra, R.K., "Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019)", *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54, (2000), 263-7
- [336] Perdigon, G., De Macias, M.E., Alvarez, S., Oliver, G., De Ruiz, Holgado, A.P., "Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*", *Immunology*, 63, (1988), 17-23.
- [337] Spik, (1982): In Arsan, A., Vermeil, G., Dartois, A.M., Du, M., "Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans ", 4<sup>ième</sup> édition, (2003).

- [338] Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K.Y., Mignot, O., Aeschlimann, J.M., "Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake", *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 10, (1994), 55-63.
- [339] Reiter, B., "Role of nonantibody proteins in milk in the protection of the newborn", In: Williams, A.F. and Baum, J.D., Ed. *Human banking*, New York, Raven Press, (1984), 29-53.
- [340] De Roissart, H. et Luquet, F.M., "Bactéries lactiques : Aspect fondamental et technologie", Tome II, Grenoble, France, (1994), 164 P.
- [341] Jian, B., M. de la Llera-Moya, et al., "Modification of the cholesterol efflux properties of human serum by enrichment with phospholipid." *J Lipid Res* 38(4), (1997), 734-44.
- [342] Balansky, R., Gyosheva, B., Ganchev, G., Mircheva, Z., Minkova, Z. and Georgiev, G., "Inhibitory effect of freeze-dried milk fermented by selected *Lactobacillus bulgaricus* strains on carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats and by diethylnitrosamine in hamsters", *Cancer Letters*, 147, (1999), 125-137.
- [343] Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E., "Antitumor activity of yoghurt components", *J. Food Protact.*, (1983), 8-11.
- [344] Kohwi, T., Imai, K., Tamura, A. and Hashimoto, Y., "Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice", *Gann.*, 69, (1978), 613-618.
- [345] Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M. and Yokokura, T., "Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3 methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice", *Med. Microbiol.*

Immunol., 188, (1999), 111-116.

[346] Luquet, F.M. et Corrieu, G., "Bactéries lactiques et probiotiques", Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, (2005), 77P.

[347] Perdigon, G., De Moreno de LeBlanc, A., Valdez, J. and Rachid, M., "Role of yoghurt in the prevention of colon cancer", Eur. J. Clin. Nutr., 56, (2002), S65-S68.

[348] Masse- Raimbault, A.M., " Lejeune enfant : son alimentation", L'enfant en milieu tropical, (1982), 138-140.

[349] Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics", J. Nutr. 125, (1995), 1401-1412

[350] Cherbut C., Beaufrère M. B., Ghisolfi M. J., Turck M. D., Vidailhet, M. M., "Alimentation infantile et modification de la flore intestinale", Agence Française de Sécurité Alimentaire, (Juin 2003), P.40.

[351] Schulze, J., Zunft, H.J., "Lactose--a potential dietary fiber. The regulation of its microecologic effect in the intestinal tract. 3. Dietary fiber actions of lactose due to microbial activity", Nahrung 35, (1991), 903-20.

[352] Kien, C.L., "Digestion, absorption, and fermentation of carbohydrates in the Newborn", Clin. Perinatol., (1996), 23 : 211-28.

[353] Larpent , J.P., « Microbiologie alimentaire. Technique de laboratoire », Edition Lavoisier, Paris, (1997).

- [354] Zourari, A. et Desmazeaud, M. J., «Caractérisation des bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp bulgaricus et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius* thermophilus », Lait, 71, (1991), 463-482.
- [355] Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., Pinto, L.A.A., Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*”, Braz. J. Chem. Eng. V. 26, n°1 São Paulo, (2009).
- [356] Diallo, S., Camara, Y.B., “Diarrhée aigue du nourrisson et état nutritionnel à l’INSE”, Médecine d’Afrique Noir, (1998), 45 (6).
- [357] Stark, P.L., Lee, A., “The microbial ecology of the large bowel of breast fed and formula fed infants during the first year of life”, J Med Microbiol 15, (1982), 189-203.
- [358] Yoshioka, H., Iseki, K.I., Fujita, K., “Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics”, 72, (1983), 317-321.
- [359] Balmer, S.E., Wharton, B.A., “Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula”, Arch. Dis. Child. 64, (1989), 1678-1684.
- [360] Hall, M.A., Cole, C.B., Smith, S.L., Fuller, R., Rolles, C.J., “Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in infancy”, Arch. Dis. Child. 65, (1990), 185-188.
- [361] Kleesen, B., Bunke, H., Tovar, K., Noack, J., Sawatzki, G., “Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora of newborn infants”, Acta. Pediatr., 84, (1995), 1347-1356.

- [362] Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R., "Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract", *Am. J. Clin. Nutr.* 69, (1999), 1035S-1045S.
- [363] Harmsen, H.J.M., Vibleboer-Veloo, A.C.M., Rangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G., Wellings, G.W., "Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants using molecular identification and detection methods", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 30, (2000), 61-67.
- [364] Rinne, *et al.*, (2005) cité en Riazi, A., Ziar, H., «Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille», Laboratoire LMBAFS, Département de Biotechnologie, Mostaganem, Algérie, (2010).
- [365] Coppa *et al.*, ( 2004) cité en Riazi, A., Ziar, H., «Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille», Laboratoire LMBAFS, Département de Biotechnologie, Mostaganem, Algérie, (2010).
- [366] Mitra *et al.*, (1995) cité en Riazi, A., Ziar, H., «Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille», Laboratoire LMBAFS, Département de Biotechnologie, Mostaganem, Algérie, (2010).
- [367] Moubareck, (2005) cité en Riazi, A., Ziar, H., «Croissance et viabilité des bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille», Laboratoire LMBAFS, Département de Biotechnologie, Mostaganem, Algérie, (2010).
- [368] Thompson, J., Gentry Weeks, C.R., « Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques », *Bactéries lactiques*, T1, (1994), 239-253.
- [369] Loucif, F., "Effets antagonistes *in vitro* et *in vivo* des bifidobactérie envers

*Compylobacter* et *Escherichia coli* responsables des diarrhées chez les nourrissons ", Mémoire de Magister en science Agronomique, ENASA, (1998), 149p.

- [370] Espirad, E., "Introduction la transformation industrielle des fruits", Edition Technique et Documentation, Paris, (2002), 360p.
- [371] Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., L.A.A., "Pinto, Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*", Braz. J. Chem. Eng. V. 26, n°26, n°1 Sao Paulo, (2009).
- [372] Oliveira, E.G., Rosa, G.S., Moraes, M.A., Pinto, L.A.A., Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*", Braz. J. Chem. Eng. V. 26, n°1 São Paulo, (2009).
- [373] Habou, O., "Evaluation de l'efficacité de la supplémentation en spiruline du régime habituel des enfants atteints de malnutrition sévère (A propos de 56 cas)", Thèse de Doctorat en Médecine, faculté des sciences de la santé, Niger, (2003), p. 71.
- [374] Challem, J.J. et Passwater, R.A., Mindell, E.M., "Spirulila". Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut, (1981).
- [375] Dillon, J.C. et Phan, P.A., "Spirulina as a source of proteins in human nutrition Bull.Inst. Océano, Manaco, n°spécial, V. 12, (1993), 103 -107.
- [376] Proteus, Inc., "Clinical Experimentation with Spirulina National Institut of Nutrition Mexico City, (1975). (transl. by Proteus, Inc. 1975)
- [377] Razafindra, J.M., Rakotozandriny, J.D.N., Rakotozandriny, R., Randria, J.N. et Ramam piherika K.D., « Etude la valeur nutritionnelle de la spiruline de

Madagascar (*Spirulina platensis* Var. Toliara) », (19--), 161-188.

- [378] Jarisoa, T., "Adaptation de la spiruline du sud de Madagascar à la culture en eau de mer. Mise au point de structures de production à l'échelle villageoise", Thèse de Doctorat en sciences en océanologie appliquée, université de Toliara, (Mars 2005), P. 188.
- [380] Jourdan, J.P., "Cultivez votre Spiruline, Manuel de culture artisanale pour la production de la spiruline", *Publication Antenna Technologie*, (2006), P143.
- [381] Gavini, F., Pourcher, A.M., Bahaka, D., Freney, J., Romond, C., Izadd, D., "Le genre *Bifidobacterium*: Classification, identification, aspect critique", *Med. Mal. Infect.*, 23 séries, (1990), 53-62.
- [382] Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., "Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness", *Food Research Internazional*, 35 (2002), 125-131.
- [383] Samona, A., Robinson, R.K. et Marakis, S., "Acid production by Bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk", *Food Microbiology*, 13, (1996), 275-280.
- [384] Riazi, A., Ziar H., "Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille, *Nature et Technologie*, n° 02, (Janvier, 2010), 17 - 24.
- [385] Ustunol, Z. et Gandhi, H., "Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in honey-sweetened skim milk", *Journal of Food Protection*, (2001), 64(11): 1775-1779.
- [386] Chick, H., Shin, H.S. et Ustunol, Z., "Growth and acid production by lactic

acid bacteria and bifidobacteria in skim milk containing honey”, *Journal of Food Science*, 66 (2001), 478-481.

[387] Dettwyler, K.A., “Infant feeding in Mali, West Africa: Variation in belief and practice”, *Soc. Sci. Med.*, 23, (1987), 651-64.

[388] The World Bank, “Repositioning Nutrition as Central to Development: A strategy for large scale action”, World Bank, Washington, (2006).

[389] Kodio, J., Iknane, A., Ag Ayoya, M., Sodjinou, R., “Contribution à la prévention de la malnutrition infant-Juvenile: cas du cercle de Bandiaga”, (2010).