

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Blida-1-**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie des Populations et des Organismes**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Option : Phytothérapie et Santé**

**Thème :**

**Evaluation des activités thérapeutiques de la spiruline *Spirulina platensis* et  
la conception d'un complément alimentaire à base de poudre de spiruline**

**Présenté par : SAYAH Yasmine  
20 /09/2015**

**Soutenu le :**

**Devant les membre de jury :**

**Mme Chérif H.  
Examinatrice**

**MCB/BPO.....UBD1**

**Mr BOUKHATEM.N**

**MCB/BPO .....UBD1**

**Président**

**Mme SAIDI F.**

**Pr/BPC.....UBD1**

**Promotrice**

# Remerciement

***Je rends grâce à Allah le Créateur, le Tout Puissant, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.***

*Merci de m'avoir donnée la vie, la santé, le courage, la force et l'opportunité de présenter ce travail.*

***Je tiens à remercier :***

***A notre Maître et président du jury, Professeur Boukhatem N.(MCB/BPO.UBD1)***

*Vous nous faites honneur en acceptant de présider ce jury*

*Veillez accepter Cher Maître, l'assurance de notre  
profonde gratitude.*

***A notre Maître et juge, Professeur Cherif. (MCB/BPO.UBD1)***

*C'est un plaisir pour nous que vous ayez accepté de participer à l'amélioration de la qualité de ce travail .Veillez agréer Cher Maître, l'expression de nos sentiments les plus respectueux.*

***A notre Maître et promotrice de thèse, Professeur Saidi. F (MCA/BPO.UBD1):***

*La qualité exceptionnelle de votre enseignement nous a beaucoup marqué. Vous avez su nous montrer l'exemple par votre modestie, votre rigueur dans le travail et votre souci du travail bien fait. Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail. Nous vous prions d'agréer Cher Maître, l'expression de notre sincère reconnaissance.*

*Je tien à adresser également mes remerciements au groupe du centre de recherche et de developpement SAIDAL d'Elharach,et surtout Mme mekaoui N et Mme Azine pour leur aide lors de la préparation de ce mémoire et leur appuis lors de l'apprêt de mémoire.*

*Mes sincères remerciements à **Mme Rebzani** , je ne saurais jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa sympathie.*

*Je tiens à remercier **Mr Tefahhi Djamel**,  
Responsable du laboratoire d'hygiène, de m'avoir accueilli dans son laboratoire  
. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité  
et ses qualités humaines m'ont profondément touchée.*

*\*Merci\**

# ***DEDICACE***

*Je dédie ce travail à mes chers parents, jamais je ne saurais m'exprimer quant aux sacrifices et aux dévouements que vous avez consacré à mon éducation et mes études.*

*A ma sœur Salma, à mes frères Mohamed et Rafik,*

*A mes Tantes Amima Kheira, Amima maisonnette*

*A mes oncles tonton Hasssen, tonton Djellil, tonton Khaled, tonton Azouz*

*A mes amies Yasmine, Wafa, Nihad, Saliha, salma .*

*A mes amis Rayane, Wahab, Youcef.*

*Qui m'ont supporté durant cette année et avec les quels j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.*

## Liste des abréviations

<b>AINS :</b>	Antis inflammatoires non stéroïdiens
<b>AIS :</b>	Anti-inflammatoires stéroïdiens
<b>BLVBRP :</b>	Bilié lactosé au vert brillant et au rouge de phénol.
<b>CAD :</b>	Communication Audiovisuelle Dynamique
<b>COX :</b>	Cyclo-oxygénase
<b>GAMT :</b>	Germes aérobies mésophiles totaux
<b>GC :</b>	Gioliti Cantonii
<b>Iso :</b>	International standards organisation
<b>JORA :</b>	Journal Officiel de la République Algérienne
<b>MS :</b>	Matière sèche
<b>NA :</b>	Norme Algérienne
<b>NF :</b>	Norme Française
<b>NPP :</b>	Norme le plus probable
<b>OGA :</b>	Gélose glucosée à l'oxytétracycline
<b>pH :</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>µl :</b>	Microlitre
<b>PA :</b>	Principe actif
<b>ppm :</b>	Partie par million
<b>PCA :</b>	Plate count agar
<b>TSN :</b>	Tryptone-Sulfite-Néomycine
<b>UFC :</b>	Unité formant des colonies
<b>VBL :</b>	Lactose bilié au vert brillant
<b>TSN :</b>	Tryptone-Sulfite-Néomycine

## Liste des symboles

- Dil** : Facteur de dilution en volume.
- C<sub>ph</sub>** : Concentration initiale en phycocyanine,
- C** : Concentration de spiruline mise à tromper.
- F** : La friabilité ou perte de masse (%).
- P<sub>0</sub>** : Poids initiale des comprimés (g).
- P<sub>1</sub>** : Poids final des comprimés(g).
- °C** : Degré Celsius
- C (%)** : Taux de cendre, exprimé en pourcentage (%).
- m<sub>0</sub>** : masse en gramme du creuset vide.
- m<sub>2</sub>** : masse, en gramme du creuset et son contenu (Cendre après incinération).
- m<sub>1</sub>** : masse en gramme du creuset de la prise d'essai.
- W<sub>pn</sub>** : la teneur en azote protéique de l'échantillon pour l'essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse.
- V<sub>S</sub>** : volume d'acide sulfurique versé pour l'essai à blanc.
- V<sub>b</sub>** : volume d'acide versé pour l'échantillon.
- M<sub>r</sub>** : la valeur numérique de la molarité exacte de l'acide sulfuriques.
- m** : masse de la prise d'essai de l'échantillon.
- M<sub>s</sub>** : le taux de la matière sèche dans la spiruline,
- m<sub>v0</sub>** : la masse du verre de montre (g),
- m<sub>v1</sub>** : la masse du verre montre+ la prise d'essai (g),
- m<sub>v2</sub>** : la masse du verre de montre + la prise d'essai sèche (g).
- H** : Humidité (%).
- D<sub>o</sub>** : densité optique mesurée à la longueur d'onde nm(m<sup>-1</sup>).
- C<sub>ph</sub>** : concentration initiale en phycocyanine (%).
- DIL** : facteur de dilution .
- C** : la concentration de spiruline mise à tromper.
- g** : Gramme
- N** : Newton
- Rpm** : Rotation par minute

## Résumé

L'objectif de ce travail est l'évaluation de quelques activités biologiques de la spiruline anti-inflammatoire, cicatrisante et antifongique et l'élaboration d'un complément alimentaire à base de poudre de spiruline..

Un contrôle de qualité de la poudre de spiruline a été effectué, et a montré sa bonne qualité microbiologique en effet, nous avons remarqué une absence des germes d'altération et pathogènes.

Les résultats des caractéristiques physicochimiques de la matière première ont été évalués, La poudre analysée possède un PH légèrement inférieur à celui recommandé par les normes, il est de 6.244, la teneur en eau est de 6.555 %, la teneur en cendre est de 9.35 %, la teneur en protéine est de 52 % en ce qui concerne la teneur en phycocyanine est estimée à 1.55 g/100g MS .

Nous avons déterminé ensuite, les caractéristiques des gélules élaborées suite à l'application d'un ensemble d'analyses qui se basent sur les mêmes procédés appliqués en industrie pharmaceutique. Les comprimés de la formulation F<sub>1</sub> présentent des caractéristiques physiques qui ne correspondent pas aux normes avec une dureté inférieure à 45 N et une perte de masse importante. Les comprimés de la formulation F<sub>2</sub> possèdent une dureté inférieure à 45N et une friabilité inférieure à 1%.

**Mots clés :** Spiruline, comprimés, gélules, complément alimentaire, phycocyanine.

## Summary

The objective of this work is the assessment of some biological activities of spirulina anti-inflammatory, healing and antifungal voted to a bibliographic review of various elements relating to our work. and the development of a food supplement on the spirulina's basis powder.

Quality control of our spirulina powder was performed and showed its good microbiological quality: indeed, we noticed a lack of spoilage and pathogenic germs. The results of the physicochemical characteristics of the raw material were evaluated. The analyzed powder has a pH slightly lower than recommended by the standards: it reaches 6.244. Water content is 6.555%. Ash content is 9.35%. Protein content is 52%. Regarding the content of phycocyanin, it is estimated at 1.55 g/100g MS.

We then determined the characteristics of the capsules prepared by applying a series of analyzes which are based on the same methods applied in pharmaceutical industry. The tablets of the formulation F1 have physical characteristics which don't meet the standards with a hardness less than 45 N (Newton) and a significant weight loss. Formulation F2 tablets have a hardness of less than 45 N (Newton) and a friability of less than 1%.

**Keywords:** Spirulina tablets, capsules, food supplement, phycocyanin.

## ملخص

إن الهدف من هذا العمل هو تقييم بعض الأنشطة البيولوجية للـسبيرولينا المضادة للالتهابات، وتضميد الجراح ومضاد للفطريات وأيضاً تطوير مكمل غذائي يعتمد على مسحوق سبيرولينا .

تم تحصيل نتائج الخصائص الفيزيائية للمواد الخام بعد تحليل المسحوق، وُجد أن PH منخفض قليلاً مما يوصى به في المعايير الفرنسية، وأنه يرتفع إلى 6.244 ، محتوى الماء 6.555% ، محتوى الرماد 9.35% ، محتوى البروتين 52% ، ويقدر محتوى فيكوسيانين 1.55 g/100g MS .

و بعدها تحصلنا على خصائص كبسولات سبيرولينا من خلال تطبيق مجموعة من التحاليل التي تستند لنفس الأساليب المطبقة في صناعة المستحضرات الصيدلانية. الأقرص الأولى المنتجة لها خصائص فيزيائية لا تستوفي المعايير الفرنسية ولها صلابة أقل من 45 ن و فقدان الكمية الكتلية كبيرة. الانتاج الثاني من الأقرص لها صلابة أقل من 45 ن وتفتيت أقل من 1% .

**كلمات البحث:** أقرص السبيرولينا، كبسولات، والمكملات الغذائية، فيكوسيانين.

## 1. Description de la spiruline

*Arthrospira platensis*, appelée communément spiruline, est une cyanobactérie qui est exploitée dans diverses régions du monde aussi bien en lacs naturels qu'en bassins industriels (Trabelssi & al, 2010). Elle est consommée depuis les temps reculés par diverses populations du monde (Tchad, Mexique, Inde) (Vicenete, 2008). La spiruline se présente sous forme de filaments constitués de cellules juxtaposées.

La reproduction de la spiruline se fait par division des filaments (Jourdan, 2006). Elle constitue un complément alimentaire du futur et est énergisante et riche en nutriment (Jourdan, 2006). Grâce à ses qualités nutritionnelles exceptionnelles, elle a des propriétés anti-âges et anti-cancer permettant même de contrôler le poids ou de construire du muscle. En effet, elle offre jusqu'à 70% de protéines, de sels minéraux, des oligo-éléments et vitamines (Ould Belahcent & al, 2013).

## 2. Biologie et écologie

### 2.1. Morphologie et caractères généraux

La spiruline tire son nom de ses filaments non ramifiés enroulés en spirales, qui ressemble à un minuscule ressort à boudin (Figure 1). Elle a une longueur moyenne de 0.3 mm (Jourdan, 2006). La spiruline est dotée d'un pouvoir photosynthétique, c'est-à-dire qu'elle produit de la matière organique à partir du gaz carbonique et de l'énergie solaire qu'elle convertit en énergie chimique utilisée pour réaliser la synthèse d'un nombre important de métabolites. On trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites. Toutefois, elle possède une grande adaptabilité morphologique et dimensionnelle liées aux milieux de culture (Flaquet & Hurni, 2006). La taille des cellules de cyanobactéries se situe généralement entre 1 et 10 microns). Leur paroi est de type gram-négative classique. Ce sont des vrais procaryotes (organisés et dépourvus de membrane nucléaire), malgré leur système photosynthétique proche de celui des eucaryotes (Gershwin & Belay, 2009).



Figure 1: *Spirulina platensis* observée au microscope (Antenna technologie, 2007).

### 2. 2. Reproduction

La reproduction est végétative, c'est à dire asexuée et s'effectue par scission simple ou multiple, par bourgeonnement ou encore par fragmentation au hasard. Chez certaines espèces, des cellules spécialisées peuvent résister à la dessiccation puis "germer" lorsque les conditions redeviennent favorables (**Flaquet & Hurni, 2006**).

### 2.3. Taxonomie d'*Arthrospira platensis*

La Spiruline est une cyanobactérie, anciennement désignée par le terme « algue bleue » puis cyanophycée. Elle appartient donc au domaine des bactéries (*Bacteria*) et se classe parmi les bactéries gram négatives. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. La spiruline appartient à l'ordre des Nostocales, ou encore appelé Oscillatoriales, à la famille des Oscillatoriaceae, au genre *Oscillatoria* et au sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira*. Le tableau ci-après synthétise la taxonomie d'*Arthrospira platensis*.

**Tableau 1 : Taxonomie récapitulative (Fox, 1999) (Wheeler & al, 2000) (Boon & al, 2001) (Benson & al, 2002).**

<b>Règne</b>	<b>Monera ou Bacteria</b>
<b>Sous –Règne</b>	Procaryota
<b>Phylum ou division</b>	Cyanophyta ou Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordre</b>	Oscillatoriales
<b>Famille</b>	Oscillatoriaceae
<b>Genre</b>	<i>Arthrospira</i>
<b>Espèce</b>	<i>Platensis</i>

### 3. Composition chimique et valeur biologique de la spiruline

La spiruline est utilisée en alimentation humaine, compte tenu de ses teneurs en protéines, vitamines, minéraux et acides gras non saturés. C'est l'ensemble de tous ses nombreux facteurs nutritifs qui ont n'en fait un aliment si précieux. La composition chimique des spirulines est variable selon les conditions de culture (**Clement, 1975**).

#### 3.1. Protéines

l'analyse des propriétés nutritionnelles de la spiruline révéla tout d'abord une teneur exceptionnelle en protéines, de l'ordre de 60 à 70 % du poids sec, c'est à dire deux fois plus que les meilleures sources de protéines végétales. Par exemple, la farine de soja ne contient que 35 % de protéines. Les protéines de la spiruline sont complètes car tous les acides aminés essentiels y figurent, et représentent 47 % du poids total des protéines. Parmi ces acides aminés essentiels, les plus faiblement représentés sont les acides aminés soufrés: méthionine et cystéine, qui sont toutefois présents à plus de 80 % de la valeur idéale définie (**Babadzhanov & al, 2004**).

### 3.2. Vitamines

Parmi les vitamines, le bêta-carotène et provitamine A représentent 80 % des caroténoïdes présents dans la spiruline; le reste étant composé principalement de physoxanthine et de cryptoxanthine, ces deux derniers étant aussi convertibles en vitamine A par les mammifères (**Clement, 1975**). Comme les besoins en vitamine A sont estimés chez l'adulte à moins de 1 mg par jour, 1 à 2 grammes de spiruline suffisent largement à couvrir les besoins en vitamine A. D'autre part, l'absence de vitamine A libre exclut un éventuel risque de surdosage (**Quillet, 1975**).

### 3.3. Acide nucléique

Les acides nucléiques totaux représentent 4,2 à 6 % du poids sec de l'algue, et ce faible taux exclut tout risque d'excès d'acide urique chez les consommateurs réguliers de la spiruline à la dose journalière recommandée à titre de complément alimentaire (**Avino & al, 2000**).

### 3.4. Lipides

La spiruline contient l'acide gamma-linoléique, acide gras à haute valeur alimentaire, qui est rare dans les aliments courants. Cet acide gras essentiel du groupe des omega-6 est présent en quantité relativement élevée de 20,3 % jusqu'à 40 %, soit environ 4 % du poids sec selon certains auteurs (**Romay & al, 1998**). La spiruline peut être considérée comme l'une des meilleures sources connues d'acide gamma-linoléique, après le lait humain et quelques huiles végétales peu courantes et fort chères (huiles d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre) (**Falquet & Hurni, 2006**).

### 3.5. Glucide

Les glucides constituent 15 à 20 % de la matière sèche des spirulines (**Campanella, 1999**). D'autres polysaccharides comme le calcium-spirulan sont composés de rhamnose, ribose, manose, fructose, galactose, xylose, glucose, acide glucuronique, sulfate et calcium (**Hayashi & al, 1996**). Cependant, les glucides simples ne sont présents qu'en très faibles quantités (**Lee J-b & al, 2009**).

### 3.6. Composition en sels minéraux et oligo-éléments

La richesse de la spiruline en fer, dont la biodisponibilité est deux à trois fois supérieure à celle de la viande, se révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques (**Falquet & Hurni, 2006**). La spiruline est aussi une bonne source de magnésium biodisponible chez l'Homme (**Jourdan, 2006**). Le potassium est richement représenté dans la spiruline, surtout intéressant dans les pays industrialisés où le rapport entre le sodium et le potassium est souvent trop élevé (**Sautier, 1975**).

### 3.7. Phycocyanine

Le terme 'phycocyanine' vient du grec « phyco » signifiant algue et « cyanine » venant de la couleur cyan, qui est dérivée du grec « kyanos » et signifie bleu-vert (**Hayashi & al, 1996**). La phycocyanine est une phycopolipoprotéine. Elle est le pigment le plus abondant de la spiruline et représente plus de 15% du poids frais et plus de 20% du poids sec de l'algue (**Romay & al, 1998**).

#### 4. Production de la spiruline

La production de spiruline se fait à plusieurs échelles : artisanale, semi-industrielle et industrielle. Les éléments de différenciation de ces modes de production sont la surface totale des bassins de culture et leurs surfaces unitaires, les moyens et matériaux utilisés, les degrés de technologie et les objectifs. Le processus d'obtention de la spiruline passe cependant par les mêmes étapes obligatoires (**Jourdan, 2006**).

##### 4.1. Bassins de culture

La spiruline se cultive dans des bassins de différentes tailles confectionnés en plastique, béton, parpaing, brique ou en argile (**Jourdan, 2006**). Comme mesure de précaution, ces bassins doivent être couverts par une serre, une agitation est nécessaire pour homogénéiser, favoriser l'élimination de l'oxygène et assurer une bonne répartition de l'éclairage parmi toute la spiruline (**Achard, 1994**) (**Voir Figure 2**).



**Figure 2 : Bassin de culture à l'échelle industriel (*Antenna technologie, 2007*).**

##### 4.2. Milieu de culture

La spiruline vit dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable ou au moins filtrée.

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium. Tandis que la salinité complémentaire est apportée par les différents engrais (l'azote, le phosphate et le potassium) et du sel (chlorure de sodium) (**Ayala & Benavente, 1982**).

##### 4.3. Ensemencement

Pour ensemer, il suffit de transvaser, dans du milieu de culture neuf, un certain volume de culture provenant d'un autre bassin en production jusqu'à ce que la couleur devienne verte. Ensemencer de préférence le soir. Pour réussir le démarrage d'une culture, on a toujours intérêt à démarrer d'un milieu aussi concentré en spiruline (**Jourdan, 2006**).

##### 4.4. Filtration

Afin de récolter une spiruline aussi pure que possible, il est conseillé de la faire passer à travers une toile de 150µm avant celle de 30 ou 60 µm de manière à recueillir les débris sur la première toile et la spiruline sur la deuxième toile et à laisser passer le filtrat. La pâte verte de spiruline qui s'est accumulée sur le filtre peut être récupérée. En cas de production

à grande échelle, un tapis vibrant peut être mis après avoir éliminé les débris (**Avino & al, 2000**).

#### 4.5. Lavage et essorage

Lorsque la culture est sale, malodorante ou trop salée, il est conseillé de laver la biomasse avec de l'eau douce potable avant le pressage et le séchage. Dès l'apparition du liquide vert passant à travers la toile de pressage, il est recommandé de stopper cette opération. Dans tous les cas, le temps de pressage ne doit pas excéder 30 à 35 minutes afin de réduire le risque de fermentation. La biomasse ainsi pressée contient environ 20% de matière sèche (**Gershwin & Belay, 2009**).

#### 4.6. Séchage

Le séchage est le seul moyen sûr de conserver la spiruline. A la différence des productions industrielles, lors d'une production artisanale, ce sont les filaments entiers de spiruline qui sont soumis au séchage. Le temps de séchage est plus long, mais l'intérieur des cellules n'est pas soumis au contact direct des gaz chauds. La spiruline « égouttée » contient 90 % d'eau. La spiruline essorée en contient encore près de 80 %. Or, la spiruline séchée ne doit pas contenir plus de 7 à 8 % d'eau (**Jourdon, 2006**).

#### 4.7. Conditionnement et conservation

La spiruline sèche peut se conserver longtemps sans perdre trop de ses qualités à condition d'être stockée en sachets bien remplis et étanches, à l'abri de la lumière, de l'air et de forte chaleur. La spiruline est plus agréable à consommer et fournit le plus de vitamines dès sa récolte, lorsqu'elle est non séchée. La durée de conservation d'une biomasse non lavée et pressée ne dépasse pas quelques heures. Cette biomasse peut être conservée deux à trois jours. Cette durée peut atteindre une bonne semaine si on ajoute 5 à 10 % de sel (**Charpy, 2002**). La spiruline peut être conditionnée sous forme poudre (**Figure 3**), paillettes (**Figure 4**)



**Figure 3** : Spiruline en poudre.

(Antenna technologie, 2007)



**Figure 4** : Spiruline en paillette.

(Antenna technologie, 2007)

### 5. Intérêt de la spiruline dans différents domaines

#### 5.1. Santé

Dans les pays développés et quelques régions d’Afrique, la spiruline est consommée comme complément alimentaire « bénéfique à la santé ». Longtemps recommandée comme complément en cas de carences en acides gras essentiels le véritable essor de la spiruline n’est apparu qu’à partir des années 90, et ceci lors de la découverte de molécules actives comme la phycocyanine ou le calcium spirulan( **Gershwin & Belay , 2009**). De nombreuses études ont reporté, pour la spiruline, des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoire, anticancéreuses, antivirales ou encore des capacités hépato protectrices ou modulatrices de l’immunité qui sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 2 : Quelques activités thérapeutiques de la spiruline et ses principaux constituants.**

Activité thérapeutiques de la spiruline	Référence
Activité antioxydantes de phycocyanine	(Pinero & al, 2001) , (Romay & al, 1998)
Activités anti-inflammatoire de phycocyanine	(Romay & al, 1998).
Activité anticancéreuse de phycocyanine	(Subhashini & al, 2004).
Activité anticancéreuse du calcium spirulan	(Mishima & al, 1998).
Activité sur le système immunitaire	(Qureshi & al, 1995), (Hirahashi & al, 2002),(Nemoto-Kawamura & al, 2004).
Activité pour diminuer le cholestérol due à l’acide gamma linoléique	(Belay & al, 2002).

## 5.2. Cosmétique

La spiruline est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge, par son action sur le renouvellement cellulaire et la tonicité des tissus. Elle est aussi utilisée en synergie avec d’autres algues, comme agent cicatrisant et antiseptique (**Xue & al, 2002**).

## 5.3. Agroalimentaire

En alimentation humaine, elle est utilisée comme colorant naturel dans les chewing gums, produits laitiers, boissons non alcoolisées comme la menthe. La phycocyanine est un des rares pigments naturels de couleur bleue. Elle apparaît également dans une gamme de produits algaux mélangée à du sel et des tagliatelles. En Suisse et au Japon, il existe depuis longtemps du pain à la spiruline (**Belay, 2002**).

## 6. Généralité sur les activités biologiques

### 6. 1. Activité anti-inflammatoire

### ✓ Définition de l'inflammation

L'inflammation est une réaction de défense et d'adaptation de l'organisme à une stimulation cellulaire excessive ou anormale due à une agression tissulaire d'origines diverses qui peut être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse (Ndiaye & al, 2006).

### ✓ Types d'anti inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont répartis en deux grands groupes : Les anti- inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (Barnes, 1998) :

- ❖ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : ils forment un groupe de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire et les maladies rhumatismales. Tous les AINS possèdent, à des degrés divers, les propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques.
- ❖ Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) : Ils constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien.

## 6.2. Activité antifongique

### ✓ Définition des champignons :

Les champignons microscopiques appartiennent au règne fongique et forment un groupe de plus de 1 200 000 espèces connues dont une centaine d'espèces sont responsables de pathologies humaines. Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires sans chlorophylle, pigment assimilateur retrouvé chez les plantes. Elles sont médicalement représentées par les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Saccharomyces*, *Geotrichum* et *Trichosporon*. D'un point de vue cellulaire, elles possèdent un noyau entouré d'une membrane nucléaire, un réticulum endoplasmique et des mitochondries. La membrane fongique est riche en lipides dont l'ergostérol, et la paroi est composée de protéines, de phospholipide, de chitine, et de sucres dont les principaux sont les mannanes (Chu & al, 1993).

### ❖ *Candida albicans*

C'est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (Graser & al, 1996) formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Les levures du genre *Candida* sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés (Benedict & Colagrecó, 1994). En milieu hospitalier, les levures du genre *Candida* et en particulier *Candida albicans* représentent la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique. *Candida albicans* peut aussi être isolé de manière exceptionnelle dans la nature (sol, plante, atmosphère, eau...) mais cela résulte en général d'une contamination fécale (Chu & al, 1993).

### ❖ *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place privilégiée dans les activités industrielles. Elle est utilisée par l'homme depuis des millénaires pour la production de boissons et produits fermentés (vin, bière et pain) et joue un rôle très important dans l'industrie agroalimentaire comme agent de fermentation et pour l'élaboration de produits dérivés. De nos jours, la levure est également largement utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt. Dans le domaine pharmaceutique et médical, elle est utilisée pour la production de vaccins, de probiotiques ou de protéines comme l'insuline (Goffeau & al, 1996).

### 7.3. Activité cicatrisante

#### 7.3.1. Cicatrisation

La cicatrisation d'une plaie est un phénomène biologique naturel. Cette aptitude du tissu humain à réparer des lésions localisées est cependant tributaire de certaines données. En effet, l'âge, l'état général du patient, les pathologies associées, certains traitements, l'étiologie, la localisation et la prédisposition de la plaie à une infection, peuvent retarder ou altérer la cicatrisation (Paladini, 1996).

#### ✓ Les différentes étapes de la cicatrisation

La cicatrisation de la plaie s'effectue en quatre phases qui se chevauchent (Martini, 2006) :

#### ❖ Phase vasculaire et inflammatoire

Cette phase est induite suite à la nécrose et à l'effraction vasculaire. Elle dure environ trois jours. Les signes cliniques de cette phase sont :

- Gonflement provoqué par l'inflammation.
- Rougeur due à la vasodilatation.
- Chaleur due à la vasodilatation et à l'accroissement de la vascularisation.

#### ❖ Phase de prolifération ou phase de granulation

Lors de cette phase, on aboutit à la formation du tissu de granulation ainsi qu'à la ré-épithélialisation.

#### ❖ Phase de maturation

Cette phase correspond à la fermeture de la plaie ainsi qu'au blanchissement de la Cicatrice. La membrane basale se reconstitue entre 2 et 6 jours.

#### ❖ Phase de la cicatrisation

Des couches de tissu plus profondes sont remplacées par du tissu conjonctif ou cicatriciel. Elle apparaît à partir du 10<sup>ème</sup> jour et disparaît le 21<sup>ème</sup> jour quand la plaie est fermée.

## 8. Généralités sur les gélules

### 8.1. Définition des gélules

Les premières capsules de gélatine ont été créées par deux pharmaciens français, Mothe et Dublanc, en 1833. Les gélules désignent une forme galénique de médicament, solide, que l'on avale. Une gélule est composée de deux demi-capsules très minces à fond hémisphérique s'emboîtant exactement l'une dans l'autre. Il en existe différents types classés selon leurs tailles, leurs compositions et leurs couleurs **(Falson-Rieg & Pirot, 2004)**.

### 8.2. Différents types de gélules

La plupart des gélules vides sont constituées de gélatine (matière physiologiquement inerte, neutre et inodore) associé à d'autres substances dont la consistance peut être adaptée par addition, par exemple, de glycérol ou de sorbitol. Ce type de gélule est uniquement fabriqué en industrie ; il consiste à plonger des formes métalliques spéciales dans des solutions de gélatine. Il se forme ainsi un film autour du moule métallique qui est séché. Les demi-capsules sont préparées sur deux chaînes parallèles, une pour les couvercles et l'autre pour les fonds **(Pharmacopée Internationale, 1981)**.

### 8.3. Avantages et inconvénients des gélules (Kettani.N. , 2007)

#### ✓ Avantages

Les gélules présentent de nombreux avantages qui justifient leur emploi. Elles permettent :

- ❖ De masquer un goût désagréable et une saveur amère ou même insipide.
- ❖ De cacher une odeur peu supportable telle que la vitamines B.
- ❖ De répartir des doses individuelles précises.
- ❖ De bien mettre à disposition de l'organisme des principes actifs (contenus dans les gélules).
- ❖ D'obtenir des formes gastro résistantes ou entéro-solubles par traitement spécial.

#### ✓ Inconvénients

Les gélules peuvent avoir des inconvénients comme n'importe qu'elle forme galénique :

- ❖ Le retard de transit qui se traduit par un retard d'absorption.
- ❖ Un prix relativement élevé comme toutes les gélules qui sont à base de plante.
- ❖ Interaction adhésive susceptible d'entraîner des effets secondaires indésirables.

## 1. Matériel

L'objectif de ce travail est d'une part de mettre en évidence et de valoriser l'activité anti-inflammatoire, cicatrisante et antifongique de la poudre de spiruline *Spirulina platensis* et d'autre part, la conception d'un complément alimentaire. Cette étude a été effectuée au niveau du Centre de Recherche et Développement (C.R.D), Saïdal d'El-Harrach. Plus précisément, le stage a eu lieu dans les laboratoires suivants:

- Laboratoire de pharmacologie et toxicologie (pour les activités: anti-inflammatoire et cicatrisante) In vivo.
- Laboratoire de physicochimies pour les analyses physicochimiques de la poudre de spiruline.
- Laboratoire de galénique pour l'élaboration du complément alimentaire.

D'autre part, les analyses microbiologiques et l'activité antifongique ont été effectuées au niveau du laboratoire d'hygiène (EPSP) qui se trouve dans la wilaya de Blida. Ce stage s'est étalé pendant une période de 4 mois : du début du mois d'avril jusqu'à la fin du mois de juillet 2015.

### 1.1. Matériel biologique

#### ✓ Matériel végétal

La spiruline a été importée de Paris sous forme de paillette (**Voir figure 5**); la souche a été cultivée au Burkina-Faso exactement dans la région Nayalagué. Elle est issue de la culture artificielle. Les paillettes ont subi un broyage pour donner une poudre, illustrée dans la **Figure 6**, qui a été conservée dans un bocal hermétiquement fermé.



**Figure 5 :** Paillettes de spiruline



**Figure 6 :** Poudre de spiruline

### ✓ Matériel animal

Pour les besoins de l'expérimentation et afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire , nous avons utilisé des souris Albinos, de sexe mâle et femelle et dont les poids varient entre 20g à 22g (**Voir figure 7**). Les conditions d'élevage des souris sont définies comme suit :

- ❖ Nourriture : granulé d'origine ONAB.
- ❖ Eau de ville est donnée de manière *ad libitum*.
- ❖ Température ambiante 20-24°C.
- ❖ Taux d'humidité 50%.
- ❖ Eclairage : 10h.



**Figure 7 : Souris mâles Albinos.**

-Pour l'activité cicatrisante nous avons utilisé des rats de sexe mâle et femelle qui ont un poids moyen de 300 g.

Les conditions d'élevage des rats sont définies comme suit :

- ❖ Nourriture : granulé d'origine ONAB.
- ❖ Eau de ville est donnée de manière *ad libitum*.
- ❖ Température ambiante 20-24°C.
- ❖ Taux d'humidité 50%.
- ❖ Eclairage : 10h.

## ✓ Matériel microbien

Le support microbien disponible au niveau du laboratoire d'hygiène mis à notre disposition est donné dans le tableau suivant :

**Tableau 3 : Support microbien et ses références**

Champignon	Référence
<u><i>Candida albicans</i></u>	ATCC 24433
<u><i>Saccaromyces cerivisiae</i></u>	ATCC 2601

## 1.2. Matériel non biologique

Le matériel utilisé au laboratoire (l'appareillage, la verrerie et les réactifs) est illustré dans l'annexe A.

## 2. Méthodes d'analyses

### 2.1. Etude des activités biologiques

#### 2.1.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

##### ✓ Principe

Selon la méthode de (Levy, 1969), citée par (Berkan & al, 1991), l'injection de la carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte d'une souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit ayant un effet anti-inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit de référence et du produit anti-inflammatoire à tester.

#### Protocole expérimental

Afin de mettre en évidence de façon indubitable l'effet anti-inflammatoire, nous nous sommes intéressés à 24 souris réparties en 4 lots. Nous appliquons des actions spécifiques aux souris de chaque lot. Ce protocole comporte deux principales étapes :

##### ❖ Première étape

Au début de l'expérimentation, nous avons fait subir aux souris de chaque lot les mêmes actions consistant à des gavages (Voir figure 8), à savoir:

- Les souris du premier lot (**Lot E0**) : elles ont reçu un volume de 0,5ml d'eau distillée par gavage.

-Les souris du deuxième lot (**Lot E1**) : elles ont reçu un volume de 0.5ml par gavage d'un infusé obtenu par dissolution de 165 mg de poudre de spiruline dans 1000 ml d'eau physiologique. La concentration utilisée est de 4mg /kg.

-Les souris du troisième lot (**Lot E2**) : elles ont reçu 0.5 ml d'un infusé obtenu par dissolution de 82 mg de poudre de spiruline dans 1000 ml d'eau physiologique. La concentration utilisée est de 2 mg/kg.

-Les souris du quatrième lot (**Lot E3**) : elles ont reçu 0.5 ml d'un produit anti-inflammatoire Diclofenac<sup>®</sup> ; 1 comprimé de 75 mg dans 750ml d'eau physiologique. Après 30 minutes du début de l'expérimentation, nous avons provoqué une inflammation des pattes gauches de chaque souris des 4 lots (**Voir figure 9**). Pour cela, pour chaque patte gauche, nous avons injecté 0.025ml d'une solution de carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte.

### ❖ Deuxième étape

Après quatre heures du début de l'expérimentation, l'activité anti-inflammatoire de l'infusé de poudre de spiruline a été évaluée en sacrifiant les souris par l'éther puis en coupant les pattes postérieures au niveau de l'articulation (**Voir figure 10**). Les pesées des pattes sont faites à l'aide d'une balance analytique. L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination du pourcentage d'augmentation du volume des pattes gauches des souris. Nous avons effectué le calcul d'un tel pourcentage en se basant sur la méthode de (**Levy 1969**), citée par (**Berkan & al, 1991**). Cette dernière utilise la formule suivante :

$$\% \text{ d'augmentation d'œdème} = \left( \frac{\text{Moyenne des pattes gauches} - \text{Moyenne des pattes droites}}{\text{Moyenne des pattes droites}} \right) * 100$$

Nous avons utilisé une seconde fois la méthode de **Levy** pour le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \left( \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \right) * 100$$



**Figure 8** : Administration par voie orale de l'extrait aqueux de spiruline.



**Figure 9** : Injection de la carraghénine sous l'aponévrose (plantaire de la patte arrière gauche de la souris).



*Figure 10 : Coupure des pattes postérieures au niveau de l'articulation.*

Nous avons utilisé le test de comparaison Fisher pour l'étude statistique (**Voir annexe B**).

### **2.1.2. Evaluation de l'activité cicatrisante**

Pour l'étude du pouvoir cicatrisant de la pommade de spiruline, nous avons suivi le protocole de **Saidal**

#### ✓ **Objectif de l'étude**

Pour mettre en évidence l'effet cicatrisant de la pommade du produit à tester, la méthode d'excision en forme circulaire a été utilisée. En effet, elle présente l'avantage d'une meilleure précision de mesure et assure la continuité du processus de reconstitution jusqu'au stade de fermeture totale de la plaie.

#### ✓ **Principe**

Il consiste à appliquer le produit à tester sur des plaies préalablement provoquées. L'application de la produit à tester se fait de façon quotidienne jusqu'à épithélialisation complète des plaies (environ 15jours). Cette étude permet de comparer différentes cicatrices et leurs évolutions sur la base de la modification des surfaces de ces cicatrices.

#### ✓ **Préparation de la pommade**

Selon **Zaghloul et Meziane in (2014)** la préparation de la pommade se fait par la méthode suivante :

Nous avons fait fondre 200g de vaseline dans un bain marie à 60°C (le point de fusion de la vaseline), nous avons ajouté par la suite 100g de la poudre de *Spirulina platensis*, suivie d'une agitation pour que le malaxage soit plus facile, nous avons laissé le mélange reposer pendant 45 minutes (Jusqu'à l'apparition des petites bulles) ce dernier a été mis dans un bain marie, il est suivie d'un filtrage avec une bande à gaz. La conservation de la pommade a été faite dans un bocal hermétiquement fermé.

#### ✓ **Protocole expérimental**

##### ❖ **Préparation des animaux**

La veille de l'expérimentation, les animaux, sont pesés et marqués au niveau de leurs queues. Ils sont ensuite répartis en lots et mis à jeun.

##### ❖ **Répartition en lots**

La veille de l'expérimentation, les rats sont répartis en deux lots de trois rats chacun, comme il est indiqué dans le **Tableau 4** :

**Tableau 4:** Répartition des rats en deux lots

Lot	Traitement
<b>Lot 1</b>	La plaie <i>superieure</i> n'est pas traitée et représente le témoin. La plaie <i>inférieure</i> sera traitée par le produit de référence Madecassol <sup>®</sup> .
<b>Lot 2</b>	La plaie <i>supérieure</i> n'est pas traitée et représente le témoin. La plaie <i>inferieure</i> est traitée par la pommade de <u><i>Spirulina platensis</i></u> .

Nous avons anesthésié les rats par injection de la kétamine par voie intra péritonéale, à la dose de 100mg/ kg (**Voir figure 11**). Notons que le poids des rats a été préalablement pris en considération .Nous avons désinfecté les régions épilées avec de l'alcool chirurgical à 70°C (**Voir figure 12**). Dans un premier temps, nous avons procédé à l'ablation de la peau par excision en plaçant les rats sur une plaque de dissection et nous avons tracé les deux zones à découper en forme arrondie de 2 Cm<sup>2</sup> de surface. La coupure de la zone tracée s'effectue par l'utilisation de ciseaux et une pince. Par la suite nous avons nettoyé les plaies à l'aide d'une compresse imbibée préalablement par de l'eau physiologique à 0,9% (**Voir figure 13**).



**Figure 11 :** Injection de la Kétamine.



**Figure 12 :** Epilation de la région dorsolombaire.



### **Figure 13 : Méthode d'excision.**

Au cours de cette expérimentation les empreintes des plaies sont prélevées sur une feuille transparente tous les trois jours et cela à partir du jour 0.

#### **✓ Expression des résultats**

La surface des plaies est exprimée en centimètres carré. Les calculs ont été accomplis en utilisant le logiciel Auto CAD 2010.

### **2.1.3. Evaluation de l'activité antifongique**

#### **✓ Principe**

Pour évaluer l'activité antifongique de l'extrait aqueux de la spiruline, nous avons adopté la méthode de diffusion sur un milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose, appelés aromatoگرامme. Le principe de la méthode est tiré de la « Pharmacopée européenne ». La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée auparavant par plusieurs chercheurs (Chao & al, 2000) et (Ozcan & al, 2003). La méthode des aromatoگرامme consiste à déposer un disque stérile en cellulose (disque de 9 mm de diamètre), imprégné d'une quantité bien définie de l'extrait aqueux à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec des micro-organismes. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire autour du disque, appelée zone d'inhibition.

#### **Micro-organismes testés**

L'activité antifongique de l'extrait aqueux de spiruline a été testée sur deux levures à savoir : Candida albicans et Saccharomyces cerevisiae.

#### **✓ Protocole expérimental**

##### **❖ Préparation de l'extrait aqueux de spiruline :**

Pour la préparation de l'extrait aqueux de spiruline, nous avons mis 20 g de poudre de spiruline dans 100 ml d'eau distillée et nous l'avons laissé macéré pendant une durée de 24 h, la préparation est faite dans des conditions aseptiques.

##### **❖ Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune de 48h, nous avons réalisé des suspensions troubles en prélevant 3 colonies bien isolées et identiques, que nous avons déposées dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis nous avons agité au vortex.

##### **❖ Préparation de la deuxième couche du milieu**

Nous avons fait fondre les milieux Muller-hinton et saboraud et les avons laissés refroidir jusqu'à une température de 45 °C. Nous avons transvasé 50 ml de chaque milieu dans des flacons stérilisés. Nous avonsensemencé les milieux avec 200 µl de chaque suspension et agité manuellement ; puis nous avons déposé rapidement 4 ml de chaque milieuensemencé sur la surface de la première couche de gélose (couche support). Nous avons étalé immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et nous avons laissé le tout solidifier sur une paillasse.

#### ❖ Dépôt des disques

A l'aide d'une micropipette, nous avons prélevé 20 à 60 µl d'extrait aqueux de spiruline en utilisant des cônes stériles. Nous avons déposé chaque quantité prélevée sur le disque qui a été préalablement posé à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la géloseensemencée et incubée à 25° C pendant 48 h.

#### ❖ Lecture des résultats

L'apparition d'une zone claire autour du disque témoigne de la présence d'une activité inhibitrice de l'extrait aqueux. En revanche, l'absence de zone claire autour du disque signifie qu'il n'existe pas d'effet inhibiteur. La détermination du diamètre d'inhibition se fait à l'aide d'une règle décimale.

## 2.2. Analyses microbiologiques de la poudre de spiruline

Les analyses microbiologiques ont été effectuées sur la poudre de spiruline dont le but est d'estimer son innocuité et la possibilité de la transformer sans porter préjudice à la santé du consommateur. Ces analyses microbiologiques reposent sur la recherche et le dénombrement des germes les plus significatifs de l'état hygiénique du produit. Nous avons effectué le dénombrement et la recherche des germes suivants :

- La flore mésophile totale qui est un indice de l'état général de la qualité du produit.
- Les coliformes et *Clostridium* sulfite réducteurs constituant des groupes de germes indicateurs de la contamination fécale.
- Les salmonelles et staphylococcus( *Staphylococcus aureus* ) représentant des germes pathogènes .
- Les levures et moisissures qui sont à l'origine des altérations nutritionnelles et organoleptiques des produits .

### 2.2.1. Préparation des dilutions décimales

La spiruline destinée à subir des analyses microbiologiques dans notre recherche est sous forme de poudre, donc elle n'est pas directement pipetable. Pour cette raison, elle nécessite d'être fluidifiée; ceci représente ce qu'on appelle : la suspension mère (**NF V 08-301 , 1983**).

Pour la préparation des dilutions décimales, nous avons pesé aseptiquement 25 g de poudre de spiruline dans un récipient stérile et taré. Nous avons ajouté par la suite 225 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution  $10^{-1}$ , suivie d'une homogénéisation par agitation manuelle. Ensuite nous avons prélevé 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  précédente à l'aide d'une pipette pasteur stérile et nous l'avons introduite dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique. Le tube a été agité manuellement afin de rendre la dilution homogène. Nous

avons obtenu une dilution de  $10^{-2}$ . De façon similaire, la dilution de  $10^{-3}$  a été obtenue en partant d'une dilution  $10^{-2}$ . Toutes les manipulations ont été effectuées avec un maximum de précision et dans de bonnes conditions aseptiques, avec l'usage d'un bec benzen (Voir figure 14).



*Figure 14 : Manipulation dans des conditions aseptiques près d'un bec benzen.*

### 2.2.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux

C'est l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en présence d'oxygène avec une croissance optimale à une température située entre  $25^{\circ}\text{C}$  et  $45^{\circ}\text{C}$ . Cette flore est un indicateur de la qualité du produit à analyser. Un produit alimentaire dont la flore totale est en dessus des normes sera considéré comme impropre à la consommation (Chapman & Shark, 1981).

#### ✓ Principe

La recherche et le dénombrement des GAMT se font soit sur un milieu PCA ou TDYM en ensemençant en masse dans des boîtes de Pétri qui sont incubés à  $30^{\circ}\text{C}$  (NF 08-051, 1998).

#### ✓ Mode opératoire

Nous avons préparé des dilutions décimales  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ . Dans un premier temps, nous avons porté aseptiquement 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage et numérotée. Après nous avons rajouté environ 20ml de gélose PCA fondue, puis nous avons refroidi l'ensemble à  $45^{\circ}\text{C}$ . Pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée, nous avons fait des mouvements circulaires de va et vient en forme de 8. Après la solidification du milieu de culture, nous avons rajouté une deuxième couche d'environ 5 ml de la même gélose (PCA). Cette double couche joue un rôle protecteur contre les contaminations diverses. Nous avons procédé de la même manière pour les dilutions décimales  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ .

#### ❖ Incubation

Les boîtes ont été incubées couvercle en bas à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 72 heures.\*

#### ❖ Lecture

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaires en masse.

#### ❖ Dénombrement

Il s'agit de compter toutes les colonies qui ont poussé sur des boîtes contenant entre 15 et 300 colonies.

### 2.2.3. Recherche et dénombrement des coliformes totaux

Ils appartiennent à la famille des enterobacteriacées ; ce sont des bacilles Gram-, asporulés, oxydase-, aérobies ou anaérobies facultatifs possédant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 35°C avec production de gaz (**Bourgeois & Leveau, 1991**).

#### ✓ Principe

La recherche et le dénombrement des coliformes sont faits en milieu liquide par la technique du NPP c'est-à-dire le nombre le plus probable. La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

-Le test de présomption réservé à la recherche des coliformes totaux.

- Le test de confirmation, encore appelé test de Mac Kenzie, réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption (**NF-V08-050, 2009**).

#### ✓ Mode opératoire

##### ❖ Test de présomption

Nous avons pris 3 séries de 3 tubes ; chaque tube contient 10 ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (VBL) et muni d'une cloche de Durham. Nous avons mis successivement dans chacun des trois tubes de la première série 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ , puis dans chacun des trois tubes de la deuxième série 1 ml de la dilution  $10^{-2}$ , et dans chacun des trois tubes de la troisième série 1 ml de la dilution  $10^{-3}$ . Ensuite nous avons chassé l'éventuel gaz présent dans les cloches de Durham et avons bien mélangé le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

#### ✓ Lecture

Les tubes présentant à la fois un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche) et un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune sont considérés comme positifs.

**Remarque :** le test de confirmation n'a pas été effectué du fait qu'il n'y avait pas un dégagement gazeux ni un trouble microbien au niveau des tubes.

#### 2.2.4. Recherche et dénombrement des Staphylococcus aureus

Les Staphylococcus aureus, faisant partie des bactéries considérées comme des témoins d'hygiène, sont anaérobies facultatives, catalases positives, coagulases positives immobiles et non sporulées. Elles sont capables de produire des entéro-toxines (**Bourgeois & Leveau, 1991**).

##### ✓ Principe

L'enrichissement sur milieu Gioliti Cantonii (GC) permet une revivification idéale des souches stressées par la réduction de tellurite de potassium en tellure responsable de la coloration noire. De plus, le téllurite de potassium a un effet inhibiteur sur les autres germes. L'isolement sur milieu Chapman sélectionne les Staphylococcus aureus (**NF ISO 6888, 1999**).

##### ✓ Mode opératoire

###### ❖ Ensemencement

A partir des dilutions décimales, nous avons porté aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile. Nous avons ajouté par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement (GC) et du téllurite de potassium. Nous avons ensuite procédé à une homogénéisation du milieu et l'inoculum, et avons incubé les tubes à 37°C pendant 24 à 48 heures.

###### ❖ Lecture

Les tubes ayant viré au noir sont considérés positifs. Ces tubes feront l'objet d'une confirmation par l'isolement sur gélose Chapman, coulée en boîtes de Pétri. Les boîtes de Chapman ainsi ensemencées ont été incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies suspectes doivent être repérées, à savoir les colonies de taille moyenne, lisse, brillante et de couleur jaune.

#### 2.2.5. Recherche et dénombrement des Salmonelles

Les salmonelles font partie de la famille des enterobacteracées, ce sont des bacilles, anaérobies facultatives. Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, oxydase négative et catalase positive. Leur recherche et leur identification permettent de savoir si le produit alimentaire est propre à la consommation ou non (**Bourgeois & Leveau, 1991**).

##### ✓ Principe

Dans les denrées alimentaires, la recherche des Salmonelles se fait selon une technique de pré-enrichissement en eau peptonée et tamponnée, suivi d'un enrichissement. Enfin l'isolement s'effectue sur le milieu Hektoen (**NF V086-052, 1998**) ;

## ✓ Mode Opérateur

### ❖ Le premier jour : Pré-enrichissement

Nous avons mis 25 gr de produit à analyser dans un flacon contenant 225 ml d'eau peptonée que nous avons incubés à 37°C pendant 18 heures (**Voir figure 15**).

### ❖ Le deuxième jour : Enrichissement

L'enrichissement a été effectué sur deux milieux sélectifs différents à savoir :

- Le milieu de Rappaport Vassiliadis réparti à raison de 10 ml par tube (**Voir figure 16**)
- Le milieu de Sélénite-Cystéine réparti à raison de 100 ml par flacon.

L'enrichissement proprement dit, a été fait à partir du milieu de pré-enrichissement de la façon suivante :

- 0,1 ml en double pour les tubes dans le milieu de Rappaport Vassiliadis.
- 10 ml en double pour le flacon de Sélénite-Cystéine.



*Figure 15 : Photo du pré-enrichissement.*



*Figure 16 : Milieu de culture Rappaport Vassiliadis.*

## ✓ Incubation

Le premier tube de Rappaport Vassiliadis a été incubé à 37°C pendant 24 heures. Le deuxième tube de Rappaport Vassiliadis a été incubé à 42°C pendant 24 heures. Le premier flacon de Sélénite a été incubé à 37°C pendant 24 heures. Le deuxième flacon de Sélénite a été incubé à 42°C pendant 24 heures.

## ✓ Isolement

Chaque tube et chaque flacon ont été isolés sur deux milieux gélosés différents à savoir :

- Le milieu gélosé Hektoen (**Voir figure 17**).
- Le milieu gélosé Bilié lactosé au vert brillant et au rouge de phénol.



**Figure 17: Milieu de culture Hektoen.**

Toutes les boîtes ainsiensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

✓ **Lecture des boîtes et identification**

Après 24 heures d'isolement, les Salmonelles se présentent de la façon suivante :

- Colonies roses entourées d'une zone rouge sur gélose BLVBRP.
- Colonies le plus souvent d'une couleur gris-bleu à centre noir sur gélose Hektoen.

**2.2.6. Recherche et dénombrement de *Clostridium Sulfito réducteur***

Ces bactéries appartiennent à la famille des bacillacées et sont des bacilles gram positives, sporulées et anaérobies strictes. Elles réduisent le nitrate en nitrite et fermentent le lactose avec production de gaz. Elles contaminent les produits alimentaires en anaérobiose et sont capables de produire des toxines. Ces bactéries peuvent survivre aux processus de conservation des aliments. En effet, elles ont la capacité de sporuler (**Bougeois & Leveau, 1991**).

✓ **Principe**

Selon la disponibilité des milieux de culture, deux techniques sont recommandées pour la recherche de *Clostridium perfringens* à savoir :

- Méthode générale sur gélose Viande-Foie à 37°C.
- Méthode sélective sur gélose TSN ou TSC à 46°C. (**NF V08-019, 2003**).

✓ **Mode Opérateur**

❖ **Préparation du milieu**

Au moment de l'emploi, nous avons fait fondre un flacon de gélose Viande-Foie, suivi de son refroidissement dans un bain d'eau à 45°C, puis nous avons ajouté une ampoule d'alun de fer et une autre de sulfite de sodium. Nous avons mélangé soigneusement et aseptiquement l'ensemble. Le milieu a été maintenu dans une étuve à 45°C jusqu'au moment de l'utilisation.

❖ **Ensemencement**

Les tubes contenant les dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$  ont été soumis :

d'abord à un chauffage à 80°C pendant 8 à 10 minutes, puis à un refroidissement immédiat sous l'eau du robinet dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.

A partir de ces dilutions, nous avons porté aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre, puis nous avons ajouté environ 15 ml de gélose Viande-Foie prête à l'emploi dans chaque tube. Nous l'avons laissé solidifier sur une paillasse pendant 30 minutes.

#### ❖ Incubation

Ces tubes ont été ainsi incubés à 37°C pendant 48 heures.

#### ❖ Lecture

La première lecture a été faite après 16 heures. Toutes les colonies noires ayant poussé en masse et possédant des diamètres supérieurs à 0,5 mm ont été repérées. Notons qu'une telle lecture aurait été presque impossible si un délai de 16 heures est dépassé. En effet, les colonies de Clostridium Sulfito-réducteur seraient envahissantes (on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant alors difficile, voire impossible l'analyse qui doit est refaite).

#### ✓ Interprétation des résultats

Il est donc impératif de repérer toutes les colonies noires, puis de procéder à leurs identifications biochimiques.

### 2.2.7. Recherche des levures et moisissure

Ces champignons ont la capacité de se développer en milieu acide. Ils provoquent des défauts de fabrication qui se traduisent par des altérations nutritionnelles et organoleptiques du produit. Leur croissance est moins rapide que celle des bactéries mais très peu exigeante en éléments nutritifs (**Bourgeois & Leveau, 1991**).

#### ✓ Principe

Les levures et moisissures sont des microorganismes qui, après ensemencement en surface sur un milieu inhibiteur pour les bactéries aérobies (gélose OGA), forment des colonies après une incubation à 20 °C pendant 5 jours (**NF ISO 7954, 2008**).

#### ✓ Mode opératoire

##### ❖ Ensemencement

Nous avons fait fondre le milieu de culture OGA et l'avons refroidi à une température de 45°C à 48 °C. Après refroidissement, nous avons coulé 15ml du milieu de culture sur trois boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, nous avons transféré, à l'aide d'une pipette pasteur, 0.1 ml de la solution mère  $10^{-1}$  sur la première boîte de Pétri, 0.1ml de la dilution  $10^{-2}$  sur la deuxième boîte de Pétri et 0.1ml de la dilution  $10^{-3}$  sur la troisième boîte de Pétri. Nous avons réparti la suspension sur toute la surface de la gélose à l'aide d'un râteau stérile.

##### ❖ Lecture

Après 48 h d'incubation, il est impératif de repérer les colonies sur la boîte. Nous avons dénombré les colonies de levures et de moisissures sur les boîtes présentant entre 10 à 100 colonies.

## 2.3. Analyses physicochimiques de la poudre de spiruline

### 2.3.1. Mesure du pH

Le PH correspond au logarithme décimal négatif de la concentration en ion  $H^+$ . Son principe est basé sur la détermination de la différence de potentiel existant entre deux électrodes prolongées dans le produit à analyser à l'aide d'un PH mètre.

#### ✓ Mode opératoire

La mesure du PH se fait à l'aide d'un pH mètre de la manière suivante (**NF ISO 11289, 1993**) :

-Nous avons effectué l'étalonnage du pH mètre avec deux solutions tampon, la première a un PH =4.6 et la deuxième a un pH =7.

- ❖ Une fois l'appareil étalonné, nous avons rincé les électrodes par l'eau distillée
- ❖ Nous avons versé une quantité suffisante de la solution dans le récipient de mesure.
- ❖ Nous avons introduit l'électrode dans la solution à examiner.
- ❖ Nous avons tiré la valeur du pH sur l'écran de l'appareil (**Voir figure 18**).

**Remarque :** Conformément à la méthode citée dans (**Jourdan, 2006**), l'échantillon est préparé en pesant 4 g de poudre de spiruline dissoute dans 100 ml d'eau distillée. Nous l'avons laissé reposer pendant 15 minutes pour l'homogénéisation.



**Figure 18 :** Photographie du pH mètre.

### 2.3.2. Détermination de la teneur en matière sèche

#### ✓ Principe

Après dessiccation complète, la matière sèche restante est habituellement indiquée en fraction massique. Elle est conventionnellement exprimée en pourcentage massique. La

teneur en matière sèche est la masse restante après dessiccation complète de la matière. Elle est conventionnellement exprimée en pourcentage massique (**Godon & Loisel , 1984**).

✓ **Mode opératoire**

Pour mettre en évidence la teneur en matière sèche de la poudre de spiruline, nous avons placé le panier contenant l'échantillon dans l'étuve à  $102 \pm 2$  °C pendant 24 h, le refroidissement au niveau du dessiccateur a été effectué, par la suite nous avons pesé le creuset après dessiccation.

✓ **Expression des résultats**

La matière sèche est exprimée en pourcentage selon l'équation suivante :

$$M_s = \frac{mv_2 - mv_0}{mv_1 - mv_0} * 100$$

Où les variables de l'équation sont définies comme suit :

$M_s$  : le taux de la matière sèche dans la spiruline,

$mv_0$  : la masse du verre de montre (g),

$mv_1$  : la masse du verre montre+ la prise d'essai (g),

$mv_2$  : la masse du verre de montre + la prise d'essai sèche (g).

H : humidité (%)=100- $M_s$

### 2.3.3. Détermination de la teneur en protéines

La détermination de la teneur en protéines suit la méthode de Kjeldhal (**pharmacopée européenne, 1997**).

✓ **Principe**

La méthode de Kjeldhal est basée sur le fait que la teneur en protéines est proportionnelle à la quantité d'azote totale dans la matière végétale (**Pharmacopée européenne, 1997**).

✓ **Mode opératoire**

❖ **Prise d'essai**

Nous avons introduit environ 1 g de poudre de spiruline dans les matras suivant la teneur présumée en azote et le degré de l'homogénéisation du produit.

❖ **Minéralisation**

Nous avons placé le matras sur le dispositif de chauffage, après avoir ajouté environ g de catalyseur et 7 ml d'acide sulfurique concentré. Nous avons chauffé doucement en agitant de temps en temps. La température a été progressivement augmentée jusqu'à ce que le liquide devienne limpide et de coloration verte stable. Nous avons poursuivi le chauffage pendant 2 heures et laissé refroidir les matras. Nous avons complété l'ensemble en ajoutant 100 ml d'eau distillée.

#### ❖ Distillation

Le matras a été mis dans l'appareil à distillation. Le milieu a été alcalisé en introduisant lentement dans le matras environ 30 ml de solution NaOH (10 N). Il se produit un échauffement notable du produit, après avoir rincé la paroi du circuit par l'eau distillée.

L'entraînement de l'ammoniac commence peu après. L'ammoniac libéré par l'alcalisation est distillé. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer contenant 30 ml de la solution absorbante (solution d'acide borique augmentée d'indicateurs colorés, le rouge de méthyle et le vert de bromocrésol). La distillation a été poursuivie jusqu'à récupération d'environ 100 ml de distillat.

#### ❖ Titrage

Le titrage a été effectué aussi rapidement après la distillation par une solution d'acide sulfurique 0,1 N jusqu'à persistance du point de virage. Un essai à blanc a été inclus dans chaque série de dosage (**Voir figure 19**).



*Figure 19 : Titrage de la solution à analyser par l'acide sulfurique.*

#### ✓ Expression des résultats

La teneur en azote totale, exprimée en gramme d'azote pour 100 g d'échantillon, est donnée. Le résultat de la détermination est exprimé en protéine après multiplication de la teneur en azote totale par un coefficient approprié correspondant à la position du produit. La teneur en azote totale est déterminée par la formule suivante :

$$W_{pn} = \frac{1,4007 (V_s - V_b) Mr}{m} * 100$$

Où les variables de l'équation sont définies comme suit:

$W_{pn}$  : la teneur en azote protéique de l'échantillon pour l'essai, exprimée sous forme de pourcentage en masse ;

$V_s$  : volume d'acide sulfurique versé pour l'essai à blanc,

$V_b$  : volume d'acide versé pour l'échantillon,

$M_r$  : la valeur numérique de la molarité exacte de l'acide sulfuriques,

$m$  : masse de la prise d'essai de l'échantillon,

La teneur en protéines ( $M_p$ ) est déterminée par la formule suivante :

$$M_p (\%) = 6.25 * W_{pn}(\%)$$

$M_p$  : Teneur en protéine de la spiruline.

#### 2.3.4. La teneur en cendre

La teneur en cendre correspond conventionnellement à la masse du résidu d'incinération de la substance dans les conditions déterminées ci-après (**Pharmacopée européenne, 2007**).

##### ✓ Principe

La matière sèche a été incinérée à  $550 \text{ °C} \pm 25 \text{ °C}$  dans un lent courant d'air. Le résidu obtenu a été pesé.

##### ✓ Mode opératoire

Nous avons porté au four à moufle le creuset qui contient la prise d'essai d'environ 2g de l'échantillon. Nous avons assuré un chauffage progressif durant 1h30mn à 2h30mn à  $550 \text{ °C}$ , afin d'obtenir une carbonisation sans inflammation de la masse. L'incinération doit être poursuivie s'il y'a lieu, jusqu'à combustion complète du carbone formé (résidu blanc ou gris clair). Nous avons placé le creuset dans le dessiccateur et l'avons laissé refroidir à la température ambiante.

##### ❖ Expression des résultats

Les cendres de l'échantillon, exprimées en pourcentage massique, sont calculées selon la relation suivante :

$$c = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100.$$

Où les variables de l'équation sont définies comme suit :

C (%): Taux de cendre, exprimé en pourcentage (%).

$m_0$  : masse en gramme du creuset vide,

$m_2$  : masse, en gramme du creuset et son contenu (Cendre après incinération),

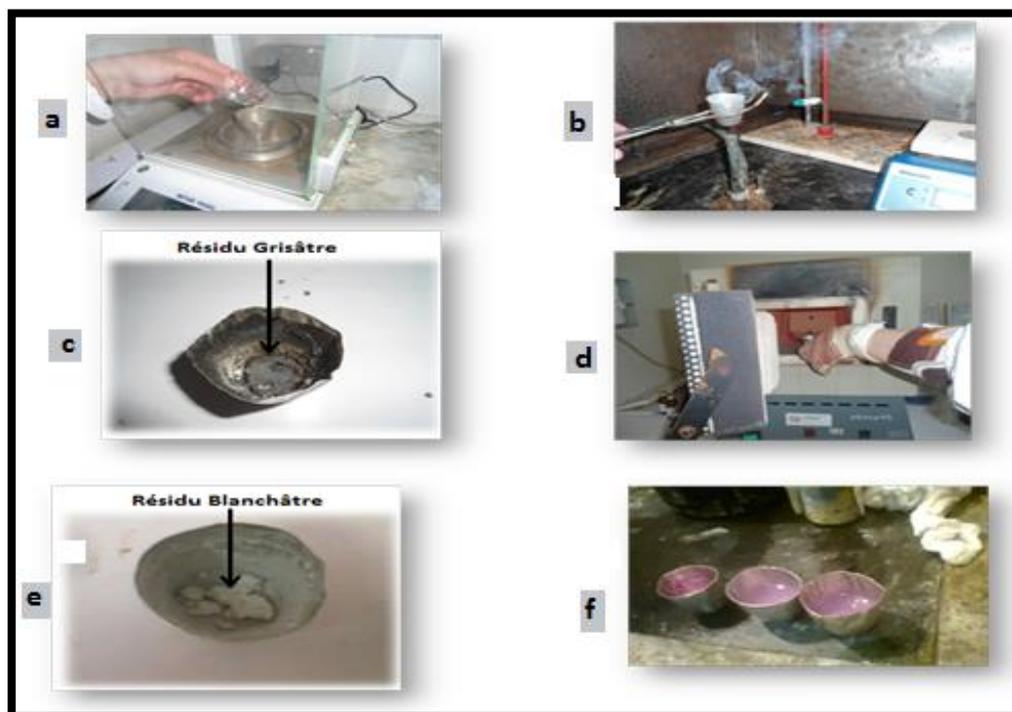
$m_1$  : masse en gramme du creuset de la prise d'essai.

### 2.3.5. Test de la présence ou absence des métaux lourds

#### ✓ Mode Opérateur

##### ❖ Solution à examiner

Dans un creuset en platine, nous avons introduit la prise d'essai prescrite (au maximum 2g de substance à examiner) (**Voir figure 20.a**) et 4 ml de la solution de sulfate de magnésium à 250 g/l dans l'acide sulfurique diluée (**Pharmacopée européenne, 2009**). Nous avons chauffé la prise d'essai progressivement jusqu'à carbonisation et obtention de cendres pratiquement grisâtres (**Voir figures 20.b et 20.c**). Ensuite, nous avons mis le creuset contenant les cendres grisâtres au niveau du four à moufle à une température de 800° C qui assure la calcination de l'échantillon à analyser (**voir figure 20.d et 20.e**). Nous avons repris le résidu à 2 reprises par 5 ml d'acide chlorhydrique dilué. Nous avons ajouté 0.1 ml de solution de phénolphtaléine, puis de l'ammoniaque concentrée jusqu'à coloration rose (voir figure 20.f). Nous avons refroidi et ajouté de l'acide acétique glacial jusqu'à décoloration. Un filtrage s'est avéré nécessaire. Finalement, nous avons complété l'ensemble à 20 ml avec de l'eau distillée



*Figure 20 : Etapes de la préparation de la solution à examiner.*

#### ❖ **Solution témoin**

Pour la préparation de la solution témoin, nous avons procédé de la même manière comme il a été décrit pour la solution à examiner, sauf que pour l'obtention de la solution témoin, nous avons utilisé 10 ppm de la solution de plomb au lieu de la substance à analyser. De plus, nous avons prélevé 10 ml des 20 ml obtenus et avons ajouté 2 ml de solution à examiner.

#### ❖ **Solution de contrôle**

De la même façon que pour la solution à examiner, nous avons préparé la solution de contrôle, sauf que pour la solution de contrôle, nous avons ajouté la substance à analyser et 10 ppm de la solution de plomb prescrite pour la solution témoin. De plus, nous avons prélevé 10 ml des 20 ml obtenus auxquels nous avons ajouté 2ml de la solution à analyser.

#### ❖ **Solution à blanc**

Nous avons ajouté 10 ml d'eau distillée à 2 ml de solution à examiner puis homogénéiser.

**Remarque :** A 12 ml de chaque solution, nous avons ajouté 2 ml de la solution tampon dont le pH est égale à 3.5 Nous avons ajouté par la suite 1.2 ml de réactif au thiocétamide puis, immédiatement après, nous avons mélangé. Après 2 minutes, les solutions ont été examinées.

#### ✓ **Expression des résultats**

L'essai n'est valable que si la solution témoin montre une légère coloration brune comparée à la solution à blanc et si la solution de contrôle est au moins aussi intense que la solution témoin.

### **2.3.6. Dosage colorimétrique de la phycocyanine**

#### ✓ **Principe**

La teneur en phycocyanine a été déterminée par spectrophotomètre en mesurant l'absorbance DO à 615 nm, puis DO à 652 nm (**Jourdan, 2006**)

#### ✓ **Mode opératoire**

Soit la concentration de spiruline sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %, 4 g de spiruline ont été trempés dans 100 ml d'eau distillée. Puis nous avons laissé décanter et avons prélevé la solution bleue, ensuite nous avons centrifugé la solution au niveau de la centrifugeuse (**Voir figure 21**). Nous avons prélevé la solution centrifugée (encore dite décantée), environ 0.5 à 1 ml. Nous avons dilué ce prélèvement d'un facteur de 100 environ avec de l'eau distillée. Soit DIL ce facteur de dilution en volume. Nous avons mesuré au spectrophotomètre, possédant une cuve à trajet optique 11 mm, la teneur de phycocyanine en se basant sur la densité optique (DO) à 615 nanomètres (nm) de longueur d'onde DO 615, et à 625nm de longueur d'onde DO 652 (**Voir figure 22**).



**Figure 21** : Photo d'une centrifugeuse de laboratoire.



**Figure 22** : Photo d'un spectrophotomètre.

### ✓ Expression des résultats

Le taux de phycocyanine (% en poids) est déterminé selon la formule suivante :

$$C_{ph} = 1.873 * (DO_{615} - 0.474 * DO_{652}) * \frac{DIL}{c}$$

C<sub>ph</sub> : concentration initiale en phycocyanine (%),

DIL : facteur de dilution,

C : la concentration de spiruline mise à tremper,

DO : Densité optique,

## 2.4. Obtention et caractérisation des gélules

### 2.4.1. Mise de la poudre de spiruline au niveau des gélules

Nous avons mis de la poudre de spiruline préalablement analysée au niveau des gélules. Le remplissage des gélules s'est fait de façon manuelle car la géluleuse était cassée. Nous avons mis environ 450 mg de poudre de spiruline dans des gélules vides à base de gélatine qui possède une longueur de 18 mm et cela en étant fermée (**Voir figure 23**). Les pesées

ont été faites avec précision tout en respectant les conditions d'hygiène et de sécurité ; en effet, le remplissage manuel s'est effectué sous la hotte.



*Figure 23: Gélules vides. Destinées à contenir de la poudre de spiruline.*

**Remarque :** 450 mg de poudre de spiruline représente le poids théorique.

## 2.4.2 .Quelques analyses physicochimiques des gélules obtenus

### 2.4.2.1. Détermination de l'uniformité de masse des gélules

#### ✓ Mode opératoire

Pour déterminer l'uniformité de masse des gélules, nous avons pesé individuellement 20 gélules (échantillon) pris au hasard. Puis, nous les avons ouvertes et ensuite vidées ; les enveloppes ont été pesées afin de déterminer le poids du contenu des gélules.

**Remarque :** La masse d'aucune unité ne peut s'écarter de plus du double de ces écarts limite (Voir tableau 5).

**Tableau 5 :** Tolérance de la Pharmacopée Européenne (2007) pour l'uniformité de masse.

<b>Ecarts limites acceptable</b>
<b>Si le poids <math>\leq 300\text{mg} \pm 10\%</math></b>

Si le poids  $\geq 300\text{mg} \pm 5\%$

#### 2.4.2.2. Détermination du temps de délitement des gélules

##### ✓ Mode opératoire

Le test de désagrégation des gélules permet de s'assurer, que leur vitesse de désagrégation ne constitue pas le facteur limitant de la dissolution du PA qu'ils contiennent. Pour la détermination du temps de désagrégation des gélules, nous avons utilisé un appareil de désagrégation. Nous avons introduit 6 gélules au niveau de l'appareil remplie préalablement avec de l'eau distillée et réglé à une température de 37° C (Voir figure 24).

Dès le dépôt des gélules à l'intérieur de l'appareil, le chronométrage a débuté. Nous avons noté la durée nécessaire pour le délitement total des gélules au niveau de l'eau distillée. (Pharmacopée européenne, 2007).

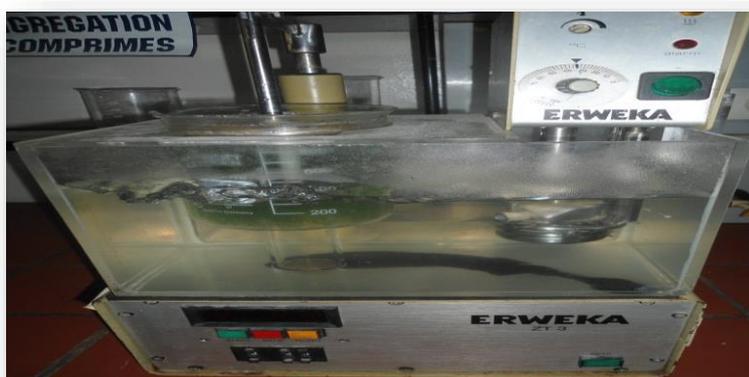


Figure 24: Appareil de délitement destiné à la désintégration.

#### 2.4.3. Détermination de la stabilité accélérée des gélules

L'essai de stabilité consiste à vérifier les caractéristiques qualitatives des gélules. Pour cette raison, l'étuvage a été réalisé au niveau du laboratoire de SAIDAL selon la pharmacopée européenne (Pharmacopée européenne, 2007). Nous avons incubé les gélules au niveau de l'étuve à une température de 22°C  $\pm$  3°C et 40 $\pm$ 2°C pendant une durée de 60 jours. Nous avons pesé les gélules avant et après l'étuvage afin de déterminer s'il existe une perte en masse. Par la suite, nous avons comparé l'aspect physique des gélules en termes de couleur et forme. Le temps de désintégration dans l'eau distillée à une température de 37°C a été déterminé.

#### 2.4.4. Détermination de la Stabilité microbiologique des gélules

L'analyse de stabilité microbiologique des gélules a été réalisée dans le but de chercher une éventuelle contamination par les microorganismes. Pour ce faire les gélules ont été stockées à température ambiante pendant une durée de 60 jours. Pour la recherche et le

dénombrement des levures et moisissures, et les germes pathogènes (Salmonelles, clostridium sulfitoréducteurs, coliformes fécaux), nous avons procédé de la même manière comme il est décrit dans la section 2.2, sauf que pour la préparation de la solution mère, nous avons pesé 10 g de produit fini et nous l'avons introduit dans 100ml d'eau physiologique. De plus, à partir de la solution mère nous avons pu préparer les dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  (**Pharmacopée européenne, 2007**).

## 2.5. Obtention et caractérisation physicochimique des comprimés

### 2.5.1. Formulation des comprimés à partir de la poudre de spiruline

Pour l'obtention des comprimés de la formulation  $F_1$  qui sont constitués de 100 % de spiruline, nous avons utilisé une comprimeuse semi automatique qui exerce une compression directe, nous nous sommes référés à l'étude menée par **Benahmed Djilali adiba (2012)**, qui consiste à appliquer des forces de compression variable et appropriées. Les comprimés de la formulation  $F_2$  ont été obtenus de la même manière citée précédemment, sauf que pour les obtenir nous avons ajouté à la poudre de spiruline des excipients.



*Figure 25 : Photo de la comprimeuse semi-automatique alternative.*

### 2.5.2. Quelques caractéristiques physico-chimiques des comprimés obtenus

La détermination des propriétés physico-chimiques des comprimés nous permet de savoir si le produit fini correspond à la norme indiquée par **la pharmacopée européenne (2007)** ces analyses correspondent à une détermination de la friabilité, la dureté, temps de désintégration des comprimés au niveau de l'eau distillée à  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

#### 2.5.2.1. La friabilité

Pour déterminer si les comprimés sont friables ou pas, nous avons pesé 20 comprimés dans une balance analytique ensuite, nous avons mis les comprimés préalablement pesés au niveau de l'appareil de friabilité pendant une durée de 4 minutes à une vitesse de 25 r.p.m (**Voir Figure 26**), nous avons répété encore une autre fois la pesée des comprimés.

La friabilité (taux d'effritement <1%) est exprimée par l'équation suivante :

$$F = \frac{P_0 - P_1}{P_0} * 100$$

F : La friabilité ou perte de masse %.

P<sub>0</sub> : Poids initiale des comprimés (g).

P<sub>1</sub> : Poids final des comprimés(g)



**Figure 26** : Photo d'un appareil de friabilité.

### 2.5.2.2. La dureté (Résistance à la rupture)

La dureté est une caractéristique mécanique des comprimés qui permet de s'assurer que les comprimés présentent une résistance mécanique suffisante pour ne pas se briser lors de leurs manipulations. Ce test consiste à évaluer la force nécessaire pour provoquer la rupture des comprimés par écrasement. Pour ce faire nous avons déterminé la dureté de 10 comprimés de la formulation F<sub>1</sub> et 10 comprimés de la formulation F<sub>2</sub> à l'aide d'un appareil de dureté (**Voir Figure 27**) (**Pharmacopée européenne, 2007**).



*Figure 27 : Photo d'un duromètre.*

### 2.5.2.3. Essai de délitement

#### ✓ Mode opératoire

Le test de désagrégation des comprimés permet de s'assurer, que leur vitesse de désagrégation ne constitue pas le facteur limitant de la dissolution du PA qu'ils contiennent.

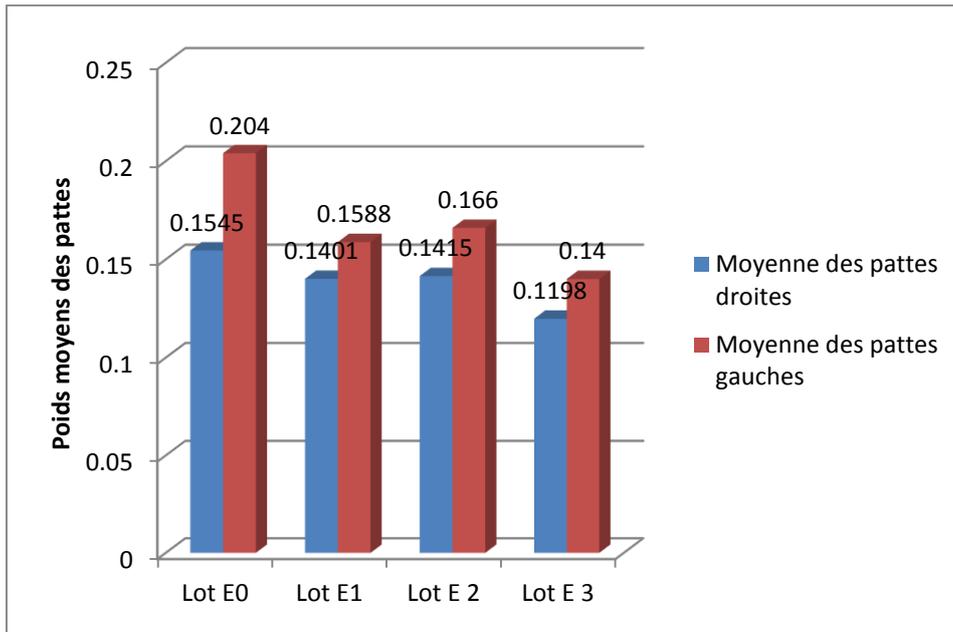
Pour la détermination du temps de désagrégation des comprimés, nous avons utilisé un appareil de désagrégation. Nous avons introduit 6 comprimés de la formulation  $F_1$  au niveau de l'appareil rempli préalablement avec de l'eau distillée et réglé à une température de  $37^\circ\text{C}$ . Nous avons procédé de la même manière pour les comprimés de la formulation  $F_2$ .

Dès le dépôt des comprimés à l'intérieur de l'appareil, le chronométrage a débuté. Nous avons noté la durée nécessaire pour le délitement total des comprimés au niveau de l'eau distillée. (**Pharmacopée européenne, 2007**).

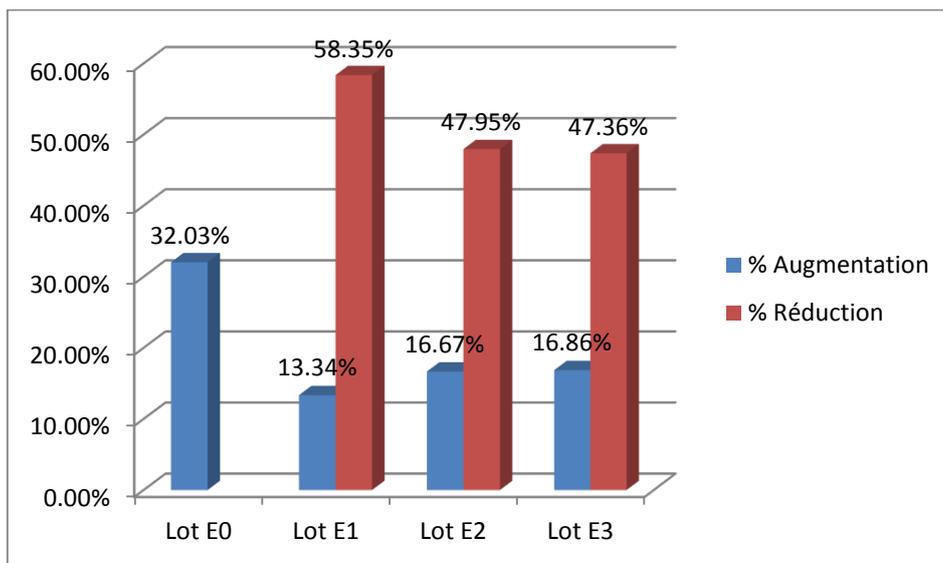
## 1. Résultats de l'évaluation des activités biologiques

### 1.1. Résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Suite aux expérimentations effectuées, nous avons traduit les résultats sous forme d'histogrammes donnés dans les figures 28 et 29.



**Figure 28:** Poids moyens des pattes droites et gauches des souris réparties en lots.



**Figure 29 :** Pourcentages d'augmentation et de réduction d'œdèmes des pattes des souris.

D'après l'histogramme de la figure 29 , nous constatons que contrairement aux autres lots, E0 (le premier lot) est caractérisé par une importante mesure du pourcentage d'œdème estimée à 32.03 %. En revanche, nous avons noté des augmentations peu significatives de l'œdème pour les lots **E1, E2 et E3**, correspondant respectivement à **13.34 % 16.67 %** et **16.86 %**. Il est à noter que, pour le lot témoin, nous avons observé une très légère diminution du poids moyen des pattes gauches. Cette diminution est due au processus de défense immunitaire naturelle. Pour les lots traités, un important

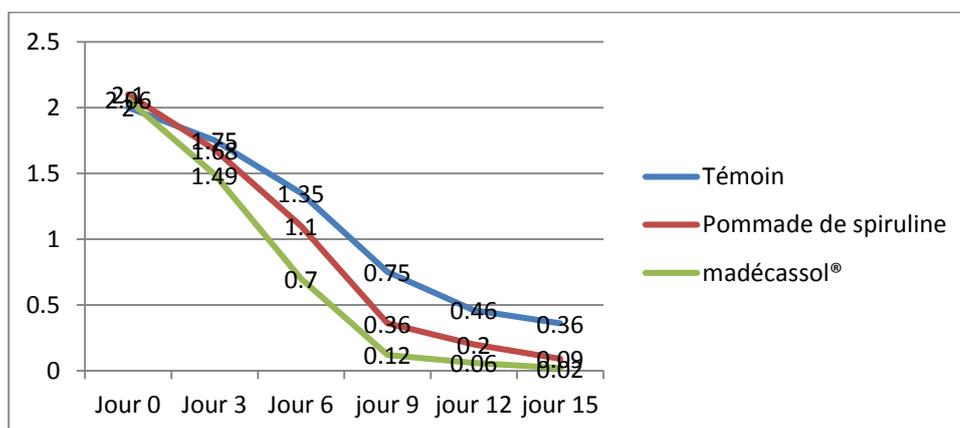
pourcentage de réduction de l'œdème des pattes gauches par rapport au témoin a été constaté. Les pourcentages de réduction des lots **E1**, **E2** et **E3** ont été respectivement évalués à 58.35% 47.95% et 47.36%. D'après ces pourcentages, nous pouvons déduire que l'infusé de spiruline a un effet anti-inflammatoire maximal pour le lot **E1**, c'est-à-dire pour la dose de 4 mg /kg. Cependant pour la dose de 2mg /kg, il présente un effet anti-inflammatoire inférieur au cas précédent mais avoisinant celui du Diclofenac<sup>®</sup>

les résultats sont en accord avec les études menées par **(Romay & al, 1998 )** qui ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de la phycocyanine. Celle-ci se trouve en abondance au niveau de la spiruline et a une action préventive car son administration est toujours réalisée avant l'induction de l'inflammation. De plus, l'action spécifique de la phycocyanine, sur les **COX-2**, donne l'avantage au pigment de la spiruline de traiter le mécanisme inflammatoire sans provoquer les effets secondaires apportés par les **AINS** courants.

Des recherches scientifiques ont mis en évidence la capacité des flavonoïdes présents dans les plantes à diminuer l'inflammation. La validité structurale des flavonoïdes amène à de multiples mécanismes d'actions. En limitant la réaction inflammatoire, les flavonoïdes agissent comme protecteur de la matrice dermique en inhibant l'activité de certaines enzymes **(Kim & al, 2004)**.

## 1.2. Résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante

Suite aux expérimentations effectuées, nous avons traduit les résultats sous forme de courbes donnés dans les figures 30.



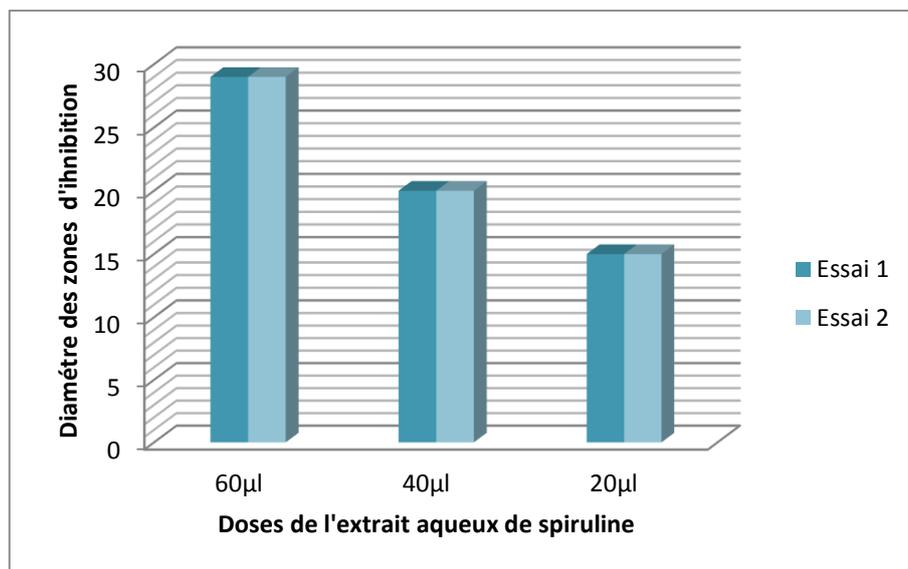
**Figure 30 : Réduction des surfaces des plaies**

Les courbes illustrées dans la figure 30 montrent qu'il existe une réduction de la surface initiale des plaies traitées par la pommade Madécassol<sup>®</sup> par rapport à celles non traitées ; ce résultat reste valable pour les plaies traitées par la pommade de spiruline. Les courbes indiquent que les surfaces *initiales* des plaies sont environ égales à 2 cm<sup>2</sup> (voir jour 0 pour les trois courbes). Les courbes donnent les surfaces des plaies, calculées tous les trois jours, c'est à dire à partir du jour 0 jusqu'au jour 15. Nous pouvons constater que la surface finale des plaies non traitées (Témoin) est supérieure à celle des plaies traitées par

les pommades de spiruline et par Madécassol<sup>®</sup>. En effet, la surface finale des plaies traitées par la pommade de spiruline est de 0,09 cm<sup>2</sup>. Elle est de 0,02 cm<sup>2</sup> pour les plaies traitées par le Madécassol<sup>®</sup> et de 0,36 cm<sup>2</sup> pour les plaies non traitées (témoin). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **(Gasparotto & al , 2012)** qui attestent que l'effet cicatrisant de certaines plantes peut être dû aux composés qu'elles renferment tels que les éléments nutritifs (minéraux, acides aminés et vitamines). En effet, ces composés activent le processus de cicatrisation Ils favorisent d'une part, l'hydratation et d'autre part, ils luttent contre les inflammations. Tandis que les tanins activent la multiplication et la régénération cellulaires, ceci contribue à augmenter la vitesse de cicatrisation **(Iserin, 2001)**.

### 1.3.Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique

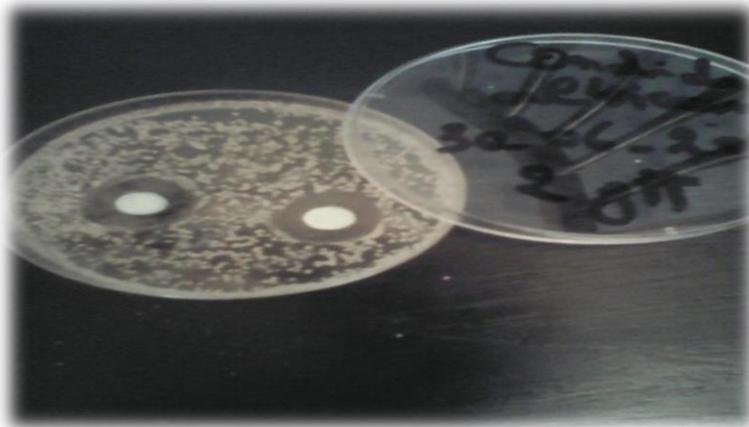
Les résultats des diamètres des zones d'inhibition du développement de la souche *Candida albicans* par l'extrait aqueux de poudre de spiruline sont regroupés dans l'histogramme de la figure 31 et illustrés par les figures 32, figures 33, figure 34



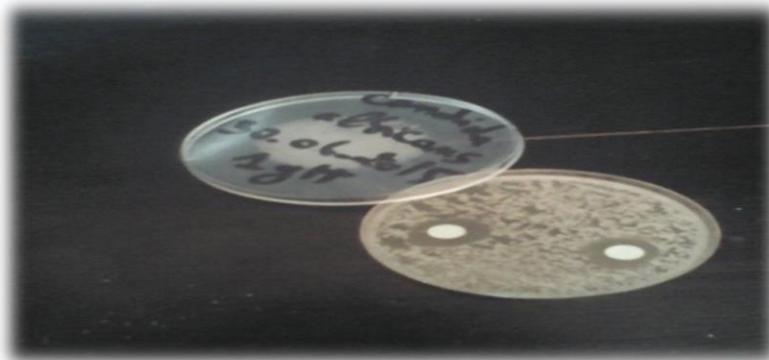
**Figure 31 :** Diamètres des zones d'inhibition du *Candida albicans* en fonction des différentes doses.



**Figure 32:** Effet inhibiteur d'une dose de 60 $\mu$ l d'extrait aqueux de spiruline sur le candida albicans.

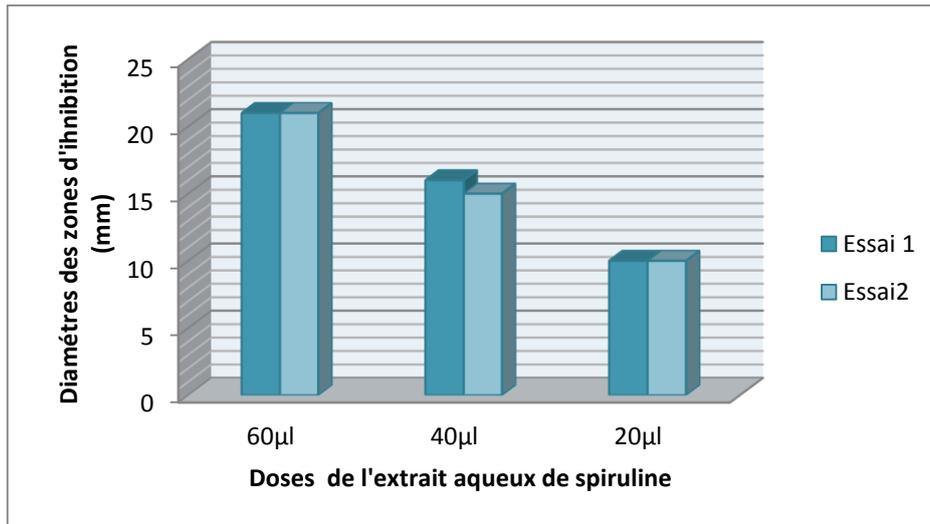


**Figure 33 :** Effet inhibiteur d'une dose de 40 $\mu$ l d'extrait aqueux de spiruline sur le candida Albicans.



**Figure 34 :** Effet inhibiteur d'une dose de 20  $\mu$ l d'extrait aqueux de spiruline sur le candida albicans.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition du développement de la souche Saccharomyces cerevisiae par l'extrait aqueux de poudre de spiruline sont regroupés dans l'histogramme de la figure 35 et illustrés par les figures 36 ,37 et 38



**Figure 35 :** Diamètres des zones d'inhibition du Sacharomycés Cerevisiae en fonction des différentes doses.



**Figure 36:** Effet inhibiteur d'une dose de 60µl d'extrait aqueux de spiruline sur le saccharomyces cerevisiae.



**Figure 37:** Effet inhibiteur d'une dose de 40µl d'extrait aqueux de spiruline sur le saccharomyces cerevisiae.



**Figure 38 :** Effet inhibiteur d'une dose de 20 µl d'extrait aqueux de spiruline sur le *Saccharomyces cerevisiae*.

Les résultats des tests de l'extrait aqueux à base de poudre de spiruline ont révélé une importante activité antimicrobienne qui est très fortement inhibitrice, en particulier sur le *Candida albicans*. En effet, pour une dose de 60 µl d'extrait aqueux, le diamètre d'inhibition est de 29 mm pour les deux essais que nous avons effectués, alors qu'il est de 20 mm lorsque la dose est de 40 µl. Le diamètre d'inhibition se réduit à 15 mm pour les deux essais, lorsque la dose est de 20 µl (**Voir diagramme 31**).

L'effet antifongique de l'extrait aqueux de spiruline sur les *Saccharomyces cerevisiae* est moins important que celui observé sur le *Candida*. De manière similaire que précédemment, pour une dose de 60 µl de l'extrait aqueux le diamètre d'inhibition est de 20 mm pour les deux essais effectués, alors qu'il est de 16 mm pour le premier et 15 mm pour le deuxième lorsque la dose est de 40 µl. Le diamètre se réduit à 10 mm pour les deux essais, lorsque la dose est de 20 µl (**Voir diagramme 35**).

Les résultats des tests de l'extrait aqueux à base de poudre de spiruline sont en accord avec plusieurs travaux de recherches réalisés avec l'extrait d'algue qui induit une inhibition de certains champignons tels que le *Candida albicans*. Une analyse chromatographique montre que l'extrait aqueux d'algue renferme des substances de nature terpéniques responsables de l'activité antifongiques. L'extrait renferme probablement un mélange de substances ayant un spectre d'activité très large et un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne des champignons.

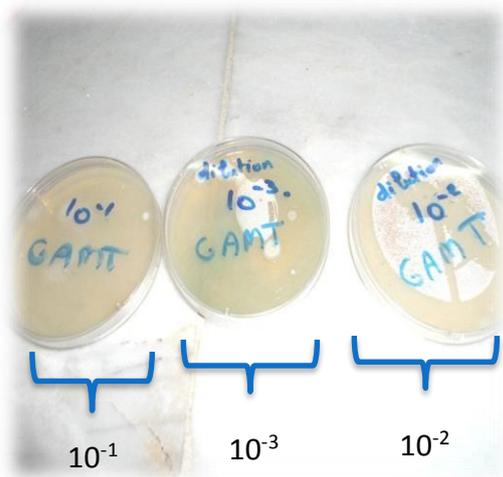
D'autres études ont montré que l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de spiruline, vis-à-vis des agents pathogènes, est liée à la composition des acides gras (**Santoyo & al, 2006**) et d'autres composés volatiles tels que les polyphénols (**Herrero & al, 2006**). Ces données montrent que la spiruline contient des principes actifs ayant une activité protectrice significative et qui pourraient donc être utilisés contre les germes d'altération et ceux qui sont responsables de certaines pathologies.

## 2. Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de spiruline

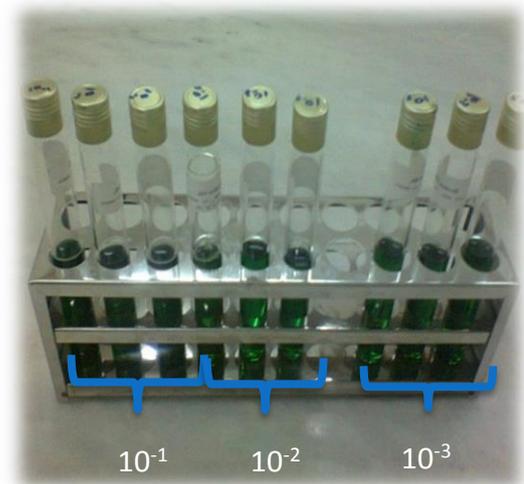
Le **Tableau 6** montre les résultats des analyses microbiologiques réalisées sur la poudre de spiruline. Ces résultats sont illustrés dans les figures 39 jusqu'à 44

**Tableau 6** : Résultats des analyses microbiologiques réalisées sur la poudre de spiruline.

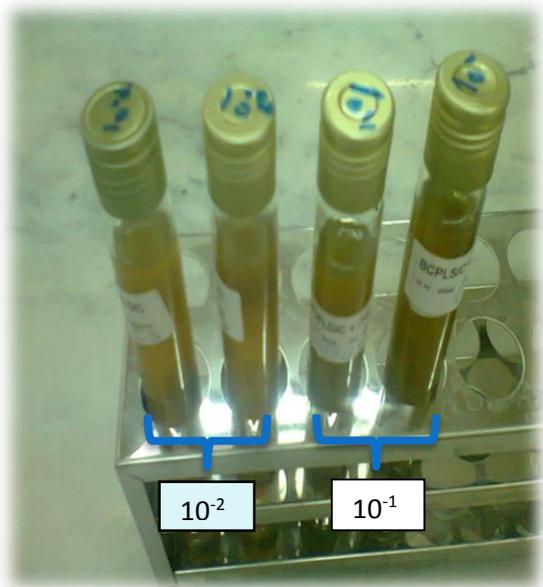
Germes	Germes dénombrés dans les différentes dilutions			Norme selon (JORA, 1998).
	Dilution $10^{-1}$	Dilution $10^{-2}$	Dilution $10^{-3}$	
<b>Germes aérobie 30°C</b>	0 germe.	0 germe.	0 germe.	$5 \cdot 10^4$
<b>Coliformes.</b>	Absence.	Absence.	Absence.	5.
<b>Staphylococcus aureus .</b>	Absence.	Absence.	Absence.	Absence.
<b>Clostridium sulfito réducteur à 46 °C.</b>	0 germe.	0 germe.		Absence.
<b>Levure et moisissure.</b>	0 germe.	0 germe.	0 germe.	50.
<b>Salmonella .</b>	Absence.	Absence.	Absence.	Absence.



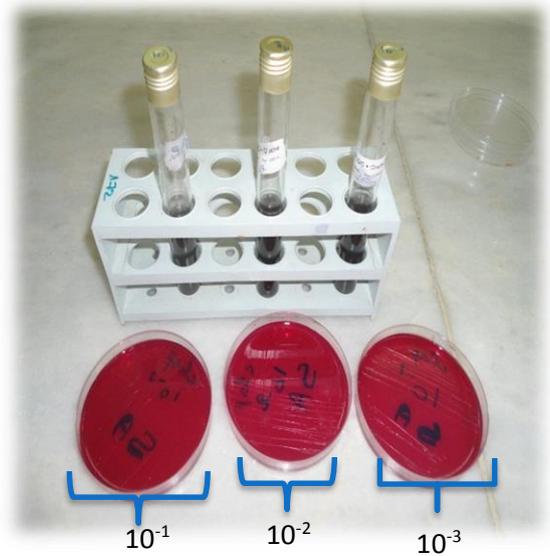
**Figure 39** : Résultats de la recherche des GAMT



**Figure 40** : Résultats de la recherche des coliformes



**Figure 41** : Résultats de la recherche du *Clostridium*.



**Figure 42** : Résultats de la recherche des *Staphylococcus aureus*.



**Figure 43** : Résultats de la recherche des *Salmonelles*.



**Figure 44** : Résultats de la recherche des levures et moisissures.

Les différentes analyses microbiologiques n'ont donné aucune présence de germe. Nous avons constaté zéro germe pour chacun des types suivants : aérobies mésophiles totaux, clostridium sulfito-réducteur à 46 ° C et levure-moisissure. Les normes des germes que nous venons de citer sont respectivement égales à  $5 \cdot 10^4$ , absence et 50 ; ces valeurs sont données par le **journal officiel(1998)**. Nous avons observé une absence pour chacun des types suivants : Coliformes, *Staphylococcus aureus* et salmonella. Chacun de ces derniers germes possède une norme bien précise dans le journal officiel : 5 pour le premier germe et *absence* pour les deux germes restants.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que la poudre de spiruline est caractérisée par une bonne qualité bactériologique et acceptable pour être à la base d'un complément

alimentaire. Ceci est dû au respect des conditions d'hygiène lors de la récolte et du séchage.

### 3. Résultats des analyses physicochimiques de la poudre de spiruline

#### 3.1. Le PH

La poudre analysée possède un pH légèrement inférieur à celui recommandé par les normes françaises. En fait, le pH est égal à 6.244 (**Voir figure 45**), il n'appartient pas à la plage de valeurs recommandées, c'est-à-dire entre 7 et 9. La diminution du pH est due aux conditions de séchage non appropriées. Par ailleurs, les cellules de la spiruline s'éclatent entraînant ainsi une diminution du pH, lorsqu'elle est séchée à une température assez élevée (60 à 65 ° C) et réhydratée. Il est à noter que le PH obtenu est d'autant plus bas que la spiruline est bien essorée avant le séchage. De plus, l'abaissement du pH peut être dû à des fermentations (**Jourdan ,2006**).



*Figure 45: pH de la poudre de spiruline analysée.*

#### 3.2. La teneur en eau

La spiruline possède une teneur en eau dans les normes. Par ailleurs, sa teneur est de 6.555 % et elle est conforme à la norme rapportée par **Jourdan (2006)**, c'est-à-dire inférieure à 9 %. Cela prouve que la spiruline a été entreposée dans de bonnes conditions et n'a pas été influencée par des facteurs extérieurs.

#### 3.3. La teneur en cendre

La teneur en cendre est de 9.35 %. Cette valeur est proche de celle rapportée par Jourdan qui stipule qu'une telle norme doit être inférieure à 10% (**Jourdan, 2006**). Ce pourcentage est certainement lié au pouvoir d'absorption des métaux par cette souche dans les milieux de culture utilisés (**Branger & al, 2003**).

### 3.4. La teneur en protéines

La spiruline analysée contient une teneur en protéines de l'ordre de 52 %. Il est à noter que la teneur en protéines de la spiruline oscille entre 50 et 70 % (Jourdan, 2006) de son poids sec. Donc notre spiruline est conforme aux normes ; toutefois, cette teneur s'avère inférieure à celle proposée par (Jourdan, 2006) qui est de 65 %. Cette variation du contenu en protéines dépend du moment de la récolte. En effet, les valeurs les plus fortes sont obtenues au début de la période lumineuse (Van Rijn & Shilo, 1986).

### 3.5. La teneur de phycocyanine

La phycocyanine de la poudre de spiruline admet une teneur de 1.55 g/100 g de MS. Ce résultat est en accord avec la littérature qui présume que la phycocyanine est un pigment abondant. Parfois, la phycocyanine est le seul pigment présent chez les algues bleues, avec une teneur pouvant varier selon les conditions de culture telles que : (1) l'intensité lumineuse à laquelle sont exposées les cellules de la spiruline. En effet, les algues cultivées sous la lumière peuvent ajuster leur composition pigmentaire. (2) Le taux d'azote du milieu de culture qui peut être considéré comme un facteur favorable pour que l'algue puisse produire une teneur importante en phycocyanine. En effet, une telle teneur augmente considérablement avec un taux d'azote élevé (Jahn & al, 1984).

### 3.6. Test des métaux lourds

D'après l'analyse effectuée sur la poudre de spiruline, nous avons remarqué que la solution témoin montre une légère coloration brune comparée à la solution à blanc. En revanche, la solution de contrôle est aussi intense que la solution témoin (voir figure 46). Nous pouvons souligner que la spiruline contient des métaux lourds grâce à sa capacité à absorber ces derniers qui se trouvent dans son environnement. Plusieurs études ont été effectuées sur la spiruline montrant que celle-ci peut être utilisée comme un agent bio-absorbant des métaux. La micro-algue photosynthétique possède des fonctions carboxyles sulfates et d'autres fonctions ionisables qui permettent la fixation ionique et chimique des molécules (cas de la plupart des oligoéléments et métaux essentiels) et des métaux toxiques tels que le plomb et le mercure. C'est la raison pour laquelle, il est important de réaliser un contrôle sur la teneur en métaux lourds de la spiruline destiné à être consommée par le consommateur (Mishima & al, 1998).



*Figure 46 : Test des métaux lourds.*

**Remarque :** Il faut observer avec précision les tubes contenant les solutions témoin, de contrôle, et à blanc pour bien différencier l'intensité de couleur.

#### 4. Caractéristiques physicochimiques et microbiologiques des gélules

##### 4.1 .Uniformité de masse

Le **tableau 7** montre les résultats du test de l'uniformité de masse des gélules à base de poudre de spiruline.

*Tableau 7: Résultats du test de l'uniformité de masse.*

Gélule	Poids des gélules remplis	Poids des gélules vides	Poids du contenu des gélules
Gélule (1)	549 mg	99mg	450mg
Gélule (2)	550mg	98 mg	452mg
Gélule (3)	548mg	99 mg	449 mg
Gélule (4)	551mg	99 mg	452mg
Gélule (5)	550mg	99 mg	451mg
Gélule (6)	552mg	98 mg	454mg
Gélule (7)	553mg	99 mg	454mg
Gélule (8)	550mg	99 mg	451mg
Gélule (9)	552mg	98 mg	454mg
Gélule (10)	554mg	99 mg	461mg
Gélule (11)	560mg	99 mg	455mg
Gélule (12)	552mg	99 mg	453mg
Gélule (13)	553mg	99 mg	454mg
Gélule (14)	556mg	99 mg	457mg
Gélule (15)	555mg	99 mg	456mg
Gélule (16)	558mg	99 mg	459mg
Gélule (17)	559mg	99 mg	460mg
Gélule (18)	562mg	99 mg	463mg
Gélule (19)	557mg	99 mg	458mg
Gélule (20)	554mg	98 mg	456mg
<b>Poids moyen du contenu des gélules</b>	<b>Ecart type des poids du contenu des gélules</b>		
<b>454.95</b>	<b>3.56</b>		

D'après les résultats obtenus et illustrés dans le tableau ci-dessus, nous pouvons constater que les gélules ont des poids uniformes. Effectivement, aucune unité ne s'est écartée plus de deux fois de ces écarts limites. D'après ces résultats, le poids du contenu de chaque gélule appartient à l'intervalle de validation [427.5 472.5] de ce fait le lot des gélules obtenues est acceptable.

#### 4.2. Désintégration des gélules

Le temps de désintégration des gélules au niveau de l'eau distillée est de 6 minutes. Ceci prouve que les gélules de spiruline ne se désintègrent pas rapidement dans la bouche. Le temps de délitement des gélules est conforme à la norme proposée par la pharmacopée européenne (2007), qui doit être inférieur à 30 minutes. Toutefois, il est supérieur à celui obtenu par **Benahmed Djilali adiba (2012)** qui est de 3 minutes.

#### 4.3. Stabilité accélérée des gélules

Le **tableau 8** montre les résultats du test de stabilité accéléré des gélules après deux mois d'incubation à des températures variables.

*Tableau 8: Résultats du test de stabilité accélérée des gélules*

Durée d'incubation	Deux mois d'incubation		Normes (PE, 2007)
	Température d'incubation °C		
	22±2	40±2	
Perte en masse des gélules ( $\Delta P\%$ )	0.0018	0.0011	<1%
Aspect des gélules	Gélules non déformante de couleur verte		Non déformante
Temps de délitement	6 min	5 min et 45s	<30min

Après deux mois d'incubation à des températures de 22°C ± 2 °C et 40°C ± 2 °C, les gélules ont gardé la même couleur verte, et n'ont subi aucune déformation. Le temps de délitement des gélules est conforme aux normes de **la pharmacopée européenne (2007)** et la perte en masse est inférieure à 1 %. Nous pouvons conclure que la formulation est stable.

#### 4.4. Stabilité microbiologique des gélules

Le **tableau 9** montre les résultats des analyses microbiologiques effectués sur le produit fini

*Tableau 9 : Résultats des analyses microbiologiques effectués sur le produit fini*

Germes	Germes dénombrés dans les différentes dilutions			Norme selon (PE, 2007)
	Dilution 10 <sup>-1</sup>	Dilution 10 <sup>-2</sup>	Dilution 10 <sup>-3</sup>	
Germes aérobie 30°C	0 germe.	0 germe.	0 germe.	<10 <sup>2</sup> UFC /g
Coliformes.	Absence.	Absence.	Absence.	Absence
Staphylococcus	Absence.	Absence.	Absence.	Absence

<b>aureus .</b>				
<b>Clostridium sulfito réducteur à 46 °C.</b>	0 germe.	0 germe.		Absence
<b>Levure et moisissure.</b>	0 germe.	0 germe.	0 germe.	<10 <sup>2</sup> UFC /g
<b>Salmonelles .</b>	Absence.	Absence.	Absence.	Absence

Les résultats de l'analyse microbiologique du produit fini indiquent qu'il existe une absence totale de germes pathogènes et d'altérations. Cette absence de la microflore nous informe que les manipulations ont été faites dans de bonnes conditions d'hygiène, en effet le complément alimentaire élaboré ne présente pas un danger pour le consommateur. Les gélules peuvent être conservées pendant une bonne durée puis qu'aucun germe n'a été détecté pendant une durée de deux mois.

## 5. Caractéristiques physicochimiques des comprimés

Les comprimés de la formulation F<sub>1</sub> obtenus possèdent une couleur foncée, leur surface est lisse et brillante (**Voir figure 47**), les comprimés de la formulation F<sub>2</sub> sont mouchetés leur surface est lisse et brillante (**Voir figure 48**). Le poids moyen est de 355 mg et le diamètre est de 10 mm.



**Figure 47** : Photo des comprimés de la formulation F<sub>1</sub>      **Figure 48** : Photo des comprimés de la formulation F<sub>2</sub>

### 5.1. Dureté des comprimés

Le **tableau 10** montre les résultats du test de dureté effectués sur les comprimés de la formulation F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>

**Tableau 10**: Résultats du test de dureté effectué sur le produit fini

	<b>Dureté des comprimés F<sub>1</sub></b>	<b>Dureté des comprimés F<sub>2</sub></b>
<b>Comprimé(1)</b>	15.3 N	39 N
<b>Comprimé (2)</b>	16,3 N	37 N

<b>Comprimé(3)</b>	15 .3 N	32.6 N
<b>Comprimé (4)</b>	15.4 N	34 .6 N
<b>Comprimé(5)</b>	15.6 N	36.8 N
<b>Comprimé(6)</b>	16.8 N	31.1 N
<b>Comprimé(7)</b>	12.3 N	35 N
<b>Comprimé(8)</b>	17.1 N	32.9 N
<b>Comprimé(9)</b>	17 .5 N	38 .9 N
<b>Comprimé(10)</b>	16.9 N	32 N
<b>Moyenne</b>	15.85 N	34.99 N
<b>Ecart type</b>	1.36	2.70

En se référant au tableau ci-dessus, on déduit que les comprimés de la formulation  $F_1$  qui ont une dureté moyenne de 15.85 N sont moins durs que les comprimés de la formulation  $F_2$  qui ont une dureté moyenne de 34.99 N, les deux moyennes sont inférieure à la dureté recommandée par la pharmacopée européenne, qui doit être au moins égale à 45 N. Ces faibles valeurs de la dureté représentent un inconvénient en termes de compactage et de transport du produit fini (Pasqualoto & al, 2007).

## 5.2. Friabilité des comprimés

Le **tableau 11** montre les différentes masses des 20 Cp de la formulation  $F_1$  et  $F_2$  avant et après le test de friabilité

**Tableau 11** : Masse totale des 20 Cp de la formulation  $F_1$  et de la formulation  $F_2$  avant et après le test de friabilité

Les types de Comprimés	Masse totale des 20 comprimés avant l'essai	Masse totale des 20 comprimés après l'essai
<b>Comprimés de la formulation <math>F_1</math></b>	6558 mg	6331.75
<b>Comprimés de la formulation <math>F_2</math></b>	6413 mg	6394mg

**Tableau 12** : Perte de masse des 20 Cp de la formulation  $F_1$  et de la formulation  $F_2$

	Perte de masse des 20Cp en milligramme	Perte de masse des 20 Cp en pourcentage de masse totale initiale	Norme pour la perte de masse de 20 Cp
<b>Comprimés de la formulation <math>F_1</math></b>	226.25 mg	3.45 %	$\leq 1\%$
<b>Comprimés de la formulation <math>F_2</math></b>	12.826mg	0.2 %	$\leq 1\%$

D'après le tableau ci-dessus, nous constatons que la friabilité des comprimés de la formulation F<sub>1</sub> est supérieure à 1% .ce résultat est en désaccord avec le résultat obtenu par Benahmed Djilali adiba (2012) qui a obtenu des comprimés possédant un pourcentage de friabilité inférieur à 1 %. Les comprimés de la formulation F<sub>2</sub> possèdent une friabilité inférieur à 1 % ce qui est conforme aux normes.

### **5.3.Désintégration des comprimés**

Le temps de désintégration des comprimés de la formulation **F1** immergés dans l'eau est de 29 min et 25 s, ce résultat est en discordance avec le résultat trouvé par certains chercheurs concernant des comprimés d'autres natures qui ont un temps de désintégration inférieur à 12 min à titre d'exemple les comprimés de Paracétamol® (**Lefevre & Dupas, 2003**).Le temps de délitement des comprimés de la formulation **F2** est de 10 min et 20 s, ce résultat est en concordance avec le résultat trouvé par certains auteurs au sujet des comprimés d'autres natures qui est de 6 à 12 min (Comprimés d'*ilicifolia* de *Maytenus*) (**Soares & al, 200**

## Annexe A

**Tableau 13 : Matériel non biologique utilisée durant toutes les expérimentations**

Appareils	Verrerie et accessoire	Réactifs et produit.
-Agitateur.	-Pipette pasteur.	-Acétate de plomb.
-Balance analytique.	-Matras.	-Acide chlorhydrique (HCL) concentré.
-Balance pour les animaux.	-Béchers (petits et grands).	-solution de sulfate de magnésium
- Bain marie.	-Bistouri.	-Kétamine.
-Bec-Benzen.	-Boîtes de pétrie.	-Solution de phosphate.
-Broyeur cuisine.	-Ciseaux.	-Acide Sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) concentré.
-Etuve.	-Coton.	-Acide borique augmentée d'indicateurs colorés, le rouge de méthyle et le vert de bromocérol.
-Haute pour solvants.	-Disques absorbants.	-Acétate d'éthyle.
-Plaque chauffante.	-Entonnoir en verre.	-Diclofénac.
-Spectrophotomètre UV.	-Eprouvette de 100ml.	-Eau de javel.
-Réfrigérateur	-Erlen Mayer.	-Eau distillée.
-Four à moufle.	-Fioles en verre.	-Eau physiologique 0,9%.
-Un Ph mètre	-Flacons en verre.	-Ether diéthylique.
-Dessiccateur.	-Gants à usage unique.	-Sabouraud (SAB).
-Centrifugeuse.	-Papier filtre.	-Suspension de carragénine 1%.
-Appareil de délitement.	-Papiers aluminium.	-Mueller-Hinton (M H).
-Duromètre	-Pince stérile.	-Tuine à 80%.
	-Pipettes graduées.	-Valser MAYER
	-Seringue de 2.5ml et de 1ml.	-Milieu de culture PCA.
	-Seringue d'insuline.	-Milieu de culture VBL.
	-Sonde gastrique pour gavage.	-Milieu de culture Gioliti contoni.
	-Tubes à essais.	-Tellurite de potassium.
	-Bec benzen.	-Gélose chapman.
	-Creuset en platine..	-Milieu Hektoen.
	-Burette	-Milieu de culture rappaport vassiladis.
		-Milieu de culture sélinite de cystéine
		-Milieu OGA
		-Gélose viande foie.
		-Solution de phénolphtaléine.
		-Amoniaque concentré.
		-Acide acétique.
		- Solution de plomb.

## Annexe B

**Tableau 14** : Evaluation du poids moyen des pattes postérieures des souris ainsi que le pourcentage

	(Lot E0)		(Lot E1)		(Lot E2)		(Lot E3)	
	Patte droite	Patte gauche						
Xi	0.144	0.185	0.129	0.174	0.131	0.157	0.116	0.127
	0.155	0.193	0.150	0.160	0.153	0.178	0.138	0.139
	0.162	0.220	0.146	0.147	0.148	0.175	0.140	0.135
	0.146	0.179	0.158	0.166	0.159	0.169	0.115	0.168
	0.162	0.247	0.138	0.159	0.136	0.168	0.123	0.123
	0.158	0.20	0.120	0.147	0.122	0.144	0.113	0.148
$\bar{X}_i$	0.1545	0.204	0.1401	0.1588	0.1415	0.164	0.1198	0.14
$\bar{X}$	0.1792		0.14945		0.15275		0.1299	
$\sigma$	0.00715	0.02319	0.01281	0.00968	0.01291	0.01159	0.008744	0.01489

### A.1 Lois et formules utilisées

Pour faire l'étude statistique, nous avons utilisé les formules suivantes :

- ✓ **Intervalle de confiance (IC) pour le poids moyen des pattes postérieures des souris :**

IC à 99%  $\rightarrow t=2,58$  ( $\alpha=1\%$ ).

$$\text{Var} = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

- ✓ **Etude comparative entre les résultats des pattes des différents lots étudiés :**

Les résultats de l'analyse de la variance au risque :

SCEf : Somme des carrés des écarts factoriels (intergroupes).

$$\text{SCEf} = \sum n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$$

Où  $\bar{X}_i$  : La moyenne des pattes gauches ou droites.

$\bar{X}$  : La moyenne des moyennes des pattes gauches et droites.

On déduit la variance factorielle

$$\text{Var } f = \frac{SCEr}{ddl} \text{ tel que } ddl = k-1 \rightarrow \text{Var } f = \frac{SCEf}{k-1}$$
 SCEr : Somme des carrés des écarts résiduels  

$$SCEr = \sum (Xi - \bar{x}i)^2$$
 On déduit la variance résiduelle  

$$\text{Var } r = \frac{SCEr}{ddl} \text{ tel que } ddl = N-K \rightarrow \text{Var } r = \frac{SCEr}{N-k}$$

## A.2 .Application numérique

### ✓ Lot E0

*Hypothèse H<sub>0</sub>* : on admet que H<sub>0</sub> ( la carraghénine ) n'a aucun effet inflammatoire et que F calculé = F théorique.

- La somme des carrés des écarts résiduels :

$$SCEr = 0.000011025 + 0,00000025 + 0,00005625 + 0,00007225 + 0,00005625 + 0,00001225 + 0,000361 + 0,000121 + 0,000256 + 0,000625 + 0,001849 + 0,000016$$

$$SCEr = 0.00353555$$

- La variance résiduelle :

$$\text{Var } r = e^x = \frac{0.00353555}{10} \text{ tel que } ddl = 12-2 \rightarrow \text{Var } r = 0.000353555$$

- La variance factorielle :

$$SCEF = 6(0.1545 - 0.1792)^2 + 6(0.204 - 0.1792)^2$$

$$SCEF = 0.00735078.$$

$$\text{Var } f = \frac{0.00735078}{1} \text{ tel que } ddl = 2-1$$

$$F_{cal} = \frac{0.00735078}{0.000353555} = 21.002.$$

**Tableau 15** : Résultats de l'analyse de la variance pour le **lot E0** au risque  $\alpha = 5\%$ .

	Somme des carrés des écarts	ddl	F calculé	F théorique
<b>Inter groupe (factoriel)</b>	0.00735078	1	21.002	4.96
<b>Intra groupe (résiduelle)</b>	0.00035	10		

*Conclusion* : On a F calculé  $\geq$  F théorique donc l'hypothèse H<sub>0</sub> est rejetée.

Ce résultat fait ressortir une différence significative entre les poids moyens des pattes gauches et les pattes droites du lot témoin. Ce qui veut dire que l'hypothèse nulle est rejetée. Donc la carraghénine *provoque une inflammation.*

✓ **Lot E3**

*Hypothèse H<sub>1</sub>* : On admet que le Diclofenac® n'inhibe pas l'inflammation causée par la carraghénine et que Fcalculé = Fthéorique.

- La somme des carrés des écarts factoriels :

$$SCEf = 6(0.11198 - 0.1299)^2 + 6(0.14 - 0.1299)^2$$

$$SCEf = 0.00061206 + 0.00061206$$

$$SCEt = 0.00122412.$$

$$\text{Var } f = \frac{0.00122412}{1} \text{ tel que ddl} = 2 - 1$$

- La somme des carrés des écarts résiduels :

$$SCEr = 0,000014444 + 0,00003364 + 0,00033124 + 0,00002304 + 0,00001024 + 0,00004624 + 0,000169 + 0,000001 + 0,0000251 + 0,000784 + 0,000289 + 0,000064$$

$$SCEr = 0.00179084 .$$

$$\text{Var}_R = \frac{0.00179084}{10} = 0.000179084 \text{ tel que ddl} = 12 - 2.$$

$$F \text{ cal} = \frac{0.00122412}{0.000179084} \quad F \text{ calculé} = 0.00070.00013 = 5.3846$$

**Tableau 16:** Résultats de l'analyse de la variance pour le lot E3 au risque  $\alpha = 5\%$ .

	Sommes des carrés des écarts	ddl	F calculé	Fthéorique
<b>Intergroupe factorielle</b>	0.00122412	1	6.835	4.96
<b>Intragroupe résiduelle</b>	0.000179084	10		

*Conclusion* : d'après les résultats obtenus et résumés dans le tableau ci-dessus, on constate que Fcalculé > Fthéorique. Il s'ensuit que l'hypothèse H<sub>1</sub> est rejetée ; donc le Diclofenac ® possède un effet anti-inflammatoire.

✓ **Lot E1**

*Hypothèse H<sub>2</sub>* : On admet que l'infusé de spiruline n'inhibe pas l'inflammation à une dose 4mg/kg et que Fcalculé = Fthéorique.

- Somme des carrés des écarts factoriels :

$$SCEf = 6(0.1401 - 0.10.14945)^2 + 6(0.0.1588 - 0.14945)^2$$

$$= 0,000524535 + 0,000524535$$

$$= 0.00104907.$$

$$\text{Var } f = \frac{0.00104907}{1} = 0.00104907 \text{ tel que ddl} = 2 - 1$$

- Somme des carrés des écarts résiduels :

$$SCEr=0.00012321+0.00009801+0.00003481+0.00032041+0.00000441+0.00023104+0.0000144+0.00013924+0.00005184+0.00013924= 0.0015477$$

$$VARr=\frac{0.0015477}{10}=0.00015477. \text{ tel que ddl}=12-2$$

$$SCEf=6(0.1401-0.14945)^2+6(0.1588-0.14945)^2$$

$$SCEf=0.00104907.$$

$$Varf=\frac{0.00104907}{1}=0.00104907 \text{ tel que ddl } =2-1.$$

$$F_{calculé}=\frac{0.00104907}{0.00015477}=6.778.$$

**Tableau 17:** Résultats de l'analyse de la variance pour le **Lot E1** au risque  $\alpha = 5\%$ .

	Somme des carrés	ddl	F calculé	F théorique
<b>Intergroupe factoriel</b>	0.00104907	1	6.778	4.96
<b>Intergroupe résiduel</b>	0.00015477	10		

*Conclusion :* On a  $F_{calculé} \geq F_{théorique}$  donc l'hypothèse  $H_2$  est rejetée. C'est la raison pour laquelle l'infusé de spiruline possède un effet anti-inflammatoire à la dose de 4 mg/kg.

### ✓ Lot E2

*Hypothèse  $H_3$  :* On admet que que l'extrait de spiruline n'inhibe pas l'inflammation causée par la carraghénine à une dose de 2 mg /kg, et que  $F_{calculé} = F_{théorique}$ .

- Somme des carrés des écarts factoriels :

$$SCEf =6(0.1415-0.15275)^2+6(0.164-0.15275)^2.$$

$$SCEf =0,000759375+0,0000759375.$$

$$SCEf =0.00151875$$

$$VARf =\frac{0.00151875}{1}=0.00151875 \text{ tel que ddl } =2-1$$

- Somme des carrés résiduels :

$$SCEr=0.00011025+0.00013225+0.00004225+0.00030625+0.00003025+0.00038025+0.000049+0.000196+0.000121+0.000025+0.000016+0.0004 .$$

$$SCEr=0.0018085.$$

$$VAEr =\frac{0.0018085}{10}= 0.00018085.$$

$$F_{calculé} \frac{0.00151875}{0.0018085}= 8.3978.$$

**Tableau 18:** résultats de l'analyse de la variance pour le **Lot E2** au risque  $\alpha = 5\%$ .

	Somme des carrés des écarts	Ddl	Fcalculé	F théorique
<b>Intergroupe factoriel</b>	0.00151875	1	8.3978	4.96
<b>Intergroupe résiduel</b>	0.0018085	10		

*Conclusion :* L'hypothèse  $H_3$  est rejetée, donc la spiruline à une dose de 2mg/kg possède un effet anti-inflammatoire.

### A.3 Etude comparative entre les pattes gauches du Lot E2 et Lot E1

Une étude comparative entre les résultats des pattes gauches du **Lot E2** et les pattes du **Lot E1** est faite. Cette comparaison permet de déduire que l'extrait étudié a des effets comparables à celui du médicament utilisé comme référence Diclofenac®. On a utilisé la méthode de l'analyse de la variance au risque  $\alpha=5\%$ .

*Hypothèse  $H_0$  :* On admet qu'il n'existe pas une différence significative entre l'extrait aqueux de spiruline et le diclofenac®.

- Somme des carrés des écarts factoriels :

$$\begin{aligned} SCEf &= 6(0,140-0,152)^2 + 6(0,164- 0,152)^2 \\ SCEf &= 0,000864+ 0,000864 \\ SCEf &= 0.001728 \end{aligned}$$

$$VARf = \frac{0.001728}{1} \text{ tel que ddl } 2-1$$

$$VARf = 0.001728 .$$

- Somme des carrés des écarts résiduel :

$$SCEr = 0.000169 + 0.000001 + 0.000025 + 0.000784 + 0.000289 + 0.000064 + 0.000049 + 0.000196 + 0.000121 + 0.000025 + 0.000016 + 0.0004$$

$$SCEr = 0.0002139$$

$$VARr = \frac{0.0002139}{10} \text{ tel que } 12-2 \longrightarrow 0.00002139.$$

$$F \text{ calculé } = \frac{VARf}{VARr}$$

$$F_{\text{calculé}} = \frac{0.001728}{0.00002139}$$

$$F_{\text{calculé}} = 8.078.$$

**Tableau 19:** Résultats de l'analyse de la variance pour le **Lot E2** et le **Lot E3** au risque  $\alpha = 5\%$ .

	Somme des carrés des écarts	ddl	Fcalculé	Fthorique
<b>Intergroupe (factoriel)</b>	0.001728	1	8.078	4.96
<b>Intragroupe résiduel</b>	0.00002139	10		

**Conclusion :** D'après le tableau, on constate que  $F_{\text{calculé}} > F_{\text{thorique}}$ , donc l'hypothèse  $H_0$  est rejetée. Il existe une différence significative entre l'infusé de spiruline à une dose de 2 mg /kg et le Diclofenac®

#### A.4 Etude comparative entre le Lot E1 et Lot E3

Nous avons fait une étude comparative entre les résultats des pattes gauches du **Lot E1** et les résultats des pattes gauches du **Lots E3**

Cette comparaison permet de déduire que l'infusé étudié a des effets comparables à celui du médicament utilisé comme référence Diclofenac®, on utilise la méthode de l'analyse de la variance au risque  $\alpha = 5\%$ .

**Hypothèse  $H_0$  :** On admet qu'il n'existe pas une différence significative entre l'extrait aqueux de spiruline à une dose de 4mg/kg et le Diclofenac .

- Somme des carrés des écarts factoriels :

$$SCEf = 6(0,140-0,1494)^2 + 6(0,1588- 0,1494)^2$$

$$SCEf= 0.00053016+ 0.00053016$$

$$SCEF= 0.00106032$$

$$VARf= \frac{0.00106032}{1} \text{ tel que ddl } 2-1 \text{ VARf}=0.00106032$$

- Somme des carrés des écarts résiduel :

$$SCEr=0.000169+0.000001+0.000025+0.000784+0.000289+0.000064+0.00023104+0.0000144+0.00013924+0.00005184+0.00000004+0.00013924.$$

$$SCEr=0.0018085$$

$$VA_{Er} = \frac{0.0018085}{10} = 0.00018085$$

$$F \text{ calculé} = \frac{0.00106032}{0.00018085} = 5.5958$$

**Remarque :** F théorique est déterminé à partir de la table de Fisher Snedecor pour un risque  $\alpha = 5\%$  et un ddl1 = K-1 (numérateur) et ddl2 = N-k (dénominateur) donc F théorique = 4,96.

**Tableau 20 :** Les résultats de l'analyse de la variance pour le **Lot E1** et le **Lot E3** au risque  $\alpha = 5\%$ .

	Somme des carrés des écarts	Ddl	Fcalculé	Fthéorique
<b>Intergroupe factoriel</b>	0.00106032	1	5.5958	4.96
<b>Intergroupe résiduel</b>	0.000189484	10		

**Conclusion :** On a F calculé > F théorique donc l'hypothèse  $H_0$  est rejetée. On peut conclure qu'il existe une différence significative entre l'infusé de spiruline à une dose de 4mg/kg et le produit de référence diclofenac®

## Références bibliographiques

-**Achard M.A.**(1994).« *Etude et modélisation du transfert de CO2 dans les photobioréacteurs. Application à l'étude de la limitation par la source de carbone chez S. platensis*».D.E.A. Université Blaise Pascal, Laboratoire de Génie Chimique Biologique.

-**Antenna Technologies France.** « *La culture de spiruline en images* ». <http://www.antennafrance.org/95931.html>, page consultée le 19 Mars 2015.

-**Avino P., Carconi P.L., Lepore L., Moauro A.** (2000). « *Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES* », Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry; vol 244 (1) : p. 247-252.

-**Ayala F.A. et Benavente R.B.** « *An improved cheap culture medium for the blue-green microalga Spirulina* ». (1982). European Journal of Appl. Microbiology and Biotechnology ; vol 15 : p. 198-199.

-**Babadzhanov A.S., Abdusamatova N., Yusupova F.M., Faizullaeva N., Mezhlumyan L.G. and Malikova M.Kh.** (2004).« *Chemical composition of Spirulina platensis cultivated in Uzbekistan* » .Journal of Chemistry of Natural Compounds ; vol 40 (3) : p. 276-279.

-**Barnes Peter J.** (1998 ).« *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms* », Clinical Science : p. 557-572.

-**Belay A.,** (2002). « *The potentiel application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management* », The Journal of the American Nutraceutical . vol 5 (2) : p. 26-49.

-**Benahmed-Djilali A. (2012).** Analyse des aptitudes technologiques de poudres de dattes (*Phoenix dactylifera. L*) améliorées par la spiruline. Etudes des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes. Docteur d'état en Génie des procédés, Université M'HAMED BOUGARA, Boumerdes, Algérie.

-**Benamouzig R.** « *Connaître la place actuelle des AINS dans la prévention du cancer Colorectal* ». [www.fmcgastro.org/default.aspx?page=166](http://www.fmcgastro.org/default.aspx?page=166), page consultée le 23 juin 2015.

-**Benedict., S. and Colagreco J.** (1994).« *Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS* » .Cancer Nurs . vol 17 : p. 411-417.

-**Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL** **GenBank.**(2002).« *Nucleic acid research* ».vol 28 (1) : p. 15-18.

-**Berkan T., Ostunes I., Lermioglu F. et Ozer A.** « *Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of Neute, planta medica* ». (1991). vol 57 : p. 34-37.

**-Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M.** (2001). «*The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*». In: Boone D.R & Castenholz R.W. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer-Verlag .1.

**-BOURGEOIS, C .M. ; LEVEAU J. Y.**(1991). « *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*». Contrôle microbiologique.Tome3, Paris, Technique et documentation. Lavoisier : p. 331.

**Branger,B . ,Cadudal,J.L ,DelabelM .ouaba.H. ,Yameago,P. ,Ouedrago,D. ,Guerin,D.,A. ,les personnels des CREN,zombre,C .,Ancel,P.**(2003).«*la spiruline comme complément alimentaire dans la malnutrition du nourrisson au burkina-faso* » . Archives de pédiatrie ,vol 10 : p .424-431.

**-Campanella L., Crescentini G. and Avino P.** (1999). «*Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on Spirulina*». *Analisis.*; vol 27 : p. 533-540.

**-Chapman, HR. And Shark, M.E.**(1981). «*Microbiology of cheese. In : Dairy Microbiology ,Robinson R.F Eds ; The microbiology of milk products*», Applied Sciences Publishers LTD, London : P. 157-243

**-Chao S-C. , Young D .G. , Oberg .** (2000). « *screening for inhibitory activity of Essential oils on selected Bacteria* », *Fungi and viruses J.Essent.OIL Res* 12 : p.639-649 .

**-Charpy L.** (2002) « *Compte rendu du mini colloque sur la production de spiruline artisanale* ». Colloque : p. 1-7.

**-Chen ,T. ,and wong ,Y.S . ,** (2008). « *Invitro antioxydant and antiproliferative activities of selenium containing phycocyanin from selenium Enriched Spiruline platensis*» *Journal Agric Food Chemistry* ». ,Vol 56 , (12) : p. 4352-4358

**-Chu, W. S., Magee, B. B. and Magee, P. T.**(1993). « *Construction of an Sfil macrorestriction map of the Candida albicans genome*». *Journal of Bacteriol.* vol 175 : p.6637-6651.

**-Clement G . ,** « *Production et constituant caractéristiques des algues Spirulina maxima et platensis*» .1975. *Ann.Nutr.Alimen* .vol 29 (6) : p. 477 -487

**-Degbey H. , Hamadou B. , Oumarou H.**(2006).« *Evaluation de l'efficacité de la supplémentation en spiruline du régime habituel des enfants atteint de malnutrition sévère* ». Ed. International Symposium on cyanobacteria for Health, Science and développement.

**-Falson-Rieg F., Pirot F.**(2004). « *Nouvelles formes médicamenteuses*», p .259 -260.

**-Falquet J.,Hurni JP.**(2006) . «*spiruline aspect nutritionnelle*». Antenna technologie ,Genève : p .3.

- Fox R.D.** (1999).« *Spiruline, Technique pratique et promesse*». Aix en provence: Edisud.
- Gasparotto, E., Pentecouteau, L., Morvan, P.Y. et Vallee, R.**( 2012). «*Development of Two Purified Marine Exopolysaccharides for Cosmetic Applications*». Proceedings of polymerix, : p. 173-186.
- Gershwin ME .,Belay A** .(2009). « *Spiruline in Human Nutrition and health*» Journal of applied phycology ,vol 21 (6) : p .747-748 .
- GODON B., LOISEL W.** (1984). Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M** (1996). « *Life with 6000 genes*».Journal of Science, vol **274** : P.563-547.
- Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T. G. and Vilgalys, R.,** .(1996). « *Molecular markers reveal that population structure of the human pathogenCandida albicans exhibits both clonality and recombination*». Proc Natl Acad Sci U S A. Vol 93 : p. 12473-12477.
- Hayashi T AND Hayashi K.**(1996).«*Calcium spirulan ,and Inhibitor of Enveloped virus replication from a blue –Green Alga Spirulina platensis* » Journal of Natural products .vol 59 (1) p. 83-90
- Herrero, M., Cifuentes, A. , Ibanez,E. .** . «*Sub-and supescitisa fluid extraction of functional . ingredients différents naturel source plantes, food by products algue and microalgue*». 2006 .A Review.Food.Chemistry. vol 98 (2) : p. 136-148.
- Hirahashi T., Matsumoto M., Hazeki K., Saeki Y., Ui M., Seya T.** (2002). « *Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water* ».International Immunopharmacology;
- Hirata T, Tanaka M, Ooike M, Tsunomura T, Sakaguchi M** .(2000). « *Activité antioxydantes de la phycocyanine préparée à partir de Spirulina platensis* » Journal of applied phycology : p. 435-439.
- Iserin P. (2001)**. « *Encyclopédie des plantes médicinales. Edition. Larousse* », Hong Kong, Paris. (2) : p. 423-434.

