

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة البليدة 1
Université de BLIDA 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا السكان والمنظمات
Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de Master

Option : Phytothérapie et Santé

Evaluation de l'activités antimicrobienne et hypocholestérolémiant de la spiruline (Arthrospira Platensis)

Présenté par

CHINE Yasmine

KOUICI Meriem

Devant le jury composé de :

- | | | | |
|----------------|-----|-----|------------|
| - GUEDIOURA A. | MAA | UB1 | Président |
| - BRADEA M.S. | MCA | UB1 | Examineur |
| - CHERIF H.S. | MCB | UB1 | Promotrice |

Année Universitaire 2016-2017

Résumé

L'objectif de la présente étude est l'évaluation de l'activité antimicrobienne et hypocholestérolémiant d'une cyanobactérie « *Arthrospira Platensis* » (Spiruline); Pour cela, nous avons procédé à un essai de culture artisanale de la spiruline dans un milieu de culture appelé « milieu de Hiri », en respectant les conditions de culture (pH alcalin, température assez élevée, un bon éclairage, agitation, un bon séchage, broyage, conditionnement), un contrôle microbiologique et un screening phytochimique de la cyanobactérie. La culture artisanale de la spiruline, nous ont donné une quantité de 100 g de spiruline en poudre. Les analyses microbiologiques de la poudre de spiruline nous ont donné des résultats négatifs avec les *germes totaux*, *Coliformes totaux*, *Coliformes fécaux*, *Clostridium Sulfatoreducteurs*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonelle* et *levures et moisissures*.

Le screening phytochimique des extraits aqueux et méthanoliques de la spiruline a révélé la présence des : tanins, flavonoïdes, saponosides, stéroïdes, alcaloïdes pour les deux extraits et des protéines pour l'extrait pour l'extrait méthanolique. Et l'absence des : anthraquinones, anthocyanes, coumarines, des sucres réducteurs dans les deux extraits et les protéines dans l'extrait aqueux.

Le pouvoir antimicrobien de l'*Arthrospira Platensis*, a été testé sur huit bactéries (*Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, et la *Escherichia coli*) et trois champignons (*saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*).

Les résultats obtenus ont donné un effet antimicrobien de l'extrait aqueux à 2% avec le *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et la *Serratia marcescens* avec des zones d'inhibition de respectivement (19, 19, 20, 27, 11 et 25 mm); Et de l'extrait aqueux à 8% avec la *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 14 mm. Et aucun effet antimicrobien de l'extrait méthanolique. L'activité hypocholestérolémiant a été testé sur quinze lapins âgés de huit mois, par l'administration de la poudre de spiruline dans leurs alimentation, et le suivi de leurs de taux de cholestérol dans le sang. Pour cela nous avons choisi d'appliquer le test de Mann-Whitney afin de déterminer le taux de réussite de cette expérience; Ainsi nous avons obtenu les résultats suivants : le taux de cholestérol est stable chez le lot 1 témoin et le lot 3 ayant pris les jaunes d'œufs plus la spiruline avec leur alimentation; et nous retrouvons un taux élevé chez le lot 2 ayant pris une alimentation riche en jaunes d'œufs.

Mots clés : *Arthrospira platensis*, effet antimicrobien, hypocholestérolémie.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the antimicrobial and hypocholesterolemic activity of a cyanobacterium "*Arthrospira Platensis*" (Spirulina); for this, we conducted a trial of craft culture of spirulina, a microbiological control and a phytochemical screening of the cyanobacterium. The cultivation of spirulina in a culture medium called "Hiri's medium", while respecting the conditions of cultivation (alkaline pH, fairly high temperature, good lighting, agitation, good drying, grinding, conditioning) given an amount of 100 g of spirulina powder.

The microbiological analyzes of the spirulina powder gave us negative results with total germs, total coliforms, faecal coliforms, Clostridium Sulfatoreductors, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and yeasts and molds.

The phytochemical screening of the aqueous and methanolic extracts of spirulina revealed the presence of: tannins, flavonoids, saponosides, steroids, alkaloids for both extracts and proteins for the extract for the methanol extract. And the absence of: anthraquinones, anthocyanins, coumarins, reducing sugars in both extracts and proteins in the aqueous extract.

The antimicrobial potency of *Arthrospira Platensis* was tested on eight bacteria (*Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniaea*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeuginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and three fungi (*saccharomyces cerevisiae*, *Candida Albicans*, *Aspergillus brasiliensis*).

The results obtained gave an antimicrobial effect of the 2% aqueous extract with *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniaea* and *Serratia marcescens* with zones of inhibition of (19, 19, 20 27, 11 and 25 mm); And 8% aqueous extract with *Candida albicans* with an inhibition zone of 14 mm. And no antimicrobial effect of the methanol extract. Cholesterol-lowering activity was tested on fifteen rabbits aged eight months, by administering spirulina powder in their diets, and monitoring their cholesterol levels in the blood. For this we chose to apply the Mann-Whitney test to determine the success rate of this experiment; Thus, we obtained the following results: the cholesterol level was stable in the control batch 1 and the batch 3 had taken the egg yolks plus the spirulina with their diet; and we find a high rate in lot 2 having taken a diet rich in egg yolks.

Key words: *Arthrospira platensis*, antimicrobial effect, hypocholesterolemia.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط البكتيري و خفض الكولسترول لسبيرولينا؛ لهذا، قمنا باختبار زراعة خلايا للسبيرولينا، والمراقبة الميكروبيولوجية والفحص الكيميائي النباتي ل *cyanobacterium*.

زراعة خلايا من سبيرولينا في " وسط Hirz"، واحترام الشروط العامة (القلوية درجة الحموضة، ودرجة حرارة عالية، والإضاءة الجيدة، والأرق، والتجفيف الجيد، وسحق وتكييف)، و نتج عن ذلك 100 غرام من سبيرولينا مسحوق.

أعطى التحليل الميكروبيولوجي لمسحوق سبيرولينا لنا نتائج سلبية مع مجموع الجراثيم، مجموعه

, *coliformes fécaux, Clostridium Sulfatoreducteurs, Staphylococcus aureus, Salmonelle et levures et moisissures.*

تم إجراء الكشف الكيميائي عن المركبات الثانوية و الأولية اسبيرولينا حيث سمحت التجربة بالكشف عن

tanins, flavonoïdes, saponosides, stéroïdes, alcaloïdes

أعطت نتائج تأثير مضادات الميكروبات من المستخلص المائي بتركيز 2% مع *Bacillus subtilis* , *Pseudomonas aeuginosa, Staphylococcus aureus, Citrobacter frendii, Klebsiella pneumoniae et la Serratia marcescens* ، على التوالي (19 و 19 و 20 و 27 و 11 و 25 ملم). والمحلول المائي بتركيز 8% مع *Candida albicans* منطقة تثبيط 14 ملم. وليس له تأثير مضاد للميكروبات من مستخلص الميثانول.

وقد تم اختبار النشاط المخفض للكولسترول على الأرانب الذين تتراوح أعمارهم بين 5-8 أشهر بإضافة مسحوق سبيرولينا في نظامهم الغذائي ومراقبة مستويات الكولسترول في الدم. لهذا اخترنا لتطبيق اختبار Mann-Withney لتحديد نسبة نجاح هذه التجربة. وهكذا حصلنا على النتائج التالية: الكولسترول مستقر في المجموعة 3 الذي أخذ صفار البيض مع سبيرولينا. ونجد مستويات عالية في المجموعة 2 الذي اتبع نظام غذائي غني في صفار البيض.

الكلمات الرئيسية: *Arthrospira platensis*، وتأثير مضاد للميكروبات، خفض كوليستيرول الدم.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma petite et grande famille, mes amis et toute personne ayant contribué à sa réalisation.

CHINE YASMINE

A mes parents, Djilali et Fatima,

Pour leur soutien et leur aide précieuse tout au long de mon cursus,

Pour leur affection tout au long de ma vie.

A mes proches qui ont participé, par leur patience, leur accueil chaleureux, leur aide logistique, ou leur soutien moral, à l'élaboration de ce travail.

A mes amies.

MERIEM

Remerciements

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 Guedioura A.(MAA/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 Bradea M.S. (MCA/BPO.UBD1)

C'est un plaisir pour nous que vous ayez accepté de participer à l'amélioration de la qualité de ce travail. Vous avez représenté la vraie phytothérapie avec vos conseils vos information et la façon dont vous les passer durant tout le cursus Veillez agréer Cher Maître, l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

A notre Maître et promotrice de thèse, Professeur Cherif H.S. (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.

A notre co-promotrice Neguebi S. pour sa disponibilité et son précieuse, et à toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de Blida.

Au chef de département de la Faculté des Recherches Agro-Alimentaires M. Megatli et à son équipe du laboratoire de la faculté

A toute l'équipe du laboratoire de l'Hôpital de Beni Slimen.

Liste des tableaux

Tableau 1. Tableau récapitulatif sur la distribution naturelle de la spiruline

Tableau 2. Composition d'*Arthrospira plantensis* en vitamines .

Tableau 3. Minéraux et oligoélément contenus chez *spirulina platensis*

Tableau 4. Caractéristique des souches microbienne testées.

Tableau 5. Composition du milieu de Hiri (pour un litre d'eau distillée).

Tableau 6. Les germes recherchés :

Tableau 7. Résultats de l'analyse microbiologique

Tableau 8. Résultat du screening phytochimique

Liste des figures

Figure 1. Aspect microscopique de l'*Arthrospira platensis* (Charpy et al., 2008)

Figure 2. Schéma du cycle biologique de la spiruline (Mlaraha, 2011).

Figure 3. Schéma récapitulatif des effets biologiques de la spiruline (Yougbare, 2007).

Figure 4. La spiruline (*Arthrospira plantesis*) liquide et sèche (original 2016).

Figure 5. Culture artisanale de la spiruline (*Arthrospira plantesis*) (original 2016).

Figure 6. A gauche : La souche diluée de la spiruline (original 2016) - A droite: La souche mère de la spiruline (original 2016).

Figure 7. L'ensemencement de la spiruline (*Arthrospira platensis*) (original 2016).

Figure 8. Etapes de récolte la spiruline fraîche (original 2016) : Filtration ; (b) Séchage ; (c) & (d) Transformation en poudre.

Figure 9. Méthodologie d'extraction méthanolique des principaux métabolites de la spiruline.

Figure 10. Méthodologie d'extraction aqueuse des principaux métabolites de la spiruline.

Figure 11. Préparation d'extraits aqueux de la spiruline (original 2016).

Figure 12. Préparation d'extraits méthanoliques (original 2016).

Figure 13. Récupération et séchage l'extrait méthanolique (original 2016).

Figure 14. Observation de la spiruline sous microscope optique G× 400 (Original, 2016).

Figure 15. Observation de la spiruline sous microscope optique G× 1000 (Original, 2016).

Figure 16. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits de spiruline.

Figure 17. Résultats de l'activité hypocholestérolémiant.

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

NASA : National Aeronautics and Space Administration

FAO : Food and Agriculture Organization

UNICEF : Fond des Nations Unies pour l'Enfance

NK : cellules destructrices naturelles (Natural Killer)

ATCC : American Type Culture Collection

UFC : Unités Formant Colonies

FECL₃ : chlorure de fer III

NaOH : hydroxyde de sodium

NH₄OH : ammoniac

HCl : acide chlorhydrique

DMSO : Di-Méthyl Sulf-Oxyde

CNRDPA : Centre National de la Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
ملخص.....	iii
Dédicaces	iv
Remerciements	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Table des matières	x
Introduction générale	1
Chapitre 1 Généralités.....	3
1.1 Phytothérapie	3
1.1.1 Phytothérapie en Algérie	3
1.1.2 Avantage de la phytothérapie	4
1.2 Algues	4
1.3 La spiruline	5
1.3.1 Historique	5
1.3.2 Description et taxonomie.....	6
1.3.3 Cycle biologique de la spiruline	7

Table des matières

1.4	Composition de la spiruline.....	10
1.5	Toxicité de la spiruline	13
1.6	Utilisation de la spiruline.....	14
1.6.1	Dépollution de l'aire, de l'eau	14
1.6.2	Cosmétique	14
1.7	Effet thérapeutiques de la spiruline	15
Chapitre 2	Matériel et Méthodes	18
2.1	Matériel	18
2.1.1	Matériel biologique.....	18
2.1.2	Matériel non biologique.....	20
2.2	Méthodes	20
2.2.1	Culture de la spiruline	20
2.2.2	Analyse microbiologique de la spiruline	24
2.2.3	Screening phytochimique	31
2.2.4	Activité antimicrobienne	35
2.2.5	Activité hypocholestérolémiante	38
Chapitre 3	Résultats et Discussion.....	40
3.1	Résultats et discussion.....	40
3.1.1	Culture artisanale de la spiruline	40
3.1.2	Résultats du contrôle microbiologique	41
3.1.3	Screening phytochimique	42
3.1.4	Activités Biologiques.....	43
	Conclusion générale	49
	Annexe.....	50

Bibliographie 66

Introduction générale

Le groupe des cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, compte parmi l'une des anciennes formes de vie sur terre et constitue l'essentiel des bactéries capables de réaliser la photosynthèse avec production d'oxygène (**Charpy et al., 2008**).

Parmi ces cyanobactéries, la spiruline, utilisée traditionnellement depuis les années soixante pour ses propriétés alimentaires (richesse en protéines, bêta carotènes, (précurseur de la vitamine A), de nombreux autres minéraux et vitamine (**Ciferri, 1983**); particulièrement en vitamine B₁₂, et en fer (**Sall et al., 1999**), aussi la présence des lipides essentiels rares comme l'acide palmitique, acide palmitoleique, gamma-linoléique « oméga 6 » (**Andrean, 2011**). Elle est actuellement l'une des meilleures solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité.

Outre ces propriétés nutritionnelles, la spiruline connaît aujourd'hui un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique internationale du fait qu'elle est considérée comme source de substances à vertus thérapeutiques (activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antivirale, hépato-protectrice, activité sur le système immunitaire) (**Sirnoval, 1993 ; Sguera, 2008**).

Les études faites sur la spiruline sont nombreuses et prometteuses nous en citons à titre d'exemple : l'effet protecteur de l'extrait aqueux de la spiruline contre la mort cellulaire induite par les radicaux libres (**Chu et al., (2010)**), les propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de la C-phycocyanine à partir d'algues bleu-vert (**Romay et al., (1998)**); l'effet inhibiteur de biofilm de *Spirulina platensis* extrait sur les bactéries d'importance clinique (**Felix et al., (2015)**); Rôle de la Spiruline dans le contrôle de la glycémie et de la dyslipidémie chez les Diabétiques de Type 2 (**Parikh et al., (2001)**);

Dans ce cadre, nous avons essayé de contribuer à la valorisation du potentiel de la cyanobactérie *Arthrospira platensis*.

Les objectifs que nous nous sommes assignés sont :

- Présentation d'un essai de culture artisanale de spiruline et sa réduction en poudre.
- Analyse microbiologique de la poudre de spiruline.
- Screening phytochimique des extraits aqueux et méthanolique de la spiruline ;
- Préparation des extraits aqueux et méthanolique à partir de la poudre de la spiruline cultivée.

- L'évaluation de l'activité antimicrobienne chez onze souches dont huit bactéries et trois champignons.

L'évaluation de l'activité hypocholestérolémiante chez les lapins.

Chapitre 1 Généralités

1.1 Phytothérapie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles, à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**Famsworth et al., 1990**). A l'origine, ces ressources étaient employées sous leur forme brute, puis au fil du temps, les différentes préparations d'extraits et de concentrés ont permis d'intensifier l'effet médicinal des plantes (**Tyler et al., 1999**).

Etymologiquement, le terme phytothérapie vient de deux mots grecs : phytho (plante) et therapeuei (soigner) (**Rwangabo, 1993**). La phytothérapie utilise les plantes médicinales pour guérir, voire prévenir les maladies (**Chmouny, 2008**).

Selon **Salle (1991)**, on peut distinguer deux types de phytothérapie :

1. Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays en voie de développement. C'est une médecine conventionnelle du fait de l'absence d'étude chimique.
2. Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes. Cette pratique conduit aux phytomédicaments.

1.1.1 Phytothérapie en Algérie

On considère que près de 75% de la population africaine n'a recours qu'aux plantes qui l'entourent pour soigner (**Pousset, 2004**)

A l'instar de certains pays, en Algérie ; les plantes médicinales et les remèdes n'ont jamais été totalement abandonnés et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne (**Hamza, 2011**)

En effet, l'Algérie bénéficie d'un climat très diversifié et les plantes poussent en abondance dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces plantes constituent les

remèdes naturels potentiels qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif (**Belouad, 1998**).

Ce potentiel comporte plusieurs espèces présentant divers objets de recherche scientifique, mais la majorité de ces plantes médicinales et leurs vertus thérapeutiques restent méconnus et peut être utilisée (**Baba Aissa, 2000**).

Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles substances d'intérêt biotechnologique. Ainsi, sur le marché pharmaceutique et cosmétique, 30% des substances actives ont été développées à partir de substances naturelles dont 10 % ont été isolées d'organismes marins (**John, 1994**) dont les algues en font partie.

1.1.2 Avantage de la phytothérapie

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. Ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié aux besoins non seulement de la thérapie, mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie (**Zablocki, 2009**).

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (**Iserin et al., 2001**).

1.2 Algues

Le terme botanique « algue », provient du latin « alga » qui signifie « organisme », apparu en 1951 permet de désigner un organisme photosynthétique sans tige, racine ni tissus conducteurs dont les cellules reproductrices sont produites dans des kystes.

Les groupes d'algues exploitées industriellement sont les chlorophycées (algues vertes), phéophycées (algues brunes), rhodophycées (algues rouge) et cyanobactéries ou cyanophycées (algues bleu-vert). **(Marfaing, 2012).**

Utilisées depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives; les algues constituent un enjeu majeur de développement économique. **(McHugh, 2003)**

Pour nos sociétés modernes, en quête de nouveaux procédés et de molécules actives innovantes, les micro-algues représentent un formidable potentiel. Leurs nombreuses espèces et leur biodiversité constituent un réservoir de métabolites et de propriétés biochimiques quasi-inexploré, pour le développement de nouvelles applications biotechnologiques. **(Bougaran et Bruno, 2014)**

1.3 La spiruline

1.3.1 Historique

La spiruline est un des plus primitifs organismes apparus sur la terre il y a plus de 3,5 milliards d'années. Elle n'a pas évolué, c'est l'ancêtre de tous les organismes vivants, de la lignée animale comme de la lignée végétale.

Cette algue croit à l'état naturel dans les lacs saumâtres, saturés de soude, dans des régions chaudes de la terre. **(Vidal, 2008).**

Elle est découverte par les européens lors de la conquête de l'Amérique. Dans ses mémoires, le conquistador Cortés rapporte que les aztèques promenaient à la surface du lac Texcoco des filets à mailles très serrées pour récolter une sorte de boue colorée qu'ils faisaient sécher au soleil pour former ensuite des galettes appelées « **Tecuitlatl** » et qu'ils consommaient pour améliorer leur performances lors d'activités physiques intenses. **(Vidal, 2008).**

En Afrique, certaines tribus de Sahara, consomment depuis bien longtemps la spiruline, puisée dans des lacs et mares où elle croit à l'état naturel, sous forme de galettes nommées « **Dihé** » **(Vidal, 2008).**

Une mission scientifique redécouvre la spiruline dans les années 40 au Tchad. Les études sur cette algue ne démarrent véritablement que dans les années 60. Dans les années 70, la spiruline devient appréciée dans les pays industrialisés du fait de ses excellentes propriétés

nutritionnelles. Par ailleurs, il est utile de mentionner les travaux menés par la NASA et l'agence spatiale Européennes quant à l'utilisation de la spiruline dans de futures stations spatiales (Falquet et Hurni, 2006).

1.3.2 Description et taxonomie

- **Morphologie**

La Spiruline est une cyanophycée microscopique d'une longueur moyenne d'environ 250 μm . Elle est composée de filaments mobiles de 10 à 12 μm de diamètre non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires. Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation de « Spiruline ». Cependant les Spirulines présentent différentes formes. On trouve des formes spiralées classiques, ondulées et parfois droites. Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat (Charpy et al. 2008). Selon (Rippka et al. 1979) la forme hélicoïdale est spécifique au genre spiruline par rapport aux cyanobactéries filamenteuses. Ce genre est caractérisé par des trichomes à haute spiralisation.

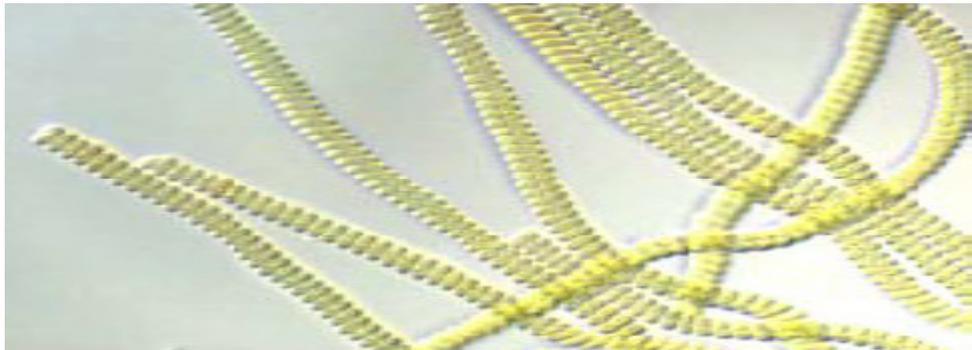


Figure 1. Aspect microscopique de l'*Arthrospira platensis* (Charpy et al., 2008)

- **Taxonomie**

La classification systématique de la spiruline a été étudiée par plusieurs auteurs. Gardner(1917) a suggéré de retenir le nom « Arthrospira » pour les formes à paroi visiblement cloisonnée et celui de « spiruline » pour les formes à cloisons invisibles Berguey(1994), les a classés comme suit :

- **Ordre** : Nostocale
- **Famille** : Oscillatoriaceae

- **Genre** : Spirulina
- **Espèce** : *Spirulina platensis* et *Spirulina maxima*

1.3.3 Cycle biologique de la spiruline

La spiruline se présente sous forme de filaments constitués de cellules juxtaposées. La reproduction de la spiruline, asexuée, se fait par division des filaments (**Jourdan, 2006**). Le filament de Spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées nécriidies. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. A partir de ces derniers, le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies. Les hormogonies vont croître en longueur par division binaire (chacune des cellules va donner deux cellules par scissiparité) et prendre la forme typique hélicoïdale. En conditions expérimentales, le temps de génération (passage d'une génération à une autre) maximal de la Spiruline est de l'ordre de 7 heures. (**Zarrouk, 1966**) (**Mlaraha, 2011**). (**fig. 02**)

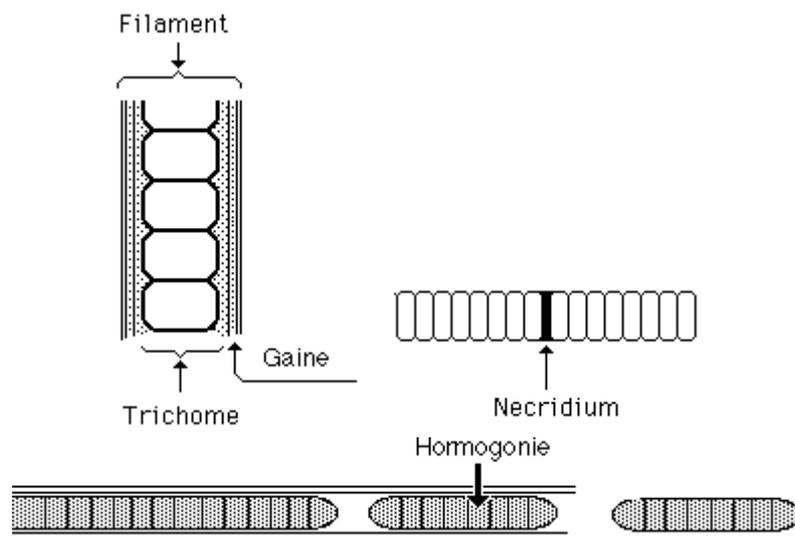


Figure 2. Schéma du cycle biologique de la spiruline (Mlaraha, 2011).

a. Déplacement

La spiruline est capable d'effectuer deux types de déplacement : la motilité et la flottabilité. Le trichome exerce un mouvement oscillatoire, de forme hélicoïdale, en rotation autour du grand axe. La spiruline peut donc évoluer dans l'eau en se vissant ; ce déplacement s'effectue à la vitesse de $5 \mu\text{m}$ par seconde. La microscopie électronique a permis de comprendre la motilité des filaments (**Doumenge et al., 1993**).

La spiruline peut également fabriquer des vésicules de gaz d'environ 70 nm de long et 10 nm de diamètre, faites d'une chaîne de protéines tissées. Ces vésicules ressemblent à des tubes creux cylindriques comportant des capuchons coniques. Elles se trouvent habituellement près des parois terminales des cellules et sont empilées les unes sur les autres, elles se forment et se remplissent de gaz lorsque la lumière du soleil apparaît : tels des ballons dirigeables, elles permettent au filament de spiruline de remonter en surface pour recevoir la lumière et ainsi commencer la photosynthèse **(Fox, 1999)**.

Les cellules sont surchargées par les grandes quantités d'hydrates de carbone fabriquées, lesquels engendrent une haute pression osmotique interne. Ne pouvant plus supporter cette pression, les vésicules implosent. Le gaz libéré est comprimé et absorbé par les fluides environnants. Les vésicules s'effondrent et le filament de spiruline redescend vers le fond obscur. Pendant la nuit, grâce au phénomène de respiration précédemment décrit, la majeure partie des hydrates de carbone accumulés est convertie en protéines, pendant que du CO_2 est perdu. Pour recommencer un cycle de photosynthèse le lendemain, de nouvelles vésicules de gaz se forment de sorte que les filaments de spiruline soient à la surface de l'eau avant l'aube **(Fox, 1999)**.

b. Répartition géographique

La Spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales.

Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud. Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). Cet organisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe **(Charpy et al., 2008)**.

Tableau 1. Tableau récapitulatif sur la distribution naturelle de la spiruline

Pays	Région
Algérie	Tamanrasset et actuellement Oran
Tchad	Région du Kanem : Lacs Latir, Ouna, Borkou, Katem, Yoan, Leyla, Badou.
Soudan	Cratère du djebel Marra
Madagascar	De petits lacs près de Toliara
Tunisie	Lac Tunis ; Chott El Jerid
Zambie	Lac Bangweoulou
Congo	Mougounga
Inde	Lac Lonar et Nagpur
Myanmar	Lacs Twyntaung, Twyn Ma et TaungPyank
Pakistan	Mares près de Lahore
France	Camargue
Thaïlande	Lac d'Effluents d'une usine de tapioka Province de Radburi, 80km au S.O.de Bangkok.
Haïti	Lac Gonâve
Mexique	Lac Texcoco ; Lac Cratère
Uruguay	Montevideo

(Fox, 1999)

La spiruline peut même pousser dans des lacs volcaniques (lac Quiliotoa, en Equateur). Plus généralement, elle croît dès que l'eau est riche en carbonate ou bicarbonate de sodium, d'autres minéraux et une source d'azote fixé. C'est pourquoi on peut en trouver aussi dans certains déserts, à l'endroit de ramassage de l'eau provenant occasionnellement des montagnes (Ariel, 2003).

Des projets de production de spiruline et micro-algues en générale sont en cours de réalisation ou presque achevés dans certains pays pour arriver à satisfaire la demande nationale et participer à celle internationale vue que la quantité disponible dans la nature ne couvre cette dernière (Ariel, 2003).

1.4 Composition 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**).

✓ 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 et al., 2004**).

✓ Vitamines

Parmi les vitamines, le béta-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**).

✓ 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 et al., 2000**).

Tableau 2. Composition d'Arthrospira plantesis en vitamines.

Vitamine	Moyenne (mg/kg)	Vitamine	Moyenne (mg/kg)
Biotine	0,4	Tocopherol	190
Cyanocobalamine (B ₁₂)	0,4	β-carotène (pro-A)	1700
Inositol (B ₆)	350	Acide ascorbique (c)	90
Pyridoxine (B ₆)	3	Acide folique (B ₉)	0,5
Riboflavine (B ₂)	40	Acide nicotinique (PP)(B ₃)	118
Thianine (B ₁)	55	δ-ca-pantothénate	11

(Pierlovisi, 2007)

✓ Lipides

La spiruline contient l'acide gamma-linolenique, 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 et al., 1998). La spiruline peut être considérée comme l'une des meilleures sources connues d'acide gamma-linolenique, 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 et Hurni, 2006).

✓ 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 et al., 1996). Cependant, les glucides simples ne sont présents qu'en très faible quantités (Lee et al., 2009).

✓ 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 et 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, atout intéressant dans les pays industrialisés où le rapport entre le sodium et le potassium est souvent trop élevé (**Sautier, 1975**).

Tableau 3. Minéraux et oligoélément contenus chez *spirulina platensis*

Elément	Qualités (mg/kg de biomasse sèche)
Cr	11,3 à 14,2
Fe	900 à 1176
Zn	554 à 592
Mn	21 à 375
Ca	4320
Cl	4890
K	9000
Mg	670 à 2700
Na	4500 à 235000
P	6700 à 9000

(**Avino et al., 2000**).

✓ Les pigments

Le système pigmentaire présent est constitué de chlorophylle a, mais aussi de pigment hydrosoluble, les phycoblines rouges (phyco érythine) et bleu (phycocyanine) et de caronénoïdes (β -carotène, cryptoxanthine) et autres (**Pierlovisi, 2007**).

- **La phycocyanine** est constituée d'une structure protéique reliée à un chromophore. C'est un pigment assez rare dans la nature qui absorbe la lumière dans une longueur de 61 à 650 nanomètres. Elle est représentée à une hauteur d'environ de 10 à 11% en moyenne dans la spiruline. Appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire, de nombreuses recherches sont en cours pour connaître toutes ses propriétés. Sa structure particulière lui confère des propriétés anti oxydantes, anti radicalaires et détoxifiantes. La phycocyanine stimulerait également la production des globules rouges et des globules blancs. (**Charlemagne, 2008**).

- **La chlorophylle** est un pigment essentiel de la photosynthèse puisqu'elle transforme l'énergie lumineuse en énergie chimique. Constituée d'un atome de magnésium en son centre, la chlorophylle est parfois comparée à l'hémoglobine qui possède quant à elle un atome de fer. La spiruline en contient environ 1%, ce qui stimulerait les fonctions de presque tous les organes. **(Charlemagne, 2008)**.
- **Les caroténoïdes** sont des pigments non azotés dont la coloration varie du jaune au rouge. La plupart des caroténoïdes sont des provitamines A indispensables aux hommes et aux animaux. La spiruline en contient entre 20 et 25 fois plus que **les carottes**. Le bêta-carotène représente 80% des caroténoïdes présents. Les caroténoïdes ont une action anti-radicalaire. Ils participent également à la croissance et au développement de l'individu, ainsi qu'au maintien de la vision nocturne **(Charlemagne, 2008)**.

1.5 Toxicité de la spiruline

La qualité sanitaire est l'état dans lequel se trouve le produit sur le plan bactériologique et toxique. Un produit alimentaire quel qu'il soit, se doit de présenter une qualité sanitaire irréprochable n'entraînant pas, chez le consommateur, des troubles de la santé. L'avis favorable concernant l'emploi de la spiruline dans l'alimentation humaine a été émis par le Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France, en 1989. **(Tabutin et al., 2002)**

Il a émis l'avis suivant :

La spiruline peut être utilisée en alimentation humaine (en tant que légumes ou condiments et non en tant que gélifiants ou épaississants) en l'état ou incorporée à d'autres denrées alimentaires. Ces algues doivent être conformes aux spécifications suivantes (valeurs exprimées par rapport à la matière sèche), en matière de toxicologie. **(Tabutin et al., 2002)**

- Arsenic minéral $\leq 3 \text{ mg / Kg}$
- Iode $\leq 500 \text{ mg / Kg}$
- Cadmium $\leq 0.5 \text{ mg / Kg}$
- Mercure $\leq 0.1 \text{ mg / Kg}$
- Etain $\leq 5 \text{ mg / Kg}$
- Plomb $\leq 5 \text{ mg / Kg}$

Selon (**Tabutin, 2002**) le risque micro biologique est lié à la présence de microorganismes ou de substances élaborées par les microorganismes. Ce risque résulte souvent d'une maîtrise insuffisante des conditions d'hygiène au cours de la production, du stockage, du transport ou de la commercialisation des produits. Pour les algues en sachet les critères micro biologiques suivants :

- Germes aérobies mésophiles à 30°C ≤ 100 000/g
- Clostridium perfringens ≤ 1/g
- Coliformes fécaux à 44.5°C ≤ 10/g
- Staphylococcus aureus ≤ 100/g
- Anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C ≤ 100/g
- Salmonella absente dans 25 g

Il n'existe en 2016 aucun cas de surdose de spiruline documenté dans la littérature scientifique. Des consommateurs de plus de 10g/jour pendant plusieurs années d'affilées ne rapportent aucun effets négatifs. En ce qui concerne le risque aigue, aucune donnée ne vient fixer de limite: des consommations de plus de 100g/jour ne semble ou aucune conséquence particulière. Une forte consommation de la spiruline provoque l'accumulation bénigne de caroténoïdes dans la peau, les quelles provoquer une légère coloration orangée (**Falquet et Hurni, 2006**).

1.6 Utilisation de la spiruline

1.6.1 Dépollution de l'aire, de l'eau

La spiruline est un grand pourvoyeur d'oxygène. Les forêts jouent un rôle important dans le stockage du gaz carbonique(CO₂). Les arbres sont les meilleurs végétaux pour fixer le carbone : de 1 jusqu'à 4 tonnes par an et par hectare. Mais la Spiruline est encore plus efficace: dans le désert californien, elle peut fixer jusqu'à 6,3 tonnes de carbone par ha/an; au même temps elle produira 16,8 tonnes d'oxygène (ha/an). (**Banks, 2007**).

1.6.2 Cosmétique

En cosmétique, la spiruline est principalement utilisée comme :

- a) **Antioxydant /antivieillissant** : La Spiruline est riche en bêta-carotène naturel qui agit comme un complexe **antioxydant**, en synergie avec les autres caroténoïdes contenus

dans la micro-algue. Elle est aussi une source importante de l'enzyme superoxydedismutase (SOD) dont l'activité antioxydante est importante. La Spiruline va donc participer efficacement à la lutte contre les radicaux libres de l'oxygène et contribuer ainsi à ralentir les processus de vieillissement. **(Banks, 2007)**.

b) Pour renforcer les ongles, les cheveux, la peau: La spiruline contient toutes les vitamines et minéraux nécessaires à une peau, des cheveux et des ongles sains.

- La teneur en **vitamine A** : stimule la pigmentation de la peau et permet de bronzer plus rapidement et plus uniformément au soleil.
- La teneur en **vitamine B₅** : permet à la peau de conserver son hydratation et sa souplesse, et protège les cheveux contre les agressions chimiques et mécaniques.
- La teneur en **vitamine B₈** : Réduit l'excrétion de sébum, principale cause de la chute des cheveux. **(Banks, 2007)**.

c) Agriculture : amendement des terres : L'usage de certaines variétés d'algues comme moyen d'enrichir régulièrement les terres est un savoir-faire ancien commun aux populations du nord de l'Europe. La généralisation de l'utilisation d'engrais chimiques après la deuxième guerre mondiale mis fin à ce type de pratiques.

Aujourd'hui, certaines sociétés se spécialisent dans la production d'engrais biologiques. La biomasse rejetée par les cultures de spiruline pourrait être valorisée dans ce sens **(Banks, 2007)**.

1.7 Effet thérapeutiques de la spiruline

Quelques études cliniques montrent les effets bénéfiques de la spiruline telle que la réduction du cholestérol et des cancers par la stimulation du système immunitaire, l'augmentation des lactobacilles de la flore intestinale, la réduction de la toxicité des reins due aux métaux lourds et les drogues ainsi que la protection contre les radiations **(Darcas, 2004)**.

✓ La lutte contre la mal nutrition

Selon le rapport de FAO (30/10/2006), la malnutrition touche plus de 30% de la population mondiale, et selon l'OMS et l'UNICEF, un (01) sur trois (03) en Afrique et un (01) sur cinq (05) en Asie souffrent de malnutrition **(FAO, 2006)**.

Par sa facilité de culture, sa capacité de récolte, son équilibre nutritionnel, la spiruline pourrait constituer une solution efficace aux problèmes de la malnutrition.

✓ **Stimulation du système immunitaire**

Plusieurs expériences positives ont été réalisées sur les animaux montrant que la spiruline régulerait favorablement le système immunitaire en augmentant l'activation des macrophages et les cellules naturellement destructrices (NK) (**Borchers et al., 2007**).

✓ Dans les régimes amaigrissants : pour ses taux importants en protéines et enphénylalanine, qui réguleraient l'appétit (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour l'amélioration des capacités sportives : par ses teneurs en fer, en vitamine B₁₂, et en β-carotène qui faciliteraient la récupération (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour lutter contre l'asthénie par son apport en oligoéléments et vitamines.

✓ Pour ses effets sur la sénescence : par les propriétés antioxydantes du β-carotène, de la phycocyanine et de la vitamine E, elle serait un frein au vieillissement des cellules.

✓ son activité antioxydante liée à la phycocyanine (**Parikh et al., 2001**).

✓ son activité anticoagulante liée au Spirulane Calcique (Sp-Ca) et au Spirulane Sodique (Sp-Na) (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour renforcer le système immunitaire grâce aux polysaccharides (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour son activité antivirale : liée au sulfoquinovosyldiacylglycerol riche en Sulfolipides (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour son activité anti tumorale liée à la phycocyanine (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour son activité pour diminuer le cholestérol grâce aux acides gras poly-insaturés oméga-3 et oméga-6 (**Parikh et al., 2001**).

✓ Pour ses autres actions sur la santé : une diminution du diabète chez l'homme (**Parikh et al., 2001**).

✓ Une activité anti-inflammatoire sur les articulations (**Remeriz et al., 2002**).

✓ Une hépato protection ; un effet possible de la molécule Spirulane-sodique dans la prévention de l'athérosclérose (**Yamamoto et al., 2006**)

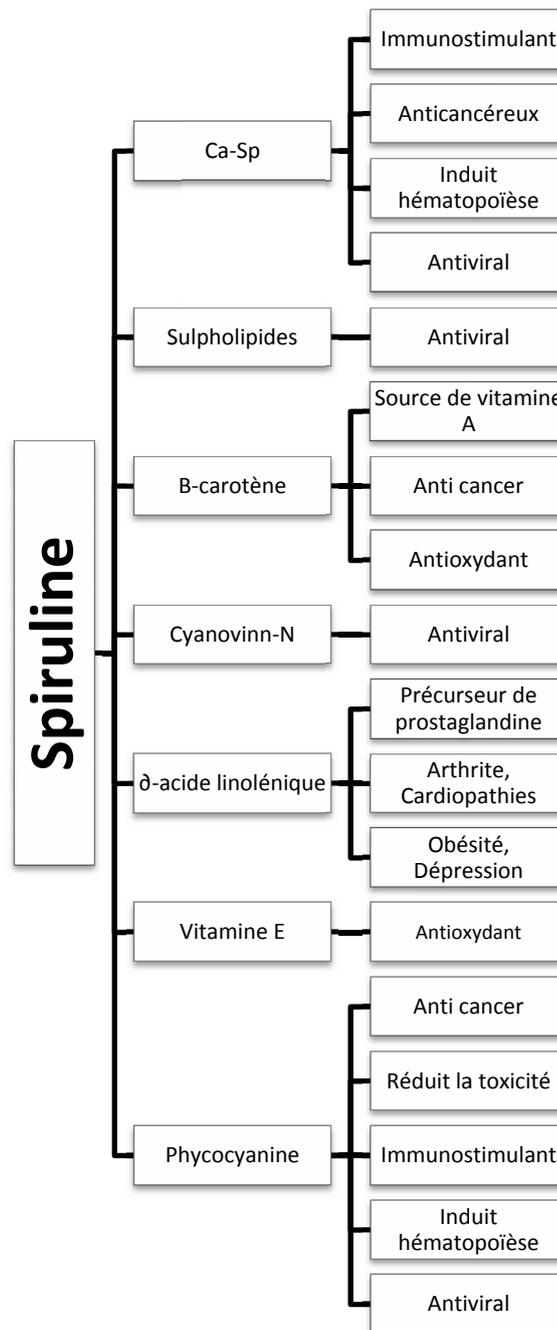


Figure 3. Schéma récapitulatif des effets biologiques de la spiruline (Yougbaré, 2007).

Chapitre 2 Matériel et Méthodes

Notre étude expérimentale s'est étendue sur période de cinq mois et s'est déroulée au niveau de plusieurs laboratoires :

- Laboratoire de la Faculté des Recherches Agro-Alimentaires de la wilaya de Blida (Annexe de l'Université Saad Dahleb ex SEMPAC), pour la préparation des extraits de la spiruline.
- Laboratoire d'Hygiène et Sécurité de la wilaya de Blida, pour la réalisation de l'activité antimicrobienne.
- L'hôpital de Béni Slimane dans la wilaya de Médéa, pour la mesure du taux de cholestérol pour l'évaluation de l'activité hypocholestérolémiante

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel biologique

a) Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est l'algue bleue verte *Arthrospira plantensis* (Léonard 1964). La souche mère nous a été aimablement fournie en culture dans un flacon de deux litre sous forme de solution (liquide) par la ferme d'aquaculture du CNRDPA (Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche de l'Aquaculture) d'Ouargla ; puis cultivée artisanalement à domicile dans la région de Médéa (Béni Sliman) jusqu'à l'obtention d'un produit fini (poudre sèche de spiruline).

- Une quantité d'environ 100g de la spiruline nous a été munie par M. Hiri (AbdelKader Hiri est docteur en géophysique-géomagnétisme de l'université parisienne Pierre et Marie Curie, et, cultivateur de la spiruline au sud algérien Tamanrasset) pour la vérification de l'activité antimicrobienne.



Figure 4. La spiruline (*Arthrospira plantesis*) liquide et sèche (original 2016).

b) Matériel Animal

Les animaux utilisés pour évalué l'activité hypocholestérolémiant sont en nombre de quinze, des lapins, de la race **albinos croisé**, des deux sexes mal et femelle âgés de 8 mois, dont la moyenne de poids est de presque 1600g ; L'élevage et les prélèvements sont réalisés à domiciles ;

Les lapins ont été repartis en 3 groupes, à une la température du climat (température de la nature) ; à un régime alimentaire naturel (salade, orge,..), eau du robinet, le temps de s'habituer à leur nouvel habitat pendant presque une semaine.

c) Les Microorganismes

Les souches de bactéries et champignons étaient fournis par le laboratoire d'hygiène et sécurité de Blida.

Tableau 4. Caractéristique des souches microbienne testées.

Bactéries	Lieu/Référence	Type
<i>Citrobacter freundii</i>	Hôpital	Gram _
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hôpital	Gram _
<i>Proteus vulgaris</i>	Hôpital	Gram _
<i>Serratia marcescens</i>	Hôpital	Gram _
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372	Gram +
<i>Pseudomonas aeuginosa</i>	ATCC27853	Gram _
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Gram +
<i>E.coli</i>	ATCC25922	Gram _
Champignons		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	

2.1.2 Matériel non biologique

Le matériel non biologique englobe toute la verrerie, réactifs chimiques et appareils du laboratoire, détaillés en annexe

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture 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 utilisées, les degrés de technologie ainsi que l'objectif. (Charpy et al., 2008)

La culture de notre spiruline est passée par les mêmes étapes obligatoires, lesquelles seront décrites ci-après, sur la base des méthodes artisanales

a) Condition essentielles de la culture

La culture de l'*Arthrospira plantensis* (Léonard 1964) peut se faire dans plusieurs milieux différents dont les plus connus sont: milieu HIRI, milieu ZERROUK, milieu JOURDAN.

Dans la présente étude, nous avons choisis d'utiliser le milieu Hiri du point de vue économique et la disponibilité des produits nécessaire à la culture.

Ce milieu est constitué d'eau distillée et de sels minéraux, avec un pH compris entre 9 et 10 dans les proportions sont citées dans le tableau suivant :

- **Milieu de culture**

Il s'agit d'une solution de sels minéraux dans de l'eau. Ce liquide doit apporter à la spiruline tous les éléments chimiques qui lui sont nécessaires. Le pH du milieu de culture (c'est-à-dire son degré d'alcalinité) doit être compris entre 8.0 et 11.

Tableau 5. Composition du milieu de Hiri (pour un litre d'eau distillée).

Composé	Quantité (g/l)	Composé	Quantité (g/l)
Bicarbonate de soude ($NaHCO_3$)	16	Sulfate de potassium (K_2SO_4)	0.5
Chlorure de sodium ($NaCl$)	01	Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	0.1
Phosphate d'ammonium ($NH_4H_2PO_4$)	0.1	Sulfate de magnésium ($MgSO_4$)	0.1
Sulfate de fer ($FeSO_4$)	0.01	Urée azotée $CO(NH_2)_2$	0.1

- **pH**

Le pH sera entre 8,5 et 10,5 (**Jourdan, 1999**), naturellement, la spiruline a tendance à alcaliniser le milieu (**Danesi et al., 2004**).

- **Température**

La température du milieu de culture influence directement la vitesse de croissance de la spiruline: bien qu'assez résistante au froid (jusqu'à 3-5°C au dessus de zéro), la spiruline ne commence à croître d'une manière appréciable qu'au dessus de 20°C. La vitesse de croissance est maximale vers 35-37°C. Elle est assurée par un chauffage électrique d'aquarium.

- **La lumière**

Une culture en bonnes conditions de concentration et de température pourra être exposée avec profit à un maximum de lumière naturelle. Nous réduisons volontairement la luminosité par ombrage. Nous avons remplacé la lumière naturelle par une ampoule de 75W.

- **Agitation**

Il est impératif d'agiter, au moins occasionnellement (2-4 fois par jour), une culture de spiruline. On favorise ainsi une dispersion homogène de la spiruline dans le liquide, et son exposition à la lumière. Agitation manuelle 2 à 3 fois par jour.



Figure 5. Culture artisanale de la spiruline (*Arthrospira plantesis*) (original 2016).

- **Ensemencement**

Pour ensemercer il suffit de transvaser dans du milieu de culture neuf un certain volume de culture mère jusqu'à ce que la couleur devienne verte.



Figure 6. A gauche : La souche diluée de la spiruline (original 2016) - A droite: La souche mère de la spiruline (original 2016).



Figure 7. L'ensemencement de la spiruline (*Arthrospira platensis*) (original 2016).

- **Récolte**

Lorsque la concentration de la culture passe au-dessous 2-3 cm, on procède à la récolte. La concentration est mesurée avec une règle graduée plongée perpendiculairement dans le milieu de culture.

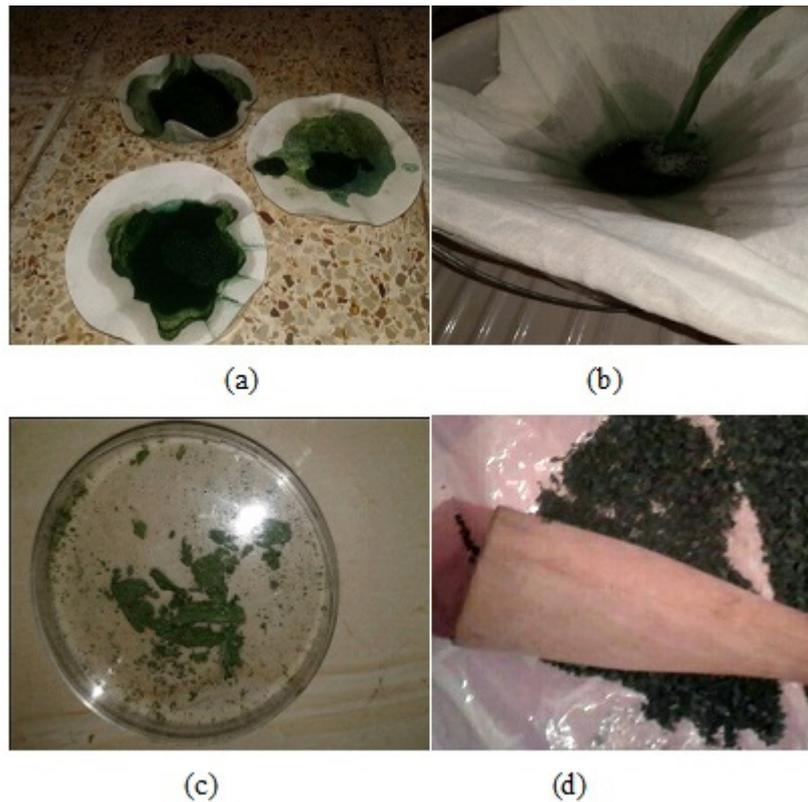


Figure 8. Etapes de récolte la spiruline fraîche (original 2016) : Filtration ; (b) Séchage ; (c) & (d) Transformation en poudre.

2.2.2 Analyse microbiologique de la spiruline

La contamination par les micro-organismes pathogène peut se produire à n'importe quelle phase de la manipulation des aliments ; d'où la nécessité des analyses microbiologiques (Prescott et al., 2003).

Tableau 6. Les germes recherchés :

Echantillons Analysés	Germes recherchés	Milieux de culture	Température (°C) et temps d'incubation(h)
Spiruline	Germes totaux	PCA	30°C/72h
	Coliformes totaux	VRBL	37°C/24-48h
	Coliformes fécaux	VRBL	44°C/24-48h
	Clostridium sulfite réducteurs	VF+additif GC, Chapman	37°C/24-48h 37°C/24-48h
	<i>Staphylococcus aureus</i>	TSE, SFB+additif YGC	37°C/24-48h 22°C/3 à 5jours
	Salmonelle		
	Levures et moisissures		

❖ Analyse microbiologique de la poudre de spiruline

Préparation de la suspension mère et dilutions décimales:

On réalise généralement à partir de la suspension des dilutions successives en progression géométrique à raison de 10, le diluant est en générale celui qui a servi à préparer la suspension mère.

Nous introduisons aseptiquement 25g de produit à analyser dans un flacon stérile taré contenant au préalable 225 ml de diluant soit le TSE (Tryptone Sel Eau), puis nous homogénéisons pendant 6 à 8 minutes.

Cette suspension constitue alors la dilution mère qui correspond donc à la dilution 1/10 ou (10^{-1}).

- A partir de la dilution mère nous préparons les dilutions décimales ;
- Nous introduirons ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, un volume de 1ml de la dilution mère dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9ml de diluant TSE, puis nous homogénéisons, et cette dilution est alors au 1/100 ou (10^{-2}) ;
- Ensuite nous prélevons aseptiquement, 1ml de la dilution 1/100 ou (10^{-2}) que nous introduirons dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9ml du diluant TSE, puis nous homogénéisons et cette dilution est alors au 1/1000 ou (10^{-3}).

a) Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles

✓ Principe

Elle consiste à la mise en contact de ces microorganismes aérobies mésophiles avec un milieu de culture adéquat « **Plate Count Agar** » (PCA) pour permettre leur croissance et leur développement en vue de les dénombrer sous forme de colonies lenticulaires à 30°C.

✓ Mode opératoire (NF 08-051, 1992/ISO 4833)

- A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1} , porter aseptiquement 1ml dans une boîte de Pétri vide préparée à cet usage puis numérotée.

- Couler ensuite environ 15ml de gélose (PCA) préalablement fondue dans un bain marie puis refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Homogénéiser le mélange par des mouvements circulaires en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.
- Laisser solidifier sur la paille ; puis incuber les boîtes couvercle en bas à 37°C pendant 72 heures.

Lecture:

Le dénombrement est effectué en prenant en compte le nombre des colonies lenticulaires en masse compris entre 30 et 300 colonies. On multiplie le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution. Les résultats finaux sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g de produit analysé.

b) Recherche et dénombrement des levures et moisissures

Les levures et les moisissures sont des champignons microscopiques ; qui se trouvent dans l'environnement des denrées alimentaires. Ce sont des indicateurs d'une contamination environnementale non maîtrisées par les traitements technologiques (**Branger et al., 2007**).

✓ **Principe:**

Le dénombrement est réalisé sur gélose « **Yeasts extract Glucose Chloramphenicol** » (YGC) qui permet la croissance des levures et moisissures en inhibant le développement des bactéries.

✓ **Mode opératoire (NA 59 11, 1996)**

- A partir de la suspension mère ou des dilutions décimales, transférer aseptiquement 1ml de produit à analyser dans des boîtes de Pétri stériles.
- Couler dans chacune des boîtes de Pétri, environ 15ml de gélose (YGC) ; fondu puis refroidie et maintenue à $47 \pm 2^\circ\text{C}$ dans un bain d'eau.
- Mélanger soigneusement avec des mouvements de va-et-vient et en forme de « 8 » pour bien homogénéiser la gélose et l'inoculum.
- Laisser le mélange se solidifier sur une paille pendant 15 minutes.
- Incuber les boîtes couvercle en bas à 22°C pendant 5 jours.

Lecture:

Pour le dénombrement des colonies, on fait la distinction entre les levures et les moisissures selon leur aspect macroscopique : les moisissures sont des colonies toujours pigmentées, à l'aspect velouté plus ou moins renflés et les levures sont des colonies ressemblant à celle des bactéries, pouvant avoir des bords réguliers ou irréguliers, des formes convexes ou plates et sont souvent opaques.

Multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution et les résultats sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g de produit analysé.

c) Recherche et dénombrement des coliformes totaux et coliformes fécaux

✓ **Principe :**

Les deux groupes de micro-organismes les plus utilisés comme indicateurs de contamination bactérienne sont des coliformes totaux et coliformes fécaux. (Desjardins, 1997). Les coliformes se distinguent des autres entérobactéries par leurs aptitudes à fermenter le lactose, leurs détections consistent à incuber l'échantillon à 37°C pendant 24h à 48h dans le milieu « **Violet Red Bile Lactose agar** » (VRBL).

✓ **Mode opératoire (NF V08-050, 1992)**

- A partir des dilutions décimales allant de 10⁻³ à 10⁻¹, porter aseptiquement 2 fois 1ml de chaque dilution dans deux boites de Pétri vides préparées à cet usage et numérotées.
- Compléter ensuite chaque boite avec 15ml de gélose (VRBL) préalablement fondue et refroidie.
- Faire ensuite les mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour bien mélanger la gélose à l'inoculum.
- Laisser les boites solidifier sur pailleasse.
- Puis incuber les boites couvercles en bas pendant 24 à 48h :
 - À 37°C pour la première série qui servira à la recherche des coliformes totaux ;
 - À 44°C pour la deuxième série qui servira à la recherche des coliformes fécaux.

✓ **Lecture**

Les coliformes (totaux et fécaux) apparaissent en masse sous forme des petites colonies de couleur rouge fonce, brillantes de 0.5mm de diamètre, dont le nombre est compris entre 30 et 300 colonies, on multiplie le nombre trouvé par l'inverse de dilution. Le résultat est exprimé en UFC/g ou UFC/ml de produit analysé.

d) Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

✓ **Principe**

Les *Staphylococcus aureus* sont des germes aéro-anaérobie facultatifs, possédant une catalase, sont capables de réduire le tellurite de potassium en tellurite métallique, qui se traduit par un virage du milieu « **GIOLITTI CANTONI** » (GC) au noir ; elles ont la particularité d'utiliser le mannitol présent dans le milieu Chapman avec production d'acide, qui se traduit par un virage du rouge de l'indicateur coloré (rouge de phénol) au jaune ; donnant des colonies pigmentées en jaune. (**Bougreois et Leveau, 1980**).

✓ **Mode opératoire (NF V08-014, 1994)**

La recherche de *Staphylococcus aureus* se fait en deux étapes :

1. Enrichissement

- Prendre aseptiquement 1ml des dilutions décimales dans des tubes contenant 15ml du milieu de GC additionnée de tellurite de potassium.
- Mélanger soigneusement le milieu et l'inoculum.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24 à 48 heures.

✓ **Lecture:**

Les tubes ayant virés au noir sont considérés comme positifs.

2. Isolement

- Les tubes ayant viré au noir, doivent faire l'objet d'une confirmation par isolement sur gélose Chapman préalablement fondue et coulée en boîtes de Pétri et bien solidifiée.
- Incuber les boîtes de Chapmanensemencées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisses, brillantes, pigmentées en jaune.

✓ **Lecture**

Après l'incubation, dénombrer les colonies circulaires, lisses, brillantes et pigmentées en jaune due à la fermentation du mannitol ; comprises entre 30 et 300 colonies.

Les résultats sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g.

***Note :** Si le résultat est positif on procède à la confirmation par l'eau oxygénée pour savoir si les colonies sont pourvues d'une catalase et d'une coagulase.

e) Recherche et dénombrement de salmonelles

✓ **Principe**

Les salmonelles sont des bactéries difficiles à être isolé, vu leur nombre très faible ; pour cela, il est nécessaire de procéder à un pré enrichissement qui permet aux bactéries stressées de récupérer toutes leurs potentialités et à un enrichissement qui favorise leur multiplication (**Larpen, 1997**).

Ce sont des anaérobies facultatifs, ne fermentent pas le lactose mais fermentent le glucose avec production de gaz de l'hydrogène sulfuré (H₂S) à partir de thiosulfate ce qui est traduit par des colonies bleu vertes avec ou sans centre noir.

✓ **Mode opératoire (NF V08-052, 1993)**

❖ **Pré-enrichissement :** il est destiné à revivifier les cellules de façon à faciliter la culture dans les bouillons d'enrichissement sélectif.

- Introduire aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser dans un flacon contenant 225ml de tryptone sel-eau stérile (TSE) constituant ainsi la solution mère.
- Incuber le flacon à 37°C pendant 18 à 24 heures.

❖ **Enrichissement primaire**

- A partir du milieu de pré-enrichissement, prélever un volume de 10ml dans un flacon stérile contenant 100ml de milieu sélectif « **Bouillon Sélénite Cystéine** » (SFB) (D/C+cystéine).
- Incuber le flacon à 37°C pendant 24 heures.
- Le résultat positif se traduit par un virage de la couleur du milieu du jaune au rouge.

❖ **Isolement et enrichissement secondaire**

- A partir du milieu d'enrichissement primaire positif : isoler 0.1ml sur gélose HECTOENE + additif SFB sélénite azide de sodium (une ampoule par flacon de gélose coulée et solidifié dans des boites de Pétri) puis prélever 1ml dans un tube stérile contenant 9ml du SFB (S/C+cystéine) pour un enrichissement secondaires.
- Incuber les boites ainsi que les tubes à 37°C pendant 24 heures.

❖ **Isolement et lecture**

- A partir de milieu d'enrichissement secondaire ; isoler 0.1ml sur gélose HECTOENE + additif SFB sélénite azide de sodium (une ampoule par flacon de gélose coulée et solidifiée dans des boites de Pétri) pour un deuxième isolement.

❖ **Lecture**

Les résultats négatifs signifient l'absence de salmonelle.

- Les colonies Salmonelle apparaissent sur la gélose HECTOENE en couleur bleu verdâtre ou gris bleu avec ou sans centre noire.

f) Recherche et dénombrement des *Clostridium sulfito-réducteurs*

❖ **Principe**

Le genre *Clostridium* est constitué de Bacilles à Gram Positif, Anaérobies Stricts, mobiles, mais parfois immobiles et capsulés.

Ces bacilles subsistent sous forme sporulée lorsque les conditions de vie deviennent défavorables à leur multiplication et font partie pour la plupart de la flore normale intestinale de l'homme et des animaux.

❖ **Mode opératoire (NF V08-056, 1994)**

Au moment de l'emploi et après fusion de la gélose « **Viande-Foie** » (VF), celle-ci est refroidie dans un bain marie d'eau à 45°C. Ajouter une ampoule d'alun de fer et une ampoule de sulfite de sodium (5%).

- Mélanger soigneusement et aseptiquement.
- Prévoir une série de tubes stériles à raison de deux tubes par dilution, répartir aseptiquement 1ml de chaque dilution en doubles.
- Porter les tubes au bain marie à 80°C pendant 10min, puis les refroidir immédiatement sous l'eau de robinet (choc thermique).
- Ajouter environ 15ml de gélose (VF) prête à l'emploi dans chaque tube, et laisser solidifier les tubes sur pailleasse incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures avec une première lecture à 16 heures.

❖ **Lecture**

Les tubes considérés positifs sont ceux qui contiennent les colonies noires de *Clostridium sulfito réducteurs*.

Les résultats sont exprimés en nombre de spore par ml ou g de produit à analyser.

2.2.3 Screening phytochimique

a) Méthode d'extraction pour Screening chimique

La phytochimie qualitative basé sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur les extraits reconstitués à partir de la poudre lyophilisée de chaque échantillon pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les terpènes (**Bougandoura, 2010**).

La méthodologie adoptée pour l'extraction des principaux métabolites de la spiruline est représentée dans les figures 9 et 10.

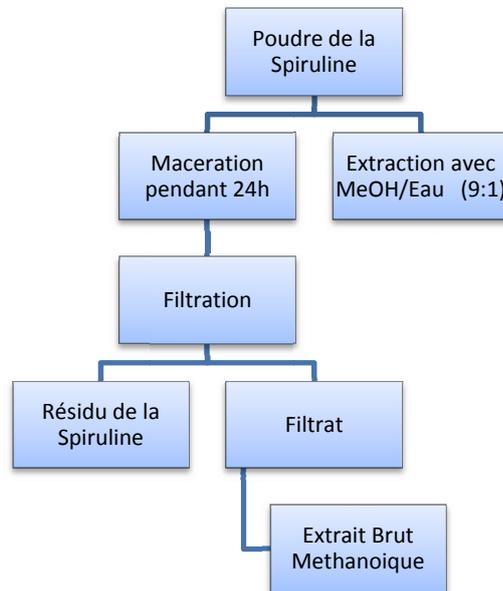


Figure 9. Méthodologie d'extraction méthanolique des principaux métabolites de la spiruline.

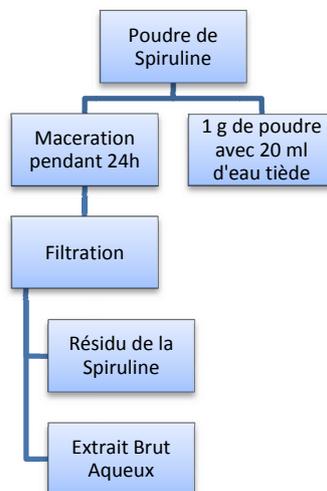


Figure 10. Méthodologie d'extraction aqueuse des principaux métabolites de la spiruline.

b) Détection des métabolites secondaires

1. Test des tanins

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml de l'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl₃. Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en

présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques **(Vijayakumari, 2013)**

2. Test des coumarines

Les coumarines sont révélées à partir de 2 ml d'extrait placé dans un tube est ajouté à 3 ml de NaOH (10%), après agitation de l'extrait, la formation d'une couleur jaune indique la présence de coumarines **(Seladji, 2013)**

3. Test des anthocyanes

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5ml d'extrait dans un tube auquel on ajoute 15 ml d' H_2SO_4 à (10%) (Milieu acide), après agitation, le mélange est ajouté à 5ml NH_4OH à (10%) (Milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu violacée en milieu basique **(Savithramma, 2011)**.

4. Test des flavonoïdes

Un mélange de quelques gouttes de Mg^{2+} et de gouttes d'HCL concentré, placé dans un tube, est ajouté à 2ml d'extrait. L'apparition de la coloration rose, orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes **(Vijayakumari, 2013)**.

5. Test des anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones, 10ml d'extrait sont ajoutés à 5ml de NH_4OH à (10%). Après agitation quelques minutes, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinones **(Samejo, 2013)**.

6. Test des saponosides

Pour la détection des saponosides, 10ml d'extrait placé dans un tube à essais sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides **(Boutalbi, 2014)**.

7. Tests des terpènes

Test des stéroïdes et tri terpènes

Les stéroïdes sont relevés après addition de 5ml d'anhydride acétique à 5ml d'extrait à chaud. Le mélange est ajouté à 0.5 ml d'acide sulfurique concentré. Après l'agitation l'apparition, à

l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis vert, indique une réaction positive (**Boutalbi, 2014**).

8. Test des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10ml d'extrait sont évaporés jusqu'à l'obtention d'un volume de 0.2ml, sur lequel 1.5ml de HCL à (2%) sont ajoutés. Après agitation de la solution acide, 1 à 2 gouttes de réactifs Mayer ou Wagner sont ajoutés. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (**Seladji, 2013**).

c) Métabolites primaires

1. Test de protéine

2 ml de l'extrait aqueux est ajouté 5 à 6 gouttes NaOH à 5%, après agitation on ajoute 5 à 7 gouttes de CuSO₄. L'apparition de couleur violet indique la présence de protéine (**Samejo, 2013**).

2. Test de sucre réducteur

2 ml de l'extrait aqueux, 2ml de solution Fehling (A+B) placé dans un tube porté à ébullition. L'apparition de précipité rouge indique la présence (**Boutalbi, 2014**).

Détermination de la teneur en phycocyanine

La méthode la plus précise pour mesurer la teneur en pigments est la colorimétrie. Soit C % la concentration de spiruline sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %. Nous avons laissé décanter et nous avons prélevé une solution bleue. Puis environ 0,5 à 1 ml de la solution décanté sont dilués avec de l'eau. Avec un facteur de dilution (DIL), en volume. Mesuré par Spectrophotomètre, la densité optique 615, et à 652 nm (**Jourdan, 2012**). Puis calculé le % en poids de phycocyanine par la formule:

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

DIL: le facteur de dilution en volume ;

C : concentration de la spiruline.

2.2.4 Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne a été étudiée sur onze souches (bactéries et champignons).afin de prouvé le pouvoir inhibiteur des extraits de la spiruline sur la prolifération des microorganismes.

a) Préparation des extraits

On a préparé deux extraits aqueux et méthanolique afin de savoir quel est le meilleur solvant et extracteur des composants actifs de la spiruline.

❖ Extrait aqueux:

Pour obtenir un extrait brut de l'*Arthrospira platensis* (Léonard 1964), on effectue une extraction par macération à froid en mettant la matière végétale séchée en contacte avec l'eau distillée **figure (11)**.



Figure 11. Préparation d'extraits aqueux de la spiruline (original 2016).

- Trois macérations ont été effectuées 2% (2g de poudre de spiruline dans 100ml d'eau distillée), 4% (4g de poudre de spiruline dans 100ml d'eau distillée) et 8% (8g de poudre de spiruline dans 100ml d'eau distillée) ;
- La macération a pris 24 h avec agitation magnétique à l'abri de la lumière dans une température ambiante ;
- Filtration sur papier Wattman n°9 ;
- Obtention d'un extrait d'une couleur bleu.

❖ **Extrait méthanolique:**

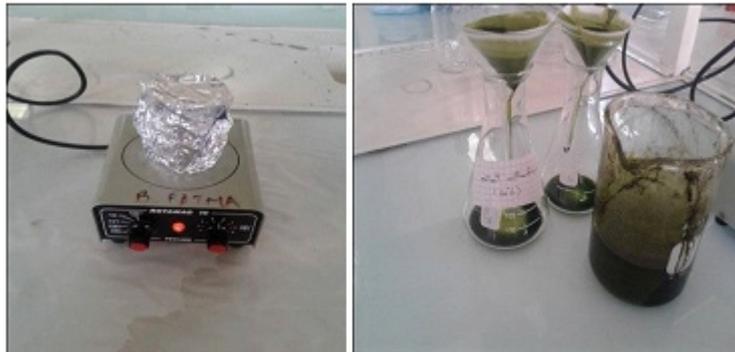


Figure 12. Préparation d'extraits méthanoliques (original 2016).

- Macération de 30 g de spiruline dans 300 ml de méthanol ;
- Agitation magnétique pendant 24 heures ;
- Filtration sur papier Wattman pendant 2 heures ;
- Concentration de la phase organique à sec à l'aide d'un rota vapeur (évaporateur rotatif) ;
- Récupération de l'extrait et évaporation du reste du solvant dans l'étuve à 60°C ;
- Obtention de 4,07g d'extrait méthanolique (**Chbani1 et al.; 2011**).



Figure 13. Récupération et séchage l'extrait méthanolique (original 2016).

❖ **Préparation des dilutions de l'extrait méthanolique :**

- dissoudre l'extrait organique à quatre concentrations : 50mg, 100mg, 200mg et 400mg (qui est le point de saturation pour 1ml de DMSO), et ne les utiliser qu'après 24 heures.

b) Préparation des suspensions bactériennes

Les différentes souches bactériennes sont d'abord repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans l'eau physiologique stérile à une turbidité équivalente à 0,5 **Mc Farland**. De même étape pour les champignons sauf que le milieu qu'on utilisé est **Sabouraud** à une température de 26°C.

Chaque souche à tester devrait être ensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice afin d'obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à 35°C, sélectionnez 4 ou 5 colonies bien isolées avec une aiguille d'ensemencement ou une anse et transférez la colonie dans une solution stérile de sérum physiologique ou un bouillon non sélectif (bouillon Mueller-Hinton) et homogénéisez à l'aide d'un vortex. La suspension bactérienne devrait alors être comparée au standard McFarland 0,5. Cette comparaison peut être faite plus simplement si les tubes sont observés contre une feuille de papier blanc sur laquelle des lignes noires sont dessinées. Le standard McFarland doit aussi être homogénéisé juste avant utilisation. Si nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de sérum physiologique ou de bouillon ou augmentée en ajoutant plus de suspension bactérienne.

c) Application

Préparation des boîtes de Pétrie, en les remplissant avec les milieux de culture : **MH** (MULLER-HINTON) pour les bactéries et le **Sabouraud** pour les champignons et les laisser gélifier. Environ 4 mm de hauteur de milieu de culture.

-Ensemencement des souches de bactéries et champignons à l'aide d'un écouvillon stérile pour chaque souche.

- Imprégnation des disques absorbants de 9 mm avec l'extrait et les disposer à l'aide d'une pince stérile sur les surfaces des boîtes de Pétrie-Incubation des boîtes contenant les souches bactériennes dans une étuve réglée à 37°C et des boîtes contenant les champignons à une étuve réglée à 26°C.

- Lecture des résultats après 12 heures pour les bactéries et 48 pour les champignons qui se traduit par une zone transparente autour du disque.

2.2.5 Activité hypocholestérolémiant

Les lapins sont placés dans une salle bien aérée, à une température ambiante ; suivant un régime alimentaire naturel (salade, orge,..), eau du robinet, le temps de s'habituer à leur nouvel habitat.

Après quelques semaines de leur arrivé (trois à quatre semaines) ; les lapins sont repartis au hasard en trois groupes de cinq, pour l'attribution de nouveaux régimes alimentaires pendant quatre semaines :

- Un groupe A (témoins) : a un régime alimentaire naturel ;
- Un groupe B : alimentation mixte (jaunes d'œuf + spiruline) ;
- Un groupe C : alimentation riche en cholestérol -jaunes d'œuf- (**Cheong et al., 2010**).

Le prélèvement du sang est effectué à l'aide d'une seringue jetable sous l'oreille ; sous supervision d'un vétérinaire, le sang est recueilli dans les tubes à essai est analysé au niveau du laboratoire de l'hôpital de Béni Slimane pour l'analyse du cholestérol.

Le dosage de cholestérol se fait manuellement (technique colorimétrique de Maghreb) suivant ce protocole:

- ✓ Centrifugation des échantillons à 3000 tours /min (tpm) ;
- ✓ On met 1CC du blanc dans les tubes de dosage ;
- ✓ Le premier tube, le blanc seulement ;
- ✓ Le deuxième tube, on ajouté 10 µl de l'étalon ;
- ✓ Les autres tubes =blanc+ 10 µl de sérum ;
- ✓ Incubation des tubes dans le bain marie pendant 5 minutes ;
- ✓ Le spectromètre pour la lecture de taux du cholestérol dans le sang.

a) Etude statistique

La statistique est l'étude de la collecte de données, leur analyse, leur traitement, l'interprétation et leur présentation afin de rendre les données compréhensibles par tous. C'est à la fois une science, une méthode et un ensemble de techniques. Dans notre cas nous avons choisi d'appliquer le test de Mann-Whitney ; un test non paramétrique, comparant deux échantillons indépendants de petite taille.

La loi de Mann-Whitney suit la formule suivante :

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \quad U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$
$$U = \min(U_1, U_2)$$

Sachant que :

U : le test de Mann-Whitney

n_i : le nombre de l'effectif au sein du lot_i

R : le rang c'est-à-dire, l'ordre dans lequel apparaissent les observations des deux échantillons lorsqu'ils sont réunis et triés.

Et

- On considère que le $U_{critique}$ est égal à 2.

- On a $n_1=n_2=n_3=5$

Et

Si U est inférieur au $U_{critique}$ on considère qu'il y a un changement

Si U est supérieur au $U_{critique}$ on considère qu'il n'y a pas de changement

Chapitre 3 Résultats et Discussion

3.1 Résultats et discussion

3.1.1 Culture artisanale de la spiruline

L'identification de l'espèce a été faite en **juillet 2016** au niveau du (CNRDPA) à Bousmail (Tipaza). Par observation sous microscope optique de la souche *Arthrospiraplatensis* à différents grossissements.

- **Grossissement 400**



Figure 14. observation de la spiruline sous microscope optique G× 400 (Original, 2016).

- **Grossissement 1000**

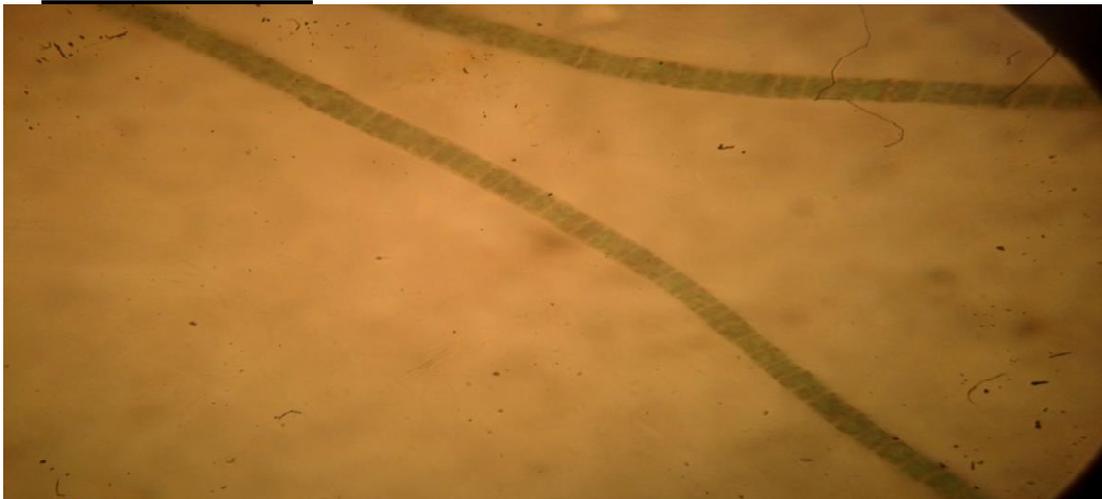


Figure 15. Observation de la spiruline sous microscope optique G× 1000 (Original, 2016).

La souche identifiée appartient au genre d'*Arthrospira* de type droit (M2). Les filaments obtenus lors de l'identification ressemblent à ceux enregistrés dans les clichés au CNRDPA et aussi à ceux trouvés par :

- 1- Mr Ali Saggai (LABO ECOSYSTEMES UKM OUARGLA) 12/12/2007 et 06/01/2008.
- 2- Antenna technologie, 2005.
- 3- Melle Afafe Djaghoubi (université kasdi Merbah à Ouargla).

De récents travaux portant sur la biologie moléculaire de la spiruline ont démontré l'extrême homogénéité génétique des diverses espèces de la spiruline (Nelissen *et al.*, 1994 ; Scheldeman *et al.*, 1999 ; Manen *et al.*, 2002). Il est bien établi que la variation de conditions de culture provoquent facilement de forts changements dans la composition biochimique des spirulines. Les différences de teneur en protéines, en lipides, en vitamines ou en minéraux entre telle et telle espèce de spiruline sont, probablement, bien plus liées aux conditions de croissance de chaque échantillon qu'à d'hypothétique spécificité génétique.

3.1.2 Résultats du contrôle microbiologique

Les analyses effectuées sur la poudre de spiruline utilisée montrent une conformité avec les normes établies en France, l'absence des germes d'indice de contamination fécale (coliformes fécaux, coliformes totaux) et une absence totale des germes pathogènes (*Clostridium sulfito-réducteur*, *Salmonelles*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobactéries*) et absence des germes d'altération (levures et moisissures), indiquant que l'échantillon ne présente aucun danger pour le consommateur.

Tableau 7. Résultats de l'analyse microbiologique

Germes recherchés	Résultat d'analyse	Normes françaises
Germes totaux	Absence	<10000
Coliformes totaux	Absence	-
Coliformes fécaux	Absence	<10
Clostridium sulfito réducteurs	Absence	<100
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	<100
Salmonelle	Absence	Abs/25g
Levures et moisissures	Absence	-

La bonne qualité microbiologique de la spiruline sèche est due à la nature alcaline élevée de son milieu de culture qui constitue une barrière contre la plupart des contaminations; cette bonne qualité indique aussi que notre poudre spiruline (*Arththrospira plantensis*) est fabriquée dans de bonnes conditions d'hygiène.

3.1.3 Screening phytochimique

Tableau 8. Résultat du screening phytochimique

Métabolites	Polyphénols	Extraits		
		méthanolique	Aqueux	
Secondaires	Tanins	+	+	
	anthroquinones	-	-	
	Flavonoïdes	+	+	
	Anthocyanes	-	-	
	Coumarines	-	-	
	Saponosides	+	+	
	Terpènes	Stéroïdes	+	+
	Alcaloïdes		+	+
Primaires	Sucres réducteurs	-	-	
	Protéines	+	-	

Les résultats de criblage chimique sont obtenus à partir de poudre épuisés par l'eau, et le méthanol. La recherche, des anthraquinones, des composés réducteurs, des anthocyanosides, sont négative mais celle de flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes été positive.

Il est à signaler que les saponosides, les stérols et stéroïdes et protéines sont présents en forte quantité dans la spiruline. D'autre part, les coumarines sont des classes de familles chimiques totalement absentes dans la spiruline.

La présence des principaux métabolites secondaires chez la spiruline suggère une activité photosynthétique et énergétique, comparable à celle des plantes.

Le criblage réalisé a permis de constater la présence des cinq grands groupes chimiques, les tanins, les flavonoïdes, les stérols et stéroïdes et les saponosides, alcaloïdes.

Anbarasan et al. (2011) ont rapporté la présence des mêmes classes de familles chimiques retrouvées au niveau la spiruline.

Phycocyanine

D'après nos résultats obtenus la phycocyanine représente une valeur de $10,62 \pm 0,01\%$ soit ($10,62 \pm 0,01\text{mg/g}$). Cette valeur est similaire à celle trouvé par **Jourdan (2012)** dont la valeur est de 10 % de la spiruline sèche.

Spirulina platensis est une excellente source de phycocyanine. La phycocyanine aurait une activité antitumorale. Elle induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses (**Li et al., 2006**), aurait une activité antioxydante et un rôle d'hépatoprotection. En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel (**Chopra et Bishnoi, 2007**). Phycocyanines constituent environ 15-25 % du poids sec des microalgues (**Bermejo et al., 1997; Romay et al., 2003**). la phycocyanine de la Spiruline conduit à la protection des îlots pancréatiques, la diminution de la glycémie à jeun. Elle est caractérisée par la capacité anti-oxydante totale de maintenir et diminuer le cholestérol et les triglycérides (**Downham et Collins, 2000 ; Ou et al., 2012**).

3.1.4 Activités Biologiques

a) Activité antimicrobienne

✓ Rendement de l'extrait aqueux :

L'extrait aqueux initial de 2% s'est réduit après filtration à la moitié, donc 100ml nous à donner 50ml de ce même extrait.

✓ Calcul du rendement de l'extrait méthanolique :

$$Rd = \frac{m_1 \times 100}{m_2} = \frac{4.07 \times 100}{30} = 13.57\%$$

m1 : la masse de l'extrait sec avant évaporation.

m2 : la masse de la matière végétale sèche.

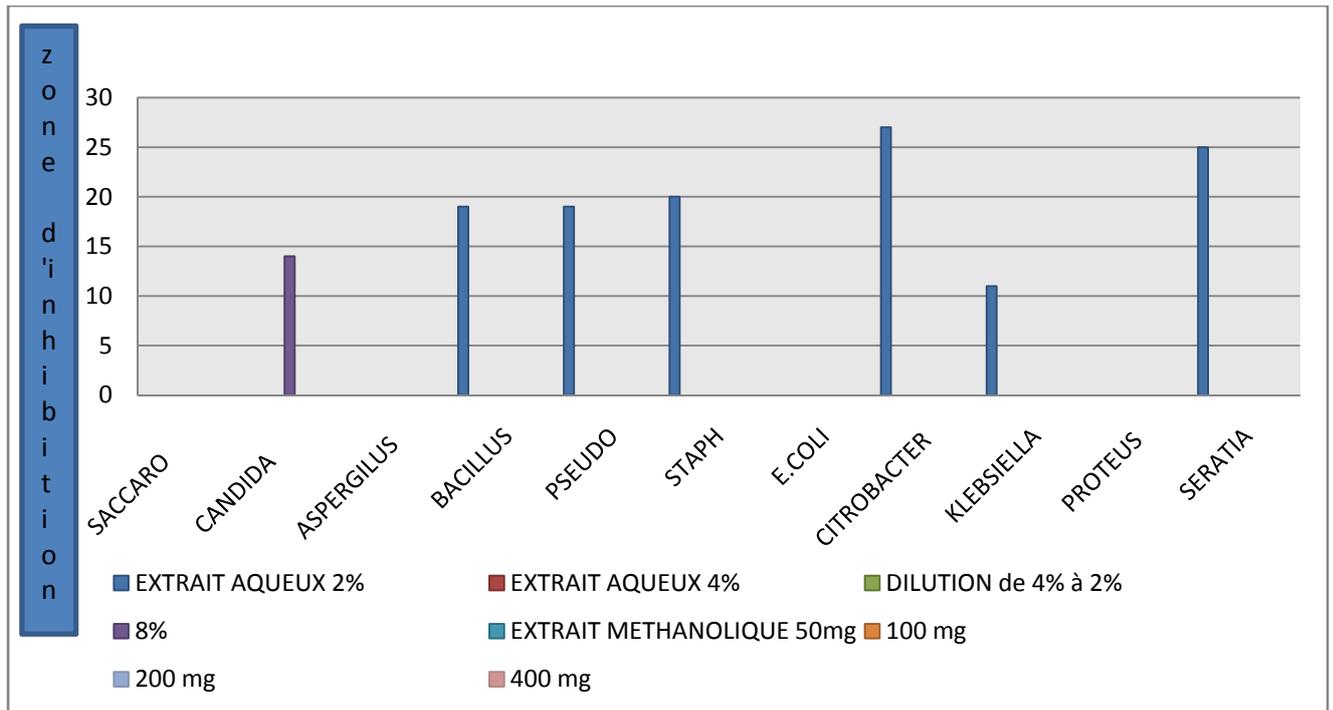


Figure 14. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits de spiruline.

Les résultats obtenus dans notre travail montrent que les souches qu'on a étudié sont sensibles aux l'extrait aqueux par une zone de diamètre maximal de 27 mm et une zone minimal de 11 mm pour la concentration de 2% (2g dans 100ml d'eau distillé) pour le *Bacillus sbtilis*, *Pseudomonas aeugenosa*, *Stahylococcus aureus*, *Citrobacter Freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia marcescens*; alors que la *Candida albicans* s'est montré plus résistance jusqu'à la concentration de 8% (8g dans 100ml d'eau distillée).par contre dans les boites contenant les disques imbibés des extraits méthanolique on ne remarque aucune zone d'inhibition.

Certains études comme **Sahreen et al., (2010)** montrent que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques.

Les souches étudiées montrent une résistance à l'extrait méthanolique et non pas aqueux de la même cyanobactérie, Cette différence serait due au fait que la sensibilité d'un microorganisme à un extrait dépend non seulement de l'extrait, mais aussi du microorganisme lui-même et de l'environnement où se situe l'action (**Meyer et al., 1988**)

Ces résultats sont proches de ceux de **Boutalbi, (2014)** qui enregistre que la plus faible activité antibactérienne est celle de l'extrait méthanolique.

L'étude microbiologique présente montre que la spiruline a un effet sur les bactéries Gram positif et bactérie Gram négatif et les champignons.

Chez les champignons la spiruline n'a eu un effet antifongique que sur la *Candida albicans*, ces résultats sont similaires à ceux de **El-Baz, (2013)**

Des 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 et al., 2006**) et d'autres composés volatiles tels que les polyphénols (**Herrero et al., 2006**)

L'activité antibactérienne des métabolites extracellulaires a été identifiée chez d'autres cyanobactéries (*Nostoc commune*). Ce travail montre que cette activité est également présente chez *Arthrospira platensis*. Elle serait cependant modérée en comparaison aux antibiotiques usuels, tels que la kanamycine. Toutefois, il faut rappeler que ces métabolites sont efficaces dans des traitements locaux d'infections épidermiques (oedème et eczéma), dans les utilisations traditionnelles par les peuplades du Ghanem au lac Tchad. (**Brouers, 2004**)

b) Résultats de l'évaluation de l'activité hypocholestérolémiante

Les analyses des échantillons sanguins ont été effectuées au niveau de l'hôpital par la technique Biomaghreb (**Annexe**)

Nous avons réalisé un prélèvement sanguin pour mettre en évidence le paramètre hématologiques des lapins des trois lots (lot 1 témoin, lot 2 avec un régime alimentaire riche en jaune d'œufs et le lot 3 avec un régime alimentaire enrichi de jaune d'œufs plus la spiruline en même temps.

Les résultats de la mesure du taux de cholestérol dans le sang de chaque lapin des trois lots sont :

	lapin 1	lapin 2	lapin 3	lapin 4	lapin 5
lot 1	1,90	2,01	2,10	1,85	1,80
lot 2	2,50	2,66	3,03	2,87	2,53
lot 3	2,00	1,86	1,95	2,01	2,00

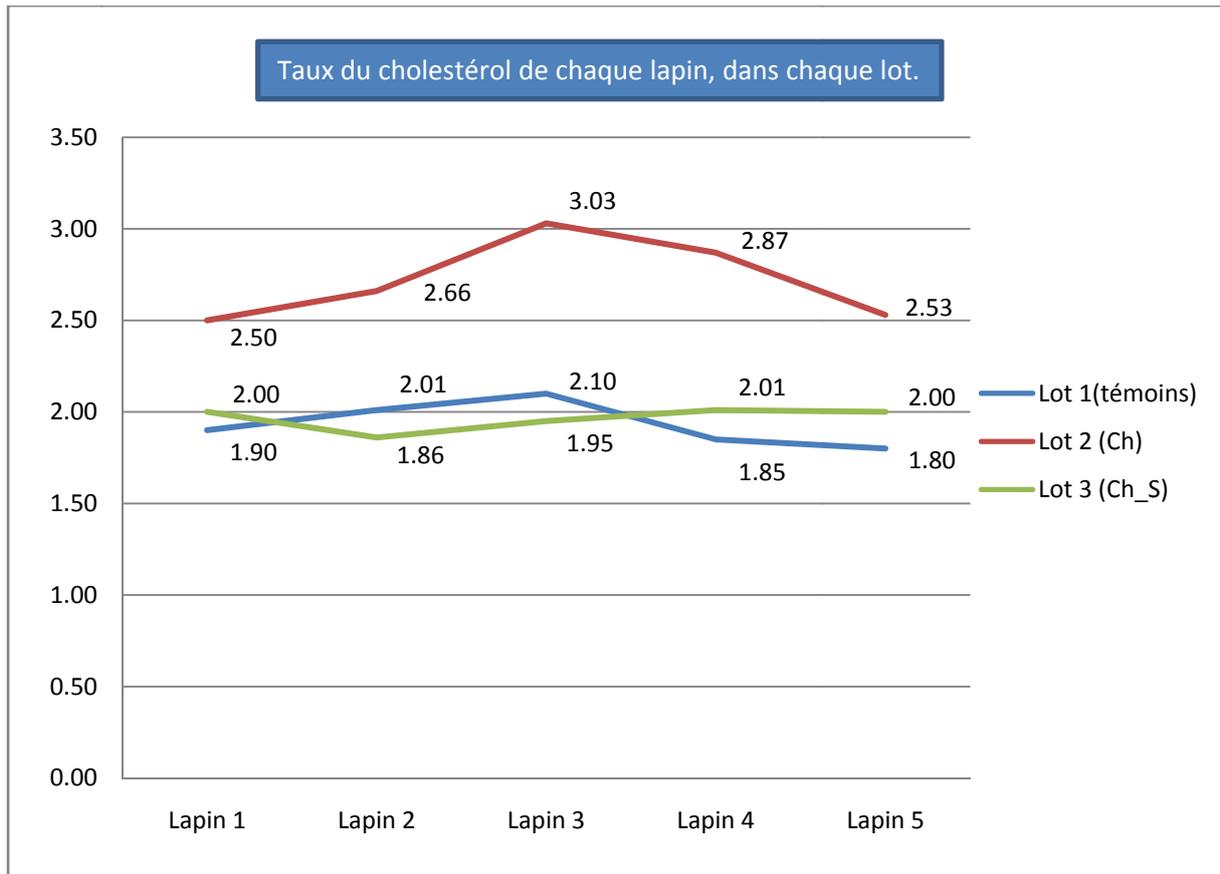


Figure 15. Résultats de l'activité hypocholestérolémiant

On peut remarquer que les résultats du lot témoin et le lot de lapins ayant pris la spiruline sont très proches dont les valeurs sont comprises entre 1,86 et 2,01 g/l ; lors que ceux du deuxième lot sont plus élevés allant de 2,50 jusqu'à 3,03 g/l.

Les résultats du test statistique Mann-Whitney appliqué entre les lots : 1 et 2 ; 1 et 3 ; 1 et 3 selon la formule suivante sont :

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \quad U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

$$U = \min(U_1, U_2)$$

Ranks	lapin 1	lapin 2	lapin 3	lapin 4	lapin 5	
lot 1	3,00	4,00	5,00	2,00	1,00	R1=15
lot 2	6,00	8,00	10,00	9,00	7,00	R2=40

$$U1=40-15=25$$

$$U2=40-40=0$$

$$U=\min(25,0)=0 < 2$$

U est inférieur au $U_{critique}$ on considère qu'il y a un changement, c'est-à-dire que, lors de l'attribution des jaunes d'œufs à l'alimentation du lot 2, le taux de cholestérol a augmenté par rapport au lot 1 témoin.

Ranks	lapin 1	lapin 2	lapin 3	lapin 4	lapin 5	
lot 1	4,00	8.5	10,00	2,00	1,00	R1=25.5
lot 3	6.5	3,00	5,00	8.5	6.5	R3=29.5

$$U1=40-25.5=14.5$$

$$U3=40-29.5=10.5$$

$$U=\min(14.5,10.5)=10.5 > 2$$

U est supérieur au $U_{critique}$ on considère qu'il n'y a pas de changement, c'est-à-dire que, quand nous avons ajouté les jaunes d'œufs plus la poudre de spiruline à l'alimentation du lot 3 le taux de cholestérol ne varie presque pas par rapport au lot 1 témoin.

Ranks	lapin 1	lapin 2	lapin 3	lapin 4	lapin 5	
lot 3	3.5	1,00	2,00	5,00	3.5	R3=15
lot 2	6,00	8,00	10,00	9,00	7,00	R2=40

$$U3=40-15=25$$

$$U2=40-40=0$$

$$U=\min(25,0)=0 < 2$$

U est inférieur au $U_{critique}$ on considère qu'il y a un changement, c'est-à-dire que, l'ajout de la poudre de spiruline à l'alimentation des lots 2 et 3 ayant tous les deux pris les jaunes d'œufs à fait une différence en stabilisant le taux de cholestérol chez le lot 3

La spiruline contribue par son effet antioxydant à une meilleure répartition du cholestérol entre les HDL (cholestérol non oxydé protecteur) et les LDL (cholestérol oxydé athérogène) et les VLDL (lipoprotéine de très basse densité). Plusieurs études ont démontré que l'absorption de la spiruline, avec son fort taux d'acide gamma linoléique, engendrait une diminution du cholestérol et une baisse significative de dépôts graisseux dans les artères. Un bienfait de la cyanobactéries prouvé par plusieurs études comme (**Park *et al.*, 2008**) (**Parikh *et al.*, 2001**)

La spiruline est doué d'une activité hypercholestérolémiant; du fait de sa contenance en acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga_3 et oméga_6 prévenant ainsi l'accumulation du cholestérol dans l'organisme. Ceci pourrait explique en partie la diminution des taux de cholestérol en triglycéride. Vérifier par **Ramamoorthy et Premakumari (1996)** a réalisé une étude sur 30 personne volontaires présente une hypercholéstéremie sévère une associé à une HTA de degré modéré. Ils ont reçu 4,5 gr de la spiruline par jour pendant 8 semaines sans modifier leur régime alimentaire habituel. Le taux de cholestérol diminue de 4,5 %, le taux de LDL baisse de 6,1% sans perte pondéral.

Conclusion générale

- La présente étude a porté sur une cyanobactérie, qui a attiré l'attention des chercheurs pour le bénéfice qu'elle apporte comme complément alimentaire en premier lieu, puis pour ses vertus thérapeutiques : *l'Arthrospira platensis* (Spiruline).

Nous avons présenté un test de culture artisanal de la spiruline, qui à abouti à une poudre prête à l'utilisation directe dans l'étude et à la maîtrise de ce type d'aquaculture.

Le contrôle microbiologique a montré que la poudre est propre à la consommation.

Le screening phytochimique basé sur des spécifiques colorimétriques révèle la présence de métabolites primaires et secondaires (tanins, alcaloïdes, flavonoïdes et protéines...) ce qui lui confère ses propriétés thérapeutique.

Par ailleurs les résultats du test pharmacologique de l'extrait aqueux et méthanolique de la spiruline à mis en évidence :

- Un pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux à 2% inhibant ainsi le développement des souches : *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Cerratia marcescens* , alors que, la *Candida albicans* n'a cessé de croître qu'à la concentration de 8% .

L'effet hypocholestérolémiant testé sur la poudre de spiruline (consommé directement) à été prouvé par une dose journalière de spiruline.

Notre perspective d'avenir est d'étudier chaque extrait séparément puis isoler, purifier et identifier les différents composés qui existent et tester leurs activités anti oxydantes et biologiques.

Annexe

- **Matériels utilisés**

- Agitateur magnétique ;
- Bain marie ;
- Becbenzène ;
- Becher 50ml, 200ml et 250ml ;
- Boîtes de Pétri ;
- Burette ;
- Capsule en porcelaine ;
- Centrifugeuse ;
- Coupelle en aluminium ;
- Dessiccateur ;
- Distillateur ;
- Ecovion ;
- Eprouvette ;
- Etuve ;
- Etuveréglable à 25°C ;
- Etuveréglable à 37°C ;
- Fiol conique de 150ml ;
- Flacon stériles de 250 ml en verre ;
- Frigo à 6°C et 12°C ;
- Papier filtre ;

- Pince métallique ;
- Pipette, spatule, mortier, bécher ;
- Pipettes de 1 ml à usage bactériologique ;
- Portoirs ;
- Tubes à essai.

Appareillages et autres

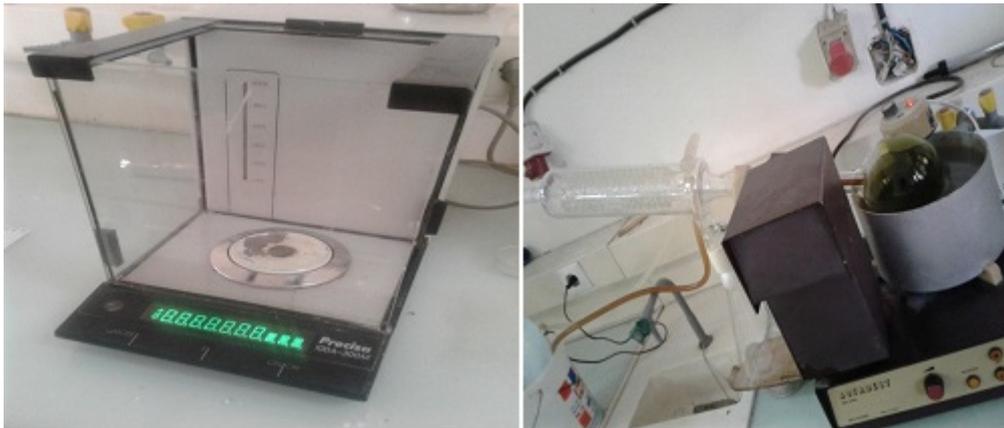


Fig1. Balance électronique (à gauche), Rota - Vap (à droite).



Fig2. Spectrophotomètre (à gauche), Centrifugeuse (à droite).

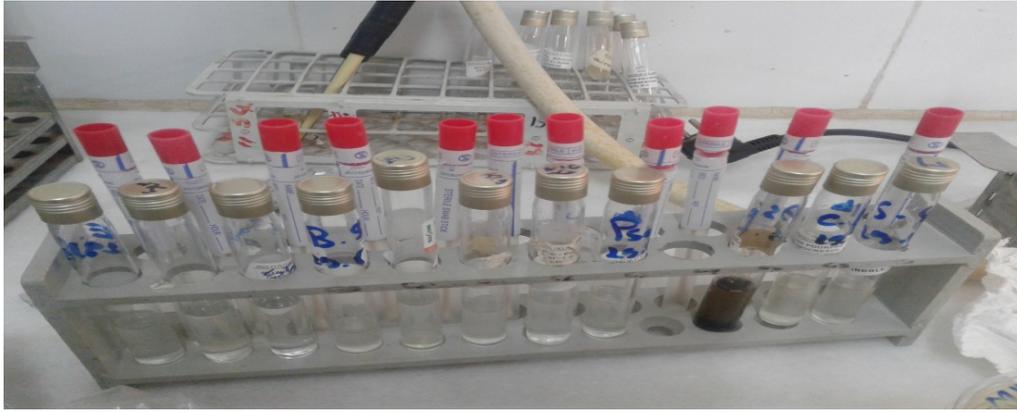


Fig3. Préparation des suspensions bactérienne.



Fig4. Les lapins utilisés pour l'évaluation de l'activité hypocholestéromiante.



Fig5. Préparation des extraits (aqueux et méthanoliques) de la spiruline.

Composition des milieux de cultures et solutions

- **TSE (Tryptophane-sel-eau)**

- Tryptone1g.
- Chlorure de sodium.....8, 5g.
- Eau distillée.....100g.
- pH=7,2.

- **Gélose PCA (Gélose glucosé à l'extrait de levure ou Plate Count Agar) pour le dénombrement des GAMT**

- Peptone de caséine.....5g/l.
- Extrait de levure.....2,5g/l.
- Glucose1g/l.
- Agar.....18g/l.
- pH=7.

- **VF : Gélose viande foie pour le dénombrement des germes aérobies sulfite réducteurs**

- Base viande foie30,0 g.
- Glucose..... 2,0 g.
- Agar6,0 g.
- Eau1000 ml.
- pH = 7,4.

- **GC :GiollitiCantonii milieu d'enrichissement pour les staphylococcus aureus**

- Tryptone..... 10,0g.

- Extrait de viande..... 5,0g.
- -Extrait autolytique de levure5,0g.
- Glycine1,2g.
- Mannitol..... 20,0g.
- Pyruvate de sodium..... 3,0g.
- Chlorure de sodium5,0g.
- Chlorure de lithium5,0g.
- Tween 80..... 1,0g.
- pH= 6,9 ± 0,2.

• ***Chapman milieu pour confirmation de la présence des staphylococcus aureus***

- Peptone.....11, 0 g.
- Extrait de viande.....1, 0 g.
- Chlorure de sodium.....75 g.
- Mannitol.....10, 0 g.
- Rouge de phénol.....0, 0025 g.
- Agar.....15 g.
- Eau distillée.....1000 ml.
- pH.....7, 4.

• **SFB (Sélénite – cystine) Milieu sélectifs d'enrichissement des *Salmonelle***

- Composition pour la préparation d'un litre de milieu.
- Peptone.....5 g.
- Lactose.....4 g.
- Hydrogéo sélénite de sodium.....4 g.

- Hydrogéno-orthophosphate dissodique10 g.
- Eau distillée.....1000 ml.
- pH=7

- **Hektoen pour l'isolement des *Salmonelle***

- Composition pour la préparation d'un litre de milieu :
- Peptone trypsique de viande.....12 g.
- Extrait autolytique de levure3 g.
- Lactose.....12 g.
- Saccharose..... 12 g.
- Salicine.....2 g.
- Chlorure de sodium.....5 g.
- Thiosulfate de sodium.....5 g.
- Citrate ferrique ammoniacal.....1,5g.
- Bleu de bromothymol.....0.065 g.
- Fuchsine acide.....0.04 g.
- Sels biliaires.....1.5 g.
- Agar.....13, 5g.
- Eau distillée.....1 000 ml.
- pH =7,6

- **Gélose agar viande foie**

- Extrait de viande foie10g
- Glucose10g
- Amidon.....50g

- Gélose.....15g
- Peptone.....20g
- Eau distillée.....1000ml
- pH =7

- **Bouillon VBL (Bouillon Lactosé bilié au Vert brillant)**

- Peptone10g
- Lactose10g
- Vert brillant..... 0.0133g
- Eau1000ml
- pH =7 à 25 °C

- **Réactif de Kovas**

- Diméthylamino-benzaldéhyde5g
- Méthyle-3-butanol-175ml
- Acide chlorhydrique à 3725ml

- **Milieux de YeatextractGlucose Chlormpheniol (YGC)**

- Extrait de10g
- Glucose10g
- Chloramphénicol0,01
- Agar Agar15,00
- pH =6,6 à 0,2 à 25°C

Tab 1. Composition de la spiruline (Girardin ; 2005)

Compositions	Rôle	Carence
Protéines végétales	<p>70 % du poids sec, avec tous les AA, y compris les AAE et les acides aminés soufrés méthionine et cystéine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Croissance et entretien des cellules. - Responsable de la contraction musculaire. - Rôle enzymatique pour diverses réactions dans l'organisme. - Rôle hormonal ex : insuline. - Rôle immunitaire : immunoglobuline et anticorps. - Bon état des os, de la peau, tendons, cartilages, épiderme, ongles, cheveux 	<p>Perte de poids. - Tube digestif : anorexie, dysphagie, diarrhée, constipation. - Dysfonctionnement : asthénie, diminution de capacités à l'effort. - Notion de maladie chronique</p>
Glucides	<p>15 à 25 % du poids sec, très peu de glucides simples, surtout des glucides complexes sous forme de polysaccharides membranaires aux propriétés immunostimulantes</p>	
Lipides	<p>jusqu'à 11 % maximum du poids sec, à noter la présence d'acide gamma-linolénique, AGE (acides gras essentiels) du groupe des oméga 6, précurseur des prostaglandines, des leucotriènes et des thromboxanes, médiateurs chimiques impliqués dans les processus immunitaires et inflammatoires</p>	
Bêta-carotène(ou provitamine A)	<p>jusqu'à 1 800 mg par kilo, il participe au mécanisme de la vision, au métabolisme de la peau, au système immunitaire. C'est aussi un antioxydant particulièrement efficace</p>	<p>sécheresses et démangeaison des yeux - diminution de vision nocturne</p>
Vitamines du	<p>ces co-facteurs sont tous présents</p>	

groupe B	dans la spiruline, impliquée dans tous les métabolismes, la synthèse des hormones et enzymes, la transmission de l'influx nerveux, la production d'énergie, le système immunitaire	
B1 (thiamine)	vitamine de l'effort - permet la transformation en énergie des aliments - indispensable au fonctionnement des muscles notamment cardiaque - transmission de l'influx nerveux - équilibre psychique - croissance de l'enfant	fatigue - irritabilité - trouble de la mémoire - confusion verbale - fourmillement, engourdissement - faiblesse musculaire
B2 (Riboflavine)	transformation en énergie, lipide, protide, glucide - bon état de la peau et des muscles	trouble oculaire - perte des cheveux - amaigrissement, glossite
B3 (Niacine:PP)	élaboration de plusieurs hormones - bon état de la peau et du tube digestif	fatigue - Trouble digestif : nausée, vomissement - Anorexie
B5 (acide pantothémique)	transformation en énergie, lipide, glucide - renouvellement de la peau, muqueuse et cheveux - bon fonctionnement des muscles, nerfs.	fatigue - Trouble digestif : nausée, vomissement - Anorexie
B6 (pyridoxine)	régulation des fluctuations hormonales féminines - bon fonctionnement du système nerveux	règles douloureuses - troubles psychiques
B7 (choline)	constituant des tissus nerveux et cérébral	
B8 (biotine)	bon état de la peau et des cheveux	
B9 (acide folique)	protection du système nerveux - formation de globule rouge	fatigue - anorexie - anémie
Vitamine	on ne la trouve que dans	- entretien des anémie

B12(cyanocobalamine)	la viande rouge. Elle est indispensable à la fabrication des globules rouges	tissus nerveux	
C (acide ascorbique)	stimule le système immunitaire, antioxydant - favorise l'assimilation de fer et du calcium - contraction musculaire et contrôle de l'ossification action sur la cicatrisation		
D (calciférol)	bon fonctionnement du cœur et de la coagulation sanguine - bon état des os et des dents - régulation du taux de calcium et de phosphore	carence en calcium - décalcification	
Vitamine E ou tocophérol	anti-oxydant puissant - Action protectrice contre les effets nocifs de la pollution atmosphérique et du tabagisme.	fatigue - trouble neuromusculaire - anémie	
F (acides gras essentiels)	processus hormones et enzymatiques - bon état des membranes cellulaires - régulation du système nerveux	effets du cœur, foie, reins - perte des cheveux	
K	- anti-hémorragique	- hémorragie	
Minéraux Calcium + Magnésium + phosphore	Santé des muscles : construction et entretien - transmission de l'influx nerveux - fonctionnement normal de muscles		
Phosphore	production d'énergie au niveau cellulaire - favorise l'action de certaines vit B	sensibilité accrue aux infections et une anémie	
Magnésium	transformation en énergie des aliments - constitution de nouvelle cellule - relâchement des muscles	fatigue, crampes - manque d'appétit - insomnies, allergie - hypertension artérielle, une apathie	
Calcium	coagulation sanguine - essentiels aux productions métaboliques	douleur et crampe musculaire - ostéoporose - caries	

		dentaires - hypertension artérielle - trouble de comportement - ralentissement de la croissance
Fer	élaboration de globule rouge	anémie se manifestant par : . fatigue manque de résistance aux maladies. dyspnée d'effort. ulcération de la langue, altération des ongles. ralentissement de la croissance. problème d'apprentissage (difficulté à se concentrer)
Zinc	bon fonctionnement du système immunitaire - antioxydant - formation des hormones et des enzymes - croissance et division cellulaire - Bonne santé de la peau et des phanères - cicatrisation des tissus - développement sexuel - vie sexuelle normale	affaiblissement du système immunitaire - infections, insomnies, allergies - ralentissement de la cicatrisation - chute des cheveux - tâche blanche sur les ongles - éruption cutanée - mauvais vision

		nocturne - impuissance, stérilité, retard de maturité sexuelle - cycle menstruel irrégulier
Cuivre	entre dans la composition de nombreux enzymes et de mélanine - synthèse de cartilage et de collagène - antioxydant	
Sodium	Croissance et travail musculaire	crampes - sécheresse de la bouche - nausée - vomissement - baisse de la tension artérielle
Potassium		fatigue - trouble musculaire - ralentissement des réflexes - arythmies cardiaques - problèmes respiratoires
Bore	réduction de perte urinaire de calcium et de magnésium	rupture de l'équilibre entre le calcium, magnésium et le phosphore - fragilisation des os - hyper tension artérielle
Sélénium	antioxydants - stimulation de l'immunité avec la vitamine E - protection contre maladie cardiovasculaire	fatigue - hypersensibilité aux infections -

		vieillessement précoce - stérilité - augmentation des risques cardio- vasculaire
Chlorophylle	détoxiquant et purifiante	
Phycocyanine	active sur le fonctionnement de la moelle osseuse	

Tab 2. Tableau récapitulatif des résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

	<i>SACCARO</i>	<i>CANDIDA</i>	<i>ASPERGILUS</i>	<i>BACILLU S</i>	<i>PSEUD O</i>	<i>STAPH</i>	<i>E.COLI</i>	<i>CITROBACTER</i>	<i>KLEBSIELLA</i>	<i>PROTEUS</i>	<i>SERATIA</i>
EXTRAIT AQUEUX 2%	0	0	0	19	19	20	0	27	11	0	25
EXTRAIT AQUEUX 4%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DILUTION de 4% à 2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8%	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EXTRAITMETH ANOLIQUE50m g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Biomaghreb

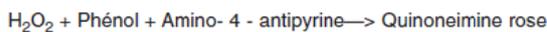
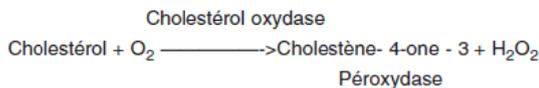
PRESENTATION

Réf. 20111, (360 Tests) R1: 3 x 120 ml R2: 3 flacons (lyoph) R3: 1 x 5 ml	Réf. 20115, (600 Tests) R1 : 6 x 100 ml R2 : 6 flacons (lyoph) R3 : 2 x 5 ml	Réf. 20112 (120 Tests) R1 : 4 x 30 ml R2 : 4 flacons (lyoph) R3 : 1 x 4ml	Réf. 20118 (600 Tests) R1 : 5 x 120 ml R2 : 5 flacons (lyoph) R3 : 2x 5ml
--	---	--	--

PRINCIPE

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinoneimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino 4 antipyrine en présence de phénol et de peroxydase.

Détermination enzymatique selon les réactions suivantes :



La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol.

REACTIFS

Réactif 1	Pipes pH 6.9	90 mmol/l
Solution tampon	Phénol	26 mmol/l
Réactif 2	Cholesterol oxydase	300 U/l
	Peroxydase	1250 U/l
	Cholesterol esterase	300 U/l
	Amino-4-antipyrine	0.4 mmol/l
Réactif 3		200 mg/dl
Standard		2 g/l
		5.17 mmol/l

PREPARATION ET STABILITE

Dissoudre le contenu d'un flacon de R2 avec un flacon de tampon R1.

Le réactif de travail est stable : 1 mois à 20 - 25°C
4 mois à 2 - 8°C

ECHANTILLONS

Sérum

Plasma recueilli sur héparine

MODE OPERATOIRE

Longueur d'onde :505 nm (500 - 550)

Température :37°C

Cuve :1 cm d'épaisseur

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

CHOLESTEROL

Test enzymatic colorimétrique (CHOD- PAP)

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10 µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger, lire les densités optiques après une incubation de 5 min. à 37° C.
La coloration est stable 30 minutes.

CALCUL

$$\text{Cholesterol} = \frac{\text{D.O. Echantillon}}{\text{D.O. Standard}} \times n$$

mg/dl : n = 200

g/l : n = 2

mmol/l : n = 5,17

LINÉARITÉ

La méthode est linéaire jusqu'à 6 g/l (600 mg/dl - 15.4 mmol/l). Si la concentration en cholestérol est supérieure à 6 g/l, diluer l'échantillon au 1/2 avec une solution de NaCl à 9 g/l et refaire le test. Multiplier le résultat par 2.

VALEURS USUELLES

Sérum, plasma	3,6 à 5,7 mmol/l
	1,4 à 2,2 g/l
	140 à 220 mg/dl

BIBLIOGRAPHIE

Trinder P., Ann. Clin. Biochem. 6, 24 (1969)
Richmond, Clin. Chem. 19, 1350 (1973)
Fasce C.F., Clin. Chem. 18901 (1982)

Fig 6. La technique Biomaghreb du Cholestérol

Tab 3. Taux de cholestérol des échantillons sanguins des lapins testés après induction de hypercholestérimie.

	Lapin 1	Lapin 2	Lapin 3	Lapin 4	Lapin 5
Lot 1(témoins)	1,90	2,01	2,10	1,85	1,80
Lot 2 (Ch)	2,50	2,66	3,03	2,87	2,53
Lot 3 (Ch_S)	2,00	1,86	1,95	2,01	2,00

Bibliographie

1. **Antenna technologie**, 1984, Denis von der Weid a créé l'association Antenna International en, un réseau d'avocats pour la défense des droits de l'homme.
2. **Anbarasan V., Kishor Kumar V., Satheesh Kumar P., Venkatachalam T., 2011**, In vitro evaluation of antioxidant activity of blue green algae *S. platensis*. *Int J Pharm Sci Res.* 2011;2(10):2616–2618.
3. **Andrean C.G., 2011**, _ La spiruline : une solution nutritionnelle pour la planète et de multiples vertus.
4. **Ariel A ., 2003**, Quel avenir pour la spiruline ? institut national des sciences et techniques de la mer. Mémoire bibliographique .Association de Ressource et de Développement des Activités et Métiers de l'environnement. Univ Montpellier II. Paris
5. **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.*
6. **Baba Aissa F., 2000** Encyclopédie des plantes médicinales flore d'Algérie et du maghreb, substances végétales d'Afrique d'orient, Edition librairie moderne Rouiba.
7. **Babadzhanov S., Abdusamatova N., Yusupova F. M., Faizullaeva N., Mezhlumyan L. G. , Malikova M. Kh., 2004**, Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, Volume 40, Issue 3, pp 276–279
8. **Banks J., 2007**, Etudier la faisabilité de la mise en place d'une filière spiruline sur le site du Palacret, dans les Côtes d'Armor (22).
9. **Belouad A., 1998**, les plantes médicinales d'Algérie, office de publications universitaires 277p.
10. **Berguey S., 1994**, Bergey's manual of determinative bacteriology. ed : ninth pp1711_1807.
11. **Borchers A.T., Belay A., Keen C.L., Gershwin M.E., 2007**, Spirulina and Immunity In *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Gershwin & Belay (ed.), CRC Press: 177-193.

12. **Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M., 2009**, Antioxydant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.
13. **Bougandoura N., 2010**, Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha spnepta* (nabta) et *Ajugaiua L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de magister; université Tlemcen.
14. **Bougaran G., Bruno S. G., 2014**, Microalgues: de petits végétaux aux grandes promesses ! IFREMER, Ctr Atlantique, Lab Physiol & Biotechnol Algues, Nantes, France.
15. **Bourgeois C .M., Leveau J. Y., 1980**, Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Contrôle microbiologique. Tome3, Paris, Technique et documentation. Lavoisier, 331 p.
16. **Boutalbi S., 2014**, Criblage chimique et l'activité biologique de spiruline (*Arthrospira platensis*).
17. **BRANGER.A, RICHER.M.M ROUSTEL.S, 2007**, Microbiochimie et alimentation. ducagri éditions.
18. **Brouers M., 2004**, Traditional use of Spirulina (*Arthrospira platensis*) in Chad. International Symposium: CSSD "Cyanobacteria for health, Science and Development".
19. **Campanella L., Crescentini G., Avino P., 1999**, Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on Spirulina.
20. **Charlemagne D., 2008**, Mémoire DIU Alimentation Santé et Micronutrition de la faculté de pharmacie de Dijon .
21. **Charpy L., Langlade M. J., Alliod R., 2008**, la spiruline peut être un atout pour la santé et le développement en Afrique ?, vol 10 N°17 pp31-41
22. **Chbani A., Mawlawi H., Etahiri S., 2011**, Activité antibactérienne des extraits d'une algue brune *Padina pavonica* de la côte méditerranéenne au Liban
23. **Cheong S.H., Kim M.Y., Sok D.E., Hwang S.Y., Kim J.H., Kim H.R., Lee J.H., Kim Y.B., Kim M.R., 2010**, Spirulina Prevents Atherosclerosis by Reducing Hypercholesterolemia in Rabbits Fed a High-Cholesterol Diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* Vol. 56 No. 1 P 34-40.

24. **Chmouny B., 2008**, Le guide de l'homéopathie. Edit O. Jacob : 95p.
25. **Chopra K, Bishnoi M., 2007**, In: Spirulina in Human Nutrition and Health. Gershwin ME, Belay A, editor. Boca Raton: CRC Press. Antioxidant profile of Spirulina: a blue-green microalga; pp. 101–118.
26. **Chu W.L., Lim Y.W., Radhakrishnan A. K., Lim P.E., 2010**, Protective effect of aqueous extract from Spirulina platensis against cell death induced by free radicals.
27. **Ciferri O., 1983**, Spirulina, the edible microorganism. Microbiol Rev. Dec; 47(4): 551–578.
28. **Clement G., 1975**, Production et constituants caractéristiques des algues Spirulina platensis et Maxima. Annale de la nutrition alimentaire, 29.477 - 488. Vu in Ould Bellahcen T., Bouchabchoub A., Massoui M., El Yachoui M. culture et production de spirulina platensis dans les eaux usees domestiques ;Larhyss Journal, ISSN 1112-3680, n°14, Juin 2013, pp. 107-122
29. **Danesi E.D.G., Rangel-Yagui C.O., Carvalho J.C.M., Sato S., 2004**, Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis. Biomass and Bioenergy 26(4): 329-335
30. **Darcas C., 2004**, Spiruline and malnutrition Arch Pediatr. 2004 May;11(5):466-7; author reply 467-8.
31. **Desjardins M.L., Roy D., Goulet J., 1990**, Growth of bifidobacteria and their enzyme profile. J. Dairy Sci.; 73 : 299-307.
32. **Doumenge F., Durand-Chastel H., Toulemont A., 1993**, Spiruline, algue de vie! Spirulina, algae of life. Bulletin de l'institut Océanographique de Monaco. Monaco: Musée Océanographique.P 36, 37.
33. **Downham A., Collins P., 2000**, Coloring our foods in the last and next millennium. Institute of food science and technology.
34. **El-Baz F.K., El-Senousy W.M., El-Sayed A.B., Kamel M.M., 2013**, In vitro antiviral and antimicrobial activities of Spirulina platensis Extract .
35. **Falquet J., Hurni J.P., 2006**, Spiruline, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies, Genève. 41 p.
36. **Famsworth N.R., Arkerlele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo, Z., 1985**, Bull. WHO 63, 965-981.et; **Fleurentin, J.; Pelt, J.-M., 1990**. Les plantes médicinales.

37. **FAO, 2006**, Le développement de la filière spiruline ou « dihé » au service de la population et des personnes vulnérables au Tchad.
38. **Felix L.O., Chari N., Dhamodharan B., Manivel A., Naiyf S., Alharbi N.T. , 2015**, Biofilm Inhibitory Effect of *Spirulina platensis* Extracts on Bacteria of Clinical Significance_ The National Academy of Sciences, India.
39. **Fox R.D., 1999**, La Spiruline: Technique, Pratique et Promesse. EDIT SUD, Aix-en-Provence 246p.
40. **Gardner N.L., and Setechell W.A.,1917**, *Spirulina maxima*.
41. **Hamza N., 2011**, Effet préventif de trois plantes médicinales utilisées dans la wilaya de constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimentaux induits par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J.Thèse Doctorat. Science alimentaire. Constantine,p16.
42. **Hayashi T., Hayashi K., Maeda M., Kojima I., 1996**, Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products* 59: 83-87.
43. **Herrero M., Cifuentes A. , Ibanez E., 2006**, Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from natural source plants, food by products algae and microalgae. *A Review.Food.Chemistry. vol 98 (2) : p. 136-148.*
44. **Iserin P.,2001**, Encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bourdasse. Paris.
45. **John D.M., 1994**, biodiversity and conservation: an algal perspective, the phycologist.
46. **Jourdan J.P., 2006**, Cultivez votre spiruline .Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline (dernière mise à jour 1/3/2006).
47. **Larpent J.P., 1997** microbiologie alimentaire. Ed : Lavoisier.1072p
48. **Li B., Gao M.H., Zhang X.C., Chu X.M., 2006**, Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology And Applied Biochemistry* 43(3) : 155-164
49. **Manen J.F et Falquet J. 2002**, The *cpcB--cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 861-867

50. **Marfaing H., 2012**, Centre d'études et de valorisations des algues, les légumes de mer (algues) : des atouts nutritionnels à exploiter.
51. **Mc Hugh D., 2003**, A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries, Technical Paper N° 441. FAO, Rome, Italy
52. **Meyer A., Deiana J., 1988**, Cours de microbiologie générale. Doinéditeurs, Paris.p 201
53. **Mlaraha A.A., 2011**, Les conditions de realisation de la culture de spiruline: cas de la region nord-ouest de madagascar et comores.
54. **Muhling M., Harris N., Belay A., Whitton B.A., 2003**, Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. *Journal of Phycology* 39: 360-367.
55. **Nelissen B., Wilmotte A., Neefs J.M., De Wachter R., 1994**, Phylogeneti srelationships amongfilamentous helical cyanobacteria Investigated on the bases of 16s ribosomal RNA gene sequence analysis.
56. **Ou Y., Yuan Z., Li K., Yang X., 2012**, Phycocyanin may suppress D-galactose-induced human lens epithelial cell apoptosis through mitochondrial and unfolded protein response pathways. *Toxicology Letters*. 2012; 215(1):25–30.
57. **Parikh Panam M.SC., Uliyar Mani Ph.D., Uma Iyer Ph.D., 2001**, Role of Spirulina in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. vol 4. India.
58. **Park H.G., Lee Y.J., Ryu H.K., Kim M.H., Chung H.W., Kim W.Y., 2008**, A rondomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of Spirulina in elderly Koreans. *Ann nutria metab*: 322-8.
59. **Pierlovisi C., 2007**, L'homme et la spiruline : un avenir commun ; composition chimique interets alimentaires et activités biologiques. Paris V-Renet descartes, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Paris 162.
60. **Pousset J. L., 2004** Plantes medicinales d'Afrique. Edition Secum, Paris.
61. **Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2003**, La chimiothérapie antimicrobienne. *In*: Microbiologie, 2ème édition (Bruxelles), pp: 806-811.
62. **Quillet M., 1975**, Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les spirulines. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* 29: 553-561.

- 63. Ramamoorthy A., Premakumari S., 1996,** Effect of supplementation of Spirulina on Hypercholesterolemic Patients, *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, Vol. 33, No. 2, pp. 124-127.
- 64. Remeriz D., Ledon N., Gonzalez R., 2002,** Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators Inflamm.*
- 65. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y., 1979,** Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.
- 66. Romay C., Armesto J., Ramirez D., González R., Ledon N., García I., 1998,** Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm Res.* Jan;47(1):36-41.
- 67. Romay Ch., González R., Ledón N., Ramirez D., Rimbau V., 2003,** C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects *Current Protein and Peptide Science*, 4, 207-216
- 68. Rwangabo P.C., 1993,** La médecine traditionnelle au Rwanda. KARTHALA Edition.454p.
- 69. Sahreen S., Khan M.R., Khan R.A., 2010,** Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122, 1205-1211.
- 70. Sall M-G., Dankoko G., Badiane M., Ehua E. et Kuakuwi N., 1999,** Résultats d'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la spiruline à DAKAR (à propos de 59 cas). *Médecine d'Afrique noire*, 46(3), 143-146.
- 71. Salle J. L., 1991,** Les huiles essentielles. Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Edit Frison-Roche. Paris:167 p.
- 72. Samejo, M Q, Sumbul A., Shah S., Memona S B ., chundrigar S., 2013,** phytochemical screening of Tamarix dioica Rixb, ex Roch university of sindh, Jamshoro 76080, Pakistan.
- 73. Santoyo S., Herrero M., Señorans F.J., Cifuentes A., Ibañez E., Jaime L., 2006,** Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *Eur Food Res Technol* 224:75–81
- 74. Sautier C., Tremolieres J, 1975,** Valeur alimentaire des algues spirulines chez l'homme. *ann nutr. Alimentaire*.
- 75. Savithramma N., Lingarao M., Sahroulatha D., 2011,** screening of medicinal plants for secondary metabolites university Andhra Pradesh, India.

- 76. Scheldeman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Mühling M., Whitton BA., Belay A., Wilmotte A., 1999**, *Arthrospira* ('Spirulina') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer *FEMS Microbiology Letters* Vol. 172, n°2 p. 213
- 77. Seladji M., Belmekki N., Azmani I., Bouziani I., Bendimerad N., 2013**, phytochemical screening of two Algerian medicinal plants, university of Tlemcen _ Algeria.
- 78. Sguera S., 2008**, *Spirulina platensis* et ses constituants, interets nutritionels et activités therapeutiques ; Docteur en pharmacie ; Université Henri Poincaré_Nancy 1. France.
- 79. Song J. H. (2008)** What's new on the antimicrobial horizon? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32 (4), 207-213.
- 80. TABUTIN I., GOUESIN P.Y., MOLLO P., avril 2002**, la spiruline contre la malnutrition Madurai- Inde.
- 81. Tyler V.E., 1999**, *Phytomedicines: back to the future. J. Nat. Prod.* 62, 1589-1592.)
- 82. VIDALO J-L., 2008**, *Spiruline l'algue bleue de santé et de prévention*, édition dauphin.
- 83. Vijayakumari B., Sasikala V., Radha S.R., Tamilnadu., 2013**, preliminary phytochemical screening of the various extracts of *Spirulina aquatica* Lour. India.
- 84. Yamamoto C., Fujiwara Y., Kajia T., 2006**, The biological effects of depolymerized sodium spirulan and sulfated colominic acid on vascular cells are beneficial in preventing atherosclerosis. *Journal of Health Science* 52: 205-210.0..
- 85. Yougbare I., 2007**, Impact de la prise quotidienne de la *Spirulina platensis* sur le status immuno-biologique et nutritionnel des personnes vivantes avec le virus de l'immunodéficience PVIH à Bobo-Dioulasso Birkin Faso ; 2007)
- 86. Zablocki B., 2009**, *Du stress au bien-être et à la performance*, p 102.
- 87. Zarrouk C., 1966**, Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler", Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Paris, 06/1