

UNIVERSITE Saad DAHLAB- Blida

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

en Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

CARACTERISATION DE LA SPIRULINE : *Spirulina htam*,

OPTIMISATION DE SES CONDITIONS DE CULTURE ET

APPLICATION INDUSTRIELLE

Par

Safia LOUNICI

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------------|----------------------|---------------|
| Dr. KHALI M. | MCA., U.S.D. Blida | Président |
| Dr. EL HADI D. | MCA., U. S. D. Blida | Examineur |
| Dr. BITAM A. | MCA., U. S. D. Blida | Examineur |
| Dr. BENHADJA L. | MCA., U. S. D. Blida | Promotrice |
| Dr. DOUMANDJI A. | MCB., U. S. D. Blida | Co-promotrice |

Blida, novembre 2010

RESUME

La cyanobactérie alimentaire, Spiruline ou *Arthrospira htam*, isolée et purifiée en 1998, à partir de la guelta de Tin Aman à Tamanrasset, par le docteur HIRI A., en collaboration avec le Docteur FOX, et JOURDAN J.P. a fait l'objet de notre étude.

Des cultures de cette cyanobactérie à petite échelle ont été menées afin d'optimiser ses conditions de culture et d'atteindre des échelles plus élevées visant la production d'une biomasse pour la réalisation de sa caractérisation et son application industrielle,

Les résultats obtenus ont montrés que les facteurs limitants de la *Spirulina htam* sont d'ordre abiotique. Il s'agit principalement de la température, du pH et de l'agitation. En fait, la *htam* préfère sur le milieu de culture Hiri, une température de 32°C et un pH de 9 à 10 avec une agitation électrique en continu par une pompe à air délivrant environ 150 bulles/minute. Les milieux de culture Hiri et Zarrouk semblent présenter les meilleurs rendements,

L'évaluation de la qualité nutritionnelle de la *S. htam* montre que la différence n'est pas significative entre la *htam* issue du milieu Hiri et celle de Zarrouk. Cet aspect dépend du mode de séchage : une lyophilisation ou un séchage à 40°C présentent le minimum de pertes. La *htam* semble avoir une bonne activité antioxydante.

L'enrichissement du fromage frais par la spiruline mène sur le fait que la spiruline ajoutée lors de l'emprésurage diminue le rendement fromager et perd sa phycocyanine. L'enrichissement dans le caillé, donne un aspect meilleur et une qualité bromatologique élevée, la spiruline semble avoir un effet stimulant sur la flore lactique.

Mots clés : *Spirulina htam*, optimisation, milieu de culture, composition nutritionnelle, enrichissement.

ABSTRACT

The food cyanobacterium *Spirulina* or *Arthrospira htam*, isolated and purified in 1998 from the guelta Tin Aman in Tamanrasset, by Dr. A. HIRI, in collaboration with Dr. FOX, and JP JOURDAN, has been our study.

Our results showed that the limiting factors of the order of *Spirulina htam* are abiotic. These are mainly temperature, pH and agitation. However, the *htam* in Hiri's medium prefer a temperature of 32°C, a pH of 9 to 10 with electric agitation with 150 bubbles per minute. Culture media Hiri and Zarrouk seem to have the best returns.

The assessment of nutritional quality and antioxidant activity of *S. htam* shows that the difference was not significant between the medium Hiri *htam* outcome and that of Zarrouk. This quality depends on the mode of drying, freeze drying or drying at 40 ° C present the minimum losses.

The enrichment of fresh cheese with *Spirulina* leads to the fact that *Spirulina* added during the rennet cheese yield decreases and loses its phycocyanine. The enrichment in the curdled, and gives a better nutritional quality high *Spirulina* seems to have a stimulating effect on the lactic flora.

Key words: *Spirulina htam*, optimization, culture medium, nutritional composition, enrichment.

ملخص

السَّيَانوبكْتِيرِيَا الغِذَائِيَّة، *سبِيرُولِينَا* أَوْ *أرتروسيبيرا htam* المعزولة و التي تم تنقيتها في عام 1998، من قِلتة تين أمان في تمارست من طرف الدكتور هيري ع. بالتعاون مع الدكتور فوكس و جوردن، شكَّلت موضوع دراستنا.

أخذت زراعات السَّيَانوبكْتِيرِيَا في نطاق صغير لتعيين أحسن شروط زراعتها و للوصول إلى نطاق أوسع لإنتاج الكتلة الحيوية التي تقوم عليها دراسة الميزات و التَّطْبِيق الصَّنَاعِي.

العوامل التي تحد من نموَّ سبِيرُولِينَا هي عوامل لحياتِيَّة. المتمثَّلة في درجة الحرارة، الحموضة و التَّحْرِيك. في الواقع تفضِّل *htam* درجة حرارة 32°د، 9 إلى 10 درجة حموضة و تحريك كهربائي بواسطة مضخة هوائية بتقريب 150 فقاعة هوائية في الدَّقيقة .

أوساط الزَّراعة هيري و زروق لديها أفضل المردود.

تقييم الجودة الغذائية و النشاط المضاد للأكسدة لسبِيرُولِينَا تظهر أنَّ الفرق لم يكن كبيرا بين البكتيريا المنتجة في وسط هيري و تلك المنتجة في وسط زروق. هذه الجودة متعلِّقة بنوعية طريقة التَّجْفِيف، التَّجْفِيف بالتَّجميد أو التَّجْفِيف عند حرارة 40 درجة مئوية بقَدَّمان الحدِّ الأدنى للخسائر.

إثراء الجبن الطَّازج بالسبِيرُولِينَا بيِّن أنَّ السبِيرُولِينَا المضافة خلال العائد تودِّي إلى نقص مرد ودية الجبن و فقدان الفيكوسيانين. إثراء ألبن الرائب يعطي جودة غذائيَّة عالية، السبِيرُولِينَا تحفِّز البكتيريا اللَّبْنِيَّة على التَّمو.

الكلمات الجوهرية: سبِيرُولِينَا *htam*، تحسين، وسط معيشي، مكونات غذائية، إثراء.

REMERCIEMENTS

Un Magister est composé d'espoirs, de déceptions, de réussites et d'échecs. Ainsi, un mémoire peut très bien marquer le début d'une carrière ou la fin de tout intérêt pour la recherche scientifique.

*Tout d'abord, je veux remercier **ALLAH**, le tout puissant, pour tout ce qu'il m'a donné.*

Ce mémoire est, par ailleurs, le reflet d'une extraordinaire collaboration entre plusieurs personnes dont la contribution scientifique est à la hauteur :

J'adresse ma reconnaissance la plus cordiale et spécifique à Mr. AKROUM A. pour son soutien intarissable tout au long de mon cheminement dans le vaste monde de la recherche. Merci d'avoir financé mes stages, merci de m'avoir procuré du confort tout au long de ma carrière scientifique, merci pour votre suivi, vos conseils et exhortations. Merci d'être prêt de me donner l'accès à l'impossible, juste pour me voir triompher.

Mes reconnaissances s'adressent aussi à Mr. ZARHOUNI A. et Mr. ZAROUALA K. ainsi qu'à tout les responsables du ministère de la défense nationale ; merci pour votre générosité, conseils et encouragements.

C'est grâce à ma directrice de mémoire Dr. BOUTEKRABT BENHADJA L. que j'ai maintenant l'énergie, les moyens et l'intérêt de continuer ma recherche. Merci pour votre honnêteté, vos conseils, compréhension, affection, confiance et encouragements dans les moments les plus pénibles et surtout pour votre encadrement sans faille et vos corrections accélérées. J'espère pouvoir un jour vous témoigner ce sentiment de reconnaissance, d'amour et de respect inestimables.

Je désire aussi remercier une personne très spéciale qui représente pour moi une source de motivation : ma co-promotrice Dr. DOUMANDJI A. pour son suivi, ses conseils, ses orientations, sa gentillesse et ses encouragements qu'elle a su m'accorder.

Au Dr. KHALI M., Dr. ELHADI D. et Dr. BITAM A. pour leur respect au savoir et de m'avoir honoré en faisant part de mon travail, en le jugeant et le critiquant. Merci de m'avoir gratifié avec vos annotations cruciales et précieuses : Je vous remercie en tant qu'enseignants et membres de jury.

Au Pr. BOUTEKRABT A. qui n'a jamais tarder à m'apporter aide, encouragement et soutien aussi moral qu'administratif.

Au père de la spiruline algérienne, le Dr. HIRI A. de m'avoir accueilli au sein de sa ferme, et de m'avoir initié à la culture de la spiruline. Je lui exprime ma plus profonde gratitude eu égard à ses bons conseils et aux encouragements dont il m'a honoré. Merci à tous les membres de l'association *SAHARA SPIRULINA*.

A celle qui m'a appris le sens de « l'espoir », à la personne à qui je dois un respect, et une énorme reconnaissance, au Dr. LYES N. du SCK, pour son soutien moral, pour ses conseils, pour son respect au savoir, pour ses qualités scientifiques et humaines, à vous, chère docteur, je vous dis mille fois merci.

I would like to thank Dr WILMOTTE A. from the university of Belgium and Dr. STESENS A. from ASK for their advice, help, and expertise.

Au Dr. Janssen pour sa confiance et ses encouragements. Votre humilité et connaissances ont été sincèrement très appréciées.

Au Dr. OUINTEN M., mon exemplaire scientifique, et ma source d'innovation à qui je dois ma réussite ; je n'oserai jamais oublier votre conseil : « marches à ta vitesse en avant, ne ralentis et surtout ne recules pas ; si un obstacle viens te freiner, détruit le et doubles ta vitesse » je vous promets que ce concept sera mon éternel principe.

Mes souvenirs à Tamanrasset resteraient gravés, une reconnaissance profonde à Mr ZAROUALA MAAYOUF K. et toute sa famille, pour leur accueil et le temps qu'il m'avait consacré malgré ses responsabilités.

Pleine gratitude adressée à Mr. DJEBAIRIA L., MILOUDI A. et SAIDI, pour leurs capacités scientifiques et encouragements. Aussi au Dr. BELHASSNET K., d'être disponible, efficace et généreux.

Au directeur de l'annexe de l'ISMAL à Sidi Fredj, Mr. BOUKRINA Y. qui n'a jamais hésité à m'aider et à me remonter le moral lorsque je rentre pour trouvé que ma culture de spiruline verte est devenue marron, rose voir incolore. Merci de m'avoir autorisé l'accès au laboratoire même les jours de week-ends.

A Mme. NACEF S. mon premier mentor qui ma donné le goût de la recherche, qui a contribué, depuis mon ingéniorat, et contribue encore à ma réussite.

Je désire aussi remercier Mr. ATTIA K.. A vous j'adresse mes remerciements les plus cordiaux et sincères, pour votre présence, soutien et conseils judicieux ; merci d'être à mes cotés.

Au cours de ces deux dernières années, le doute, le désespoir et la déprime m'ont souvent guetté. Je n'aurai pas su persister et tenir jusqu'au bout sans l'amour, le soutien, les conseils, l'aide et les coups téléphoniques de mes meilleures amies : Houda et Djemaa.

A Selma pour nos moments de rire, de pleurs et de folie durant nos nuits blanches, la seule qui m'a partager le réel stress du magister.

A Ismahane, Samira et Karima qui étaient impatientes de m'appeler maitre assistante, mais c'est le temps, un gros merci d'être mes amies.

Mille mercis à toi Amina pour tout ce que tu as fait durant les moments les plus stressants. Je n'oublierai jamais ton café 'de mi-nuit' et ton insistance à me réveillé à chaque fois que je coule sur mon lit. Merci à toi aussi Merry ma petite belle blanche-neige.

Qui plus est, je ne saurais omettre de souligner tout le plaisir que j'ai eu à côtoyer tous ceux et celles qui animent les différents services des laboratoires du L.C.I. et de l'I.S.M.A.L.

Aux êtres les plus aimés à mon cœur : ma très chère famille : je suis vraiment reconnaissante.

A toutes ces personnes, et celles que j'ai oublié, je voudrais exprimer ma pleine gratitude et mes remerciements les plus sincères

Je n'oublierai jamais de remercier l'être minuscule qui m'a appris à patienté : celle qui n'a guerre quitté mes pensées durant ces deux dernières années : La fameuse *Spirulina*.

*À ma famille
Qui m'a toujours soutenue
Et encouragée à suivre les chemins
Que je désirais.*

*En hommage à mon trésor ma très chère mère, source
d'inspiration à qui je dois tant, je dédie cet
ouvrage*

*A mon papa chéri, qui ne cesse de me pousser
vers la réussite*

A ma grande mère

*Mes frères et sœurs
Cousins et cousines
Oncles et tantes
A toute ma famille.*

*A celui qui m'a appris à se lever après chaque chute
Qui m'a prouvé que les enfants viennent réellement du paradis
Mon chéri neveu Seyf.*

Safia...

*Nous réalisons que ce que nous
accomplissons n'est qu'une goutte dans
l'océan. Mais si cette goutte n'existait pas
dans l'océan, elle manquerait*

Mère Térésa [1913-1997]

« L'océan n'appartient à personne !!! »

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| RESUME | 3 |
| REMERCIEMENT | 6 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | 7 |
| INTRODUCTION | 9 |
| CHAPITRE 1 : SPIRULINE : L'OR VERT ? | |
| 1.1 Généralités sur la spiruline. | 10 |
| 1.1.1 Définitions. | 10 |
| 1.1.2 Appellations. | 11 |
| 1.1.3 Historique. | 11 |
| 1.2 Biologie de la spiruline. | 12 |
| 1.2.1 Caractéristiques structurales. | 12 |
| 1.2.2 Croissance. | 16 |
| 1.3 Ecologie. | 18 |
| 1.4 Reproduction. | 19 |
| 1.5 Déplacement. | 19 |
| CHAPITRE 2: PRODUCTION DE LA SPIRULINE | |
| 2.1. Paramètres environnementales influençant la culture de la spiruline | 21 |
| 2.1.1. La température. | 21 |
| 2.1.2. Luminosité. | 21 |
| 2.1.3. Agitation. | 21 |
| 2.1.4. Facteurs concernant les bassins de culture. | 22 |
| 2.1.4.1. Localisation. | 22 |
| 2.1.4.2. Mode de construction. | 23 |
| 2.1.4.3. Nombre et surface unitaire. | 25 |

| | | |
|--|---|----|
| 2.1.4.4. | Couverture. | 25 |
| 2.1.5. | Les photobioréacteurs | 26 |
| 2.1.5.1. | Les photobioréacteurs plats. | 26 |
| 2.1.5.2. | Les photobioréacteurs cylindriques | 26 |
| 2.1.5.3. | Les photobioréacteurs de type colonnes. | 26 |
| 2.1.5.4. | Les photobioréacteurs annulaires. | 27 |
| 2.1.5.5. | Les photobioréacteurs tubulaires agencés horizontalement. | 27 |
| 2.1.5.6. | Les photobioréacteurs tubulaires agencés verticalement. | 27 |
| 2.2. | Conduite de la culture de spiruline. | 28 |
| 2.2.1. | Elaboration du milieu de culture initial. | 28 |
| 2.2.1.1. | L'eau. | 28 |
| 2.2.1.2. | La salinité. | 29 |
| 2.2.1.3. | L'alcalinité. | 29 |
| 2.2.1.4. | Nutrition de la spiruline. | 30 |
| 2.2.2. | Ensemencement de la souche choisie. | 31 |
| 2.2.3. | Entretien des bassins et surveillance des cultures | 32 |
| 2.2.4. | Incidences et remèdes | 34 |
| 2.2.4.1. | Manque d'oxygène. | 34 |
| 2.2.4.2. | Changement de couleur du milieu de culture. | 34 |
| 2.2.4.2.4. | Une culture jaunâtre avec écumes. | 35 |
| 2.2.4.3. | Apparition d'une odeur forte et désagréable | 35 |
| 2.2.4.4. | Viscosité. | 35 |
| 2.2.4.5. | Formation d'amas. | 36 |
| 2.2.4.6. | Contamination par des micro-organismes | 36 |
| 2.2.4.7. | Contamination par les métaux lourds. | 37 |
| 2.2.5. | Récolte. | 37 |
| 2.2.5.1. | Filtration. | 37 |
| 2.2.5.2. | Lavage et essorage | 38 |
| 2.2.6. | Séchage. | 38 |
| 2.2.7. | Conditionnement et conservation. | 38 |
| CHAPITRE 3: LA SPIRULINE: UN ALICAMENT PAR EXCELLENCE | | |
| 3.1. | Législation. | 40 |
| 3.2. | Qualité nutritionnelle. | 41 |

| | | |
|---|--|----|
| 3.2.1. | Protéines et acides aminés. | 41 |
| 3.2.2. | Composition en lipides. | 43 |
| 3.2.2.1. | Les acides gras. | 43 |
| 3.2.2.2. | La fraction insaponifiable. | 45 |
| 3.2.3. | Les glucides. | 46 |
| 3.2.4. | Les acides nucléiques. | 47 |
| 3.2.5. | Les vitamines. | 47 |
| 3.2.5.1. | Les vitamines liposolubles. | 48 |
| 3.2.5.2. | Vitamines hydrosolubles. | 49 |
| 3.2.6. | Minéraux et oligo-éléments. | 51 |
| 3.2.6.1. | Fer | 52 |
| 3.2.6.2. | Zinc. | 53 |
| 3.2.6.3. | Magnésium. | 53 |
| 3.2.6.4. | Sélénium. | 53 |
| 3.2.6.5. | L'iode. | 53 |
| 3.2.7. | Pigments. | 54 |
| 3.3. | Valeur thérapeutique. | 54 |
| 3.3.1. | Toxicité. | 55 |
| 3.3.2. | Réactions allergiques. | 56 |
| 3.4. | Précautions d'emploi | 57 |
| CHAPITRE 4: LA SPIRULINE FACE A LA TECHNOLOGIE | | |
| 4.1. | Spiruline à usage animal | 59 |
| 4.1.2. | Renforcer les défenses immunitaires. | 59 |
| 4.1.3. | Pour augmenter la pigmentation. | 59 |
| 4.1.4. | Pour améliorer les performances des animaux. | 59 |
| 4.2. | Spiruline à usage humain. | 59 |
| 4.2.1. | Industrie cosmétique. | 60 |
| 4.2.2. | Industrie agro-alimentaire. | 60 |
| 4.2.2.2. | Colorant alimentaire | 61 |
| 4.3. | L'aliment fromage en bref. | 62 |
| CHAPITRE 5: MATERIEL ET METHODES | | |
| 5.1. | Matériel utilisé. | 64 |
| 5.1.1. | Matériel biologique. | 64 |

| | | |
|----------|---|----|
| 5.1.1.1. | Souche de spiruline. | 64 |
| 5.1.1.2. | Lait de vache. | 64 |
| 5.1.1.3. | Lait UHT. | 64 |
| 5.1.1.4. | Présure. | 65 |
| 5.1.1.5. | Ferments lactiques. | 65 |
| 5.1.2. | Matériel chimique. | 65 |
| 5.1.2.1. | Milieux de culture. | 65 |
| 5.1.2.2. | Réactifs et solvants. | 67 |
| 5.2. | Culture de la spiruline. | 67 |
| 5.2.1. | Lieu et bassins de culture. | 67 |
| 5.2.2. | Conditions environnementales | 68 |
| 5.2.2.1. | Milieu de culture. | 68 |
| 5.2.2.2. | Température. | 69 |
| 5.2.2.3. | Lumière. | 69 |
| 5.2.2.4. | Précipitations. | 69 |
| 5.2.2.5. | Agitation. | 69 |
| 5.2.3. | Récolte. | 69 |
| 5.2.4. | Séchage. | 70 |
| 5.3. | Optimisation des conditions de culture | 71 |
| 5.3.1. | Effet du milieu de culture sur la croissance. | 71 |
| 5.3.2. | Optimisation des conditions opérationnelles de culture. | 71 |
| 5.3.2.1. | Evaluation de la croissance microbienne. | 71 |
| 5.3.2.2. | Effet de la température sur la croissance. | 72 |
| 5.3.2.3. | Effet du pH sur la croissance. | 72 |
| 5.3.2.4. | Effet de l'agitation sur la croissance. | 73 |
| 5.4. | Caractérisation de l' <i>Arthrospira Htam</i> . | 73 |
| 5.4.1. | Optimisation du séchage de la <i>S. htam</i> | 73 |
| 5.4.2. | Caractérisation nutritionnelle. | 74 |
| 5.4.2.1. | Analyse de la composition bromatologique générale. | 74 |
| 5.4.2.2. | Quantification des pigments majeurs. | 77 |
| 5.4.2.3. | Teneur en composés phénoliques. | 79 |
| 5.4.3. | Détermination de l'activité antioxydante. | 79 |
| 5.5. | Application industrielle. | 81 |

| | | |
|---|--|-----|
| 5.5.1. | Fabrication du fromage frais. | 81 |
| 5.5.2. | Analyses physico-chimiques. | 81 |
| 5.5.2.1. | Mesurage du potentiel d'hydrogène (pH). | 81 |
| 5.5.2.2. | Extrait sec total (EST). | 81 |
| 5.5.2.3. | Cendres. | 82 |
| 5.5.2.4. | La matière grasse (AFNOR, 1986). | 82 |
| 5.5.2.5. | Différentes fractions azotées. | 83 |
| 5.5.3. | Exploitation des données analytiques. | 83 |
| 5.5.4. | Analyses microbiologiques. | 85 |
| 5.5.4.1. | Méthode de prélèvement aseptique des échantillons. | 85 |
| 5.5.4.2. | Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. | 85 |
| 5.5.4.3. | Contrôle microbiologique de la qualité. | 86 |
| 5.5.4.4. | Méthodes de calcul et expression des résultats. | 91 |
| 5.5.4.5. | Etude de l'effet de la spiruline sur la flore lactique | 92 |
| 5.5.5. | Représentation graphiques et analyse statistique des résultats. | 93 |
| CHAPITRE 6: RESULTATS ET DISCUSSIONS | | |
| 6.1 | Réalisation de la culture de l' <i>Arthrospira htam</i> . | 95 |
| 6.1.1 | Culture à petite échelle. | 95 |
| 6.1.2 | Culture à grande échelle. | 97 |
| 6.2 | Optimisation des conditions de culture. | 99 |
| 6.2.1 | Effet de la composition du milieu de culture sur la croissance. | 99 |
| 6.2.2 | Rendement en spiruline | 103 |
| 6.2.3 | Effet des conditions opérationnelles de culture sur la croissance. | 104 |
| 6.3 | Optimisation du séchage. | 108 |
| 6.4 | Caractérisation nutritionnelle. | 110 |
| 6.4.1 | Composition bromatologique générale. | 110 |
| 6.4.2 | Teneur en pytonutriments. | 113 |
| 6.5 | Activité antioxydante. | 116 |
| 6.6 | Résultats de l'application industrielle. | 116 |
| 6.6.1 | Résultats des analyses des matières premières. | 117 |
| 6.6.2 | Methodologie de fabrication fromagère. | 120 |
| 6.6.3 | Caractérisation des fabrications fromagères. | 122 |
| 6.6.4 | Détermination de la vitesse d'acidification | 128 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.6.5 | Résultats des analyses microbiologiques des fromages frais. | 129 |
| | CONCLUSION | 132 |
| | APPENDICES | 135 |
| | LISTE DES ABREVIATIONS | 136 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 137 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Figure 1.1 : Filaments des deux espèces de spiruline observés au microscope optique. | 14 |
| Figure 1.2 : Cycle biologique de la Spiruline..... | 19 |
| Figure 5.1. : Bassins de culture de la spiruline au niveau de la ferme du docteur HIRI : Tamanrasset. : a : Bassins en dur ; b : bassins en plastique | 68 |
| Figure 5.2. : Trona utilisé dans le milieu HIRI (originale, 2009). | 68 |
| Figure 5.3. : Récolte de la spiruline dans la ferme du Dr. HIRI | 70 |
| Figure 5.4. : Séchage de la <i>Spirulina Htam</i> : a : Pate de spiruline en couche mince ; b : Séchoir solaire | 70 |
| Figure 5.5. : Courbe de variation de la densité optique en fonction du temps dans le test DPPH | 80 |
| Figure 6.1. : Culture à petite échelle de la <i>Spirulina htam</i> | 95 |
| Figure 6.2. : Différentes anomalies de couleur du milieu de culture de la <i>Spirulina htam</i> observées lors de la culture à petite échelle | 96 |
| Figure 6.3. : Serre et bassins, lieu de production de la spiruline..... | 97 |
| Figure 6.4. : Disparition de la coloration de la culture de la spiruline | 98 |
| Figure 6.5. : Récolte de la spiruline | 98 |
| Figure 6.6. : Pate (a) et poudre (b) de la spiruline récoltée | 99 |
| Figure 6.7. : Evolution de la biomasse de la <i>Spirulina Htam</i> dans le milieu de culture Hiri. | 100 |
| Figure 6.8. : Evolution de la biomasse de la <i>Spirulina Htam</i> dans le milieu de culture Zarrouk. | 100 |
| Figure 6.9: Evolution de la biomasse de la <i>Spirulina Htam</i> dans le milieu de culture BG-11.. | 100 |

| | |
|---|-----|
| Figure 6.10. : Evolution de la biomasse de la <i>Spirulina Htam</i> dans le nouveau milieu proposé. | 100 |
| Figure 6.11: Rendements en spiruline, rapporté à la matière sèche et matière fraîche, de la spiruline cultivée dans le milieu Zarrouk et Hiri..... | 103 |
| Figure 6.12. Cinétique de croissance de <i>Spirulina Htam</i> dans le milieu Hiri à différentes températures. | 105 |
| Figure 6.13. : Cinétique de croissance de <i>Spirulina Htam</i> dans le milieu Hiri à différentes valeurs de pH..... | 107 |
| Figure 6.14: Cinétique de croissance de <i>Spirulina htam</i> dans le milieu Hiri à différents modes d'agitation..... | 108 |
| Figure 6.15. : Ratio entre le taux de protéines initial et après séchage (C/Ci) par différent modes et à différentes températures. Z : Spiruline cultivée dans le milieu Zarrouk ; H : celle du milieu Hiri. 1 à 3 : les essais. M : la moyenne. | 109 |
| Figure 6.16. : Courbe du pouvoir antioxydant de la spiruline (extrait de spiruline)..... | 116 |
| Figure 6.17 : Schéma de la fabrication du fromage frais | 121 |
| Figure 6.18 : Radar représentatif des rendements ajustés des fabrications fromagères. FT : Fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l'emprésurage ; FEC : fabrication enrichie dans le caillé..... | 125 |
| Figure 6.19 : Radar représentatif des rendements secs des fabrications fromagères. FT : Fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l'emprésurage ; FEC : fabrication enrichie dans le caillé..... | 126 |
| Figure 6.20 : Evolution de la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> dans les différentes fabrications fromagère en fonction du temps. FT : fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l'emprésurage ; FEC : Fabrication enrichie dans le caillé..... | 129 |
| Figure 6.21 : Evolution de la croissance de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dans les différentes fabrications fromagère en fonction du temps. FT : fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l'emprésurage ; FEC : Fabrication enrichie dans le caillé. | 129 |
| Tableau 3.1 : Pourcentage moyen des acides aminés de <i>Spirulina platensis</i> selon différents auteurs [15 ; 129, 133] et de <i>Spirulina mexican</i> | 42 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 3.2 : Composition typique en pourcentage des principaux acides gras de trois espèces de Spiruline | 44 |
| Tableau 3.3 : Teneur en vitamines liposolubles en µg/g de matière sèche de Spiruline..... | 48 |
| Tableau 3.4 : Teneur en vitamines hydrosolubles en µg/g de matière sèche de Spiruline..... | 50 |
| Tableau 3.5 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche | 52 |
| Tableau 3.6 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de <i>Spirulina platensis</i> | 54 |
| Tableau 3.7 : Normes imposées en France pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries et métaux lourds (Arrêté du 21/12/1979) | 56 |
| Tableau 5.1. : Composition chimique, en gramme par litre d'eau, des différents milieux de culture utilisés pour la spiruline | 65 |
| Tableau 5.2. : Composition des solutions A ₅ ; B ₆ pour le milieu Zarrouk | 66 |
| Tableau 5.3. : Composition du mélange d'oligo-éléments additionné au milieu BG-AA..... | 67 |
| Tableau 5.4 : Germes recherchés dans la spiruline et les différents échantillons laitiers | 87 |
| Tableau 6.1. : Composition nutritionnelle générale de la <i>Spirulina Htam</i> cultivée sur le milieu Zarrouk et Hiri..... | 111 |
| Tableau 6.2. : Teneurs en pytonutriments de la <i>Spirulina htam</i> cultivée sur Zarrouk et sur Hiri. | 113 |
| Tableau 6.3. : Caractéristiques chimiques du lait de vache cru utilisé (valeur moyenne ± écart type)..... | 117 |
| Tableau 6.4. : Résultats de la caractérisation des différentes fabrications fromagères : Caillé égoutté et lactosérum (moyenne ± écart-type)..... | 122 |
| Tableau 6.5. : Variation du pH des différentes fabrications fromagères..... | 127 |
| Tableau 6.6 : Vitesse d'acidification des différents fromages..... | 128 |

INTRODUCTION

Imaginez un aliment qui peut régler la glycémie, la tension artérielle et le cholestérol [1] ; un aliment qui peut diminuer la souffrance des inflammations [2] et fournit une activité anti oxydante qui prévient les maladies mortelles tel le cancer, l'Alzheimer et les maladies cardiaques [3]; un aliment qui protège les reins [4], le foie [5] et qui protège le corps des irradiations [6]. Un aliment, qui stimule le système immunitaire [7], allège les allergies [8] et qui a prouvé son activité antivirale (via différents virus) [9].

Plusieurs recherches scientifiques ont montré que cet aliment miracle, dénommé **Spiruline**, contient 300% de calcium plus que le lait entier ; 2300% plus de fer que les épinards ; 3900% de beta-carotène plus que les carottes ; 375% de protéines plus que le soja [10].

Trois grammes de spiruline a plus d'activité antioxydante et anti-inflammatoire que cinq portions de légumes variés.

Aussi, en termes de teneurs en pytonutriments, elle est plus puissante que les myrtilles de 31^e fois, 60 fois que les épinards et 700 fois que les pommes [10]. C'est une vérité, les scientifiques confirment que « la spiruline » peut être utile dans tous ces domaines et plus.

La spiruline (*Arthrospira sp.*) est une cyanobactérie alimentaire, de 0,2 à 0,3 mm de long. Souvent considérée comme une algue bleu-verte [11-13], elle est parmi les algues les plus produites dans le monde pour la consommation humaine [14].

Deux souches principales sont connues à travers le monde à nos jours, *Arthrospira platensis* et *Arthrospira maxima* [15].

La *Spirulina htam*, est une souche algérienne, dont la systématique n'est pas encore établie, voire même sa composition n'est pas encore détaillée.

A partir de ce principe, notre recherche a porté sur plusieurs axes à savoir :

- La réalisation d'essais de culture à petite échelle de la spiruline de Tamanrasset dans différents milieux de culture, en se référant au milieu de référence « Zarrouk » et en introduisant le milieu algérien de Hiri, le milieu BG-11 et un nouveau milieu que nous avons élaboré;
- L'optimisation des principales conditions opérationnelles de culture (température, agitation et potentiel d'hydrogène) ;
- La réalisation d'essais de production à grande échelle de la spiruline et comparaison du rendement en biomasse entre les milieux Hiri et Zarrouk;
- L'optimisation des conditions de séchage ;
- La caractérisation nutritionnelle et thérapeutique partielle;
- L'application industrielle, visant l'élaboration d'un fromage frais enrichi en spiruline mais aussi l'étude de l'effet de la spiruline sur la flore lactique.

Cette étude se heurte, toutefois, à plusieurs difficultés : est-ce-que notre souche peut s'adapter aux différents milieux testés ? Si oui, quel est le meilleur milieu ? Quelles seraient les meilleures conditions de culture ? En récoltant, comment conduire le séchage ? Quoi de la qualité nutritionnelle des deux spirulines (issues du milieu Zarrouk et Hiri) ? Possèdent-elles une activité antioxydante ? La spiruline, a-t-elle vraiment un effet sur les bactéries lactiques ? Quoi des possibilités d'enrichissement du fromage et de la valorisation du lactosérum ?

L'objectif de notre recherche est de répondre à ces questions après avoir menée plusieurs essais tout en tenant compte du fait que la spiruline n'a pas encore livrée tous ses secrets.

CHAPITRE 1

SPIRULINE : L'OR VERT ?

1.1 Généralités sur la spiruline.

1.1.1 Définitions.

1.1.1.1 Spiruline.

Considérée souvent comme une algue planctonique microscopique, la spiruline est en fait une bactérie appartenant aux cyanobactéries filamenteuses du genre *Arthrospira*, le plus souvent enroulée en spires (d'où son nom commercial). Son nom scientifique est cyanobactérie *Arthrospira platensis* ou *A. maxima*. Elle pousse naturellement dans les lacs chauds du Tchad et du Mexique, mais aussi dans les lacs alcalins riches en carbonates et bicarbonates à pH élevé. La spiruline est en fait la plus ancienne forme de vie « verte », apparue sur la terre il y a environ 3,5 milliards d'années [11-13 ; 16-26].

1.1.1.2 Cyanobactéries.

Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène. Elles peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires; dans ce dernier cas, leurs cellules s'arrangent en amas de type colonies ou, le plus souvent, en filaments composés de cellules alignées (ces filaments sont appelés trichomes) [27].

Ce sont de vrais procaryotes (organismes dépourvus de membrane nucléaire), malgré leur système photosynthétique proche de celui des eucaryotes [16].

1.1.2 Appellations.

Spiruline, *Spirulina* ou *Arthrospira*. Il faut retenir que le terme “Spiruline” correspond au nom commercial d’une cyanobactérie appartenant toujours au genre *Arthrospira*. “*Spirulina*” est le nom commercial anglais de la même cyanobactérie mais il désigne également un genre de cyanobactérie assez éloigné d’*Arthrospira*, et surtout non comestible. « *Arthrospira* » étant le nom scientifique (genre) d’un groupe de cyanobactéries auquel appartient notre spiruline alimentaire [16].

La spiruline, avait différentes appellations dont on peut citer :

- *La Portion magique* : Mentinée par Christophe Colomb ;
- *Le Dihé* : Par les Kanembous, tribu du Tchad ;
- *Le Tecuitlatl* : Par les Aztèques [16].

1.1.3 Historique.

La spiruline, si elle est l’une des premières formes de vie terrestre, n’en a pas moins suscité que tardivement l’intérêt des scientifiques :

- En 1492, Christophe Colomb la découvrit au Mexique, sous forme de petites galettes vertes séchées et le note dans son carnet de bord ;
- Cortès, qui en ses mémoires décrit vers 1521 la façon dont les aztèques la récoltaient et la consommaient ;
- Elle fut redécouverte, au Tchad, vers 1930 par un pharmacien français des troupes coloniales puis en 1940 par le botaniste français Dangeard [28];
- En 1959, Brandilly, anthropologue et cinéaste, publie un article sur la spiruline : « Depuis des lustres, une tribu africaine du Tchad (les *Kanembous*) exploite la nourriture de l’an 2000 » [28] ;
- La spiruline décrite pour la première fois par Wittrock et Nordstedt en 1844 [29].
- Elle resta une simple curiosité avant le 7^{ème} congrès du pétrole en 1967 à Mexico, à l’occasion duquel des chercheurs de l’Institut Français du pétrole rendirent compte de leurs travaux sur la spiruline [16].

La première culture artisanale de spiruline méritant vraiment cette appellation revient sans doute à FOX Ripley qui fut le premier à lancer cette activité en Inde en 1973, en collaboration avec le *Navsari Agricultural College* [16].

Ce fut l'origine de sa première exploitation industrielle, en 1976, par la société *Sosa Texcoco* basée au Mexique. Actuellement, le nombre de ces exploitations avoisine la trentaine [16].

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

1.2 Biologie de la spiruline.

La spiruline fait partie des micro-organismes, elle est classée parmi les *cyanobactéries* [30]. Elle appartient donc au domaine des bactéries (*Bacteria*) et se classe parmi les bactéries gram négatif [31 ; 32]. À noter que cette appartenance à la classe des cyanobactéries est récente. En effet, elle est longtemps restée classée parmi les « algues bleu-vert », la spiruline appartient à l'ordre des Nostocales (= Oscillatoriales), la famille des Oscillatoriaceae, le genre *Oscillatoria* et le sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira* [33-36]. Les cyanobactéries forment l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires [37].

1.2.1 Caractéristiques structurales.

1.2.1.1 Morphologie.

La spiruline se présente sous la forme d'un filament microscopique pluricellulaire bleu-vert, mobile, non ramifié et enroulé en spirale, généralement en six (6 ou sept (7) spires. Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation de « Spiruline » [38].

Ce filament est appelé trichome ; il est d'une longueur moyenne d'environ 250 µm lorsqu'il a 7 spires et son diamètre est d'environ 10 µm. Mais les paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur) ne sont pas toujours les mêmes selon les chercheurs qui étudient la spiruline [39 ; 40], les facteurs environnementaux tels la température, les conditions physiques et chimiques, auraient cependant une influence sur la géométrie et l'orientation de l'hélice [41-44].

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 [16].

Les scientifiques étudiant la spiruline ont donc d'abord pensé qu'il existait de nombreuses espèces d'*Arthrospira* ; en fait, l'analyse de leurs caractéristiques génétiques, effectuées par Scheldeman et *al.* en 1999, basées sur l'ARDA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) ne fait apparaître que deux espèces presque identiques d'*Arthrospira* [15]. Ils supposent alors que de ces deux espèces dérivent plusieurs souches.

Actuellement, 50 souches d'*Arthrospira* recensées à travers le monde ont été étudiées pour en décrire la diversité génétique. Un travail de classification de différentes souches d'*Arthrospira*, récemment réalisé, repose sur le séquençage génétique d'un fragment d'ADN hypervariable, mais spécifique des cyanobactéries. Il en ressort une très forte homogénéité du genre *Arthrospira*, même lorsque les souches ont des morphologies variées ou lorsqu'elles proviennent de lieux géographiques très différents. La conclusion est qu'il n'existerait *a priori* que deux espèces génétiquement différentes parmi ces souches [45]. Ces deux espèces sont : *Arthrospira platensis*, initialement originaire du Kanem (Tchad) et *Arthrospira geitleri* ou *maxima*, originaire du Mexique.

- *Spirulina platensis* (figure 1.1) est la plus connue et la plus utilisée lors des travaux de recherche ou lors de l'ensemencement de nouvelles cultures. Elle se compose de trichomes atteignant 350 µm de long et entre 6 et 12,45 µm de diamètre ; ils sont un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50 µm, diminuant légèrement vers les extrémités [16].

- *Spirulina maxima* (figure 1.1) se caractérise par des trichomes de 70 à 80 μm de long, de 7 à 9 μm de diamètre et légèrement effilés aux extrémités ; ils forment une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60 diamètre. Les cellules constituant les trichomes mesurent entre 5 à 7 μm de long et ne s'élargissent pas au niveau des articulations [16].

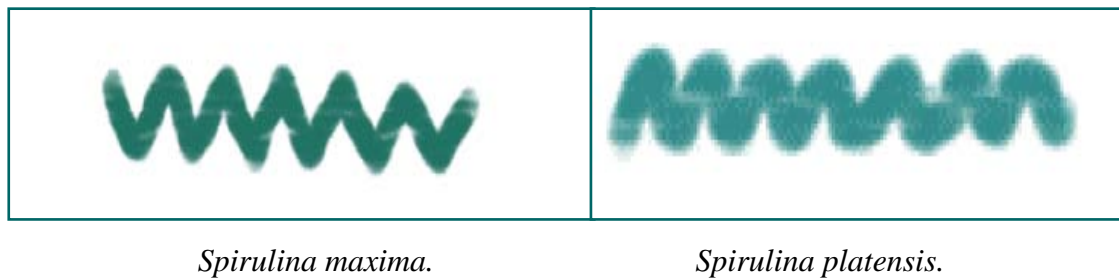


Figure 1.1 : Filaments des deux espèces de spiruline observés au microscope optique [46].

En ce qui concerne les différentes souches (ou variétés) de spirulines, on distingue les spirulines "spirales", "ondulées", et "droites" [47]. Des photographies de ces différentes souches sont présentées dans l'appendice A.

Les cellules de cyanobactéries n'ayant pas de plastes individualisés, leur coloration est homogène. Cependant, en microscopie optique, on distingue une zone périphérique colorée (le *chromoplasma*) et une partie centrale plus claire (le *centroplasma*) [48].

1.2.1.2 Ultra-structure.

La microscopie électronique a aussi permis de mieux connaître la structure et le fonctionnement de ces cellules. Leur organisation est relativement simple et semblable à celle des cellules de procaryotes [12 ; 49-53] :

- Absence de membrane nucléaire et donc de noyau bien individualisé ;
- Absence de mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, et flagelles;
- Les cellules sont limitées par une fine membrane constituée de 4 couches minces différenciables en microscopie électronique : deux d'entre elles présentent une

analogie chimique et structurale avec la paroi des bactéries gram négatif car elles sont riches en mucopolymères et mucopeptides. Elles sont néanmoins un peu plus complexes, mais il est important de retenir que cette membrane est totalement exempte de cellulose. Une enveloppe externe, riche en caroténoïdes, peut parfois l'enrober ;

- Sur le plan ultra structural, le chromoplasma apparaît comme un système membranaire comprenant des thylakoïdes ; la spiruline ne renfermant pas de chloroplastes, ce sont ces thylakoïdes qui constituent les sites de photosynthèse. Ce sont des filaments pigmentés disposés généralement de façon pariétale concentrique. Ils renferment les phycobilisomes, granules porteurs des pigments photosynthétiques (chlorophylle a,β -carotène et oxycaroténoïdes, phycocyanine et phycoérythrine).

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

Le chromoplasma présente de nombreuses inclusions dont les plus importantes sont [45] :

- Les granules de cyanophycine : la cyanophycine, molécule propre aux cyanobactéries, est un polymère d'acide aspartique et d'arginine. Ce polypeptide, non fabriqué par les ribosomes, constitue une forme de réserve d'azote et d'énergie ;
- Les carboxysomes : ils contiennent le ribulose-1,5 phosphate carboxylase, responsable de la fixation du CO₂. Cette enzyme n'est présente que dans des conditions de hautes intensités lumineuses et de hautes concentrations en nitrates ;
- Les granules d'amidon cyanophycéen (glycogène), d'hydrates de carbone similaires à l'amylopectine et ceux de volutine (polyphosphates) constituent des formes de réserve énergétiques ;
- Les ribosomes riches en acide ribonucléique ;
- Les globules lipidiques ;

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

1.2.2 Croissance.

La spiruline est une espèce photoautolithotrophe (grâce à ses pigments chlorophylliens), aérobic. Par conséquent, elle est dotée des photosystèmes I et II [54]. La photosynthèse constitue alors la clé de sa croissance.

Pour sa photosynthèse, la spiruline a besoin d'eau, de carbone, et d'éléments nutritifs dont l'azote en particulier. Elle assimile une source de carbone minéral (le CO₂ atmosphérique) et la convertit en énergie biochimiquement utilisable représentée par le glucose. Son point commun avec les autres cyanobactéries est qu'elle ne possède pas le cycle de Krebs complet [16 ; 49].

L'énergie lumineuse est captée par des pigments assimilateurs représentés par les chlorophylles. La chlorophylle de la spiruline et des autres bactéries photosynthétiques se situe dans les régions spécialisées de leur membrane cellulaire : les phycobilisomes des thylakoïdes. La photosynthèse est divisée en deux phases : une série de réactions dites "lumineuses" et une série de réactions dites "obscurées" [55].

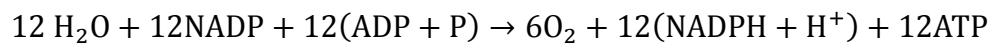
1.2.2.1 Les réactions lumineuses.

Ces réactions nécessitent la présence de lumière et s'effectuent dans les membranes thylakoïdiennes pour la spiruline (dans les chloroplastes pour les cellules végétales). Cette lumière permet d'apporter l'énergie nécessaire à la réaction photosynthétique. Les thylakoïdes contiennent des pigments photosynthétiques organisés en deux photosystèmes : les photosystèmes I et II, respectivement notés PS I et PS II. C'est au niveau des membranes communes à deux thylakoïdes que se trouvent ces deux photosystèmes ; ils sont toujours placés à proximité l'un de l'autre [56].

Le PS I possède une plus grande variété de pigments que le PS II et il est riche en chlorophylle de type a P700 : celle-ci absorbe des longueurs d'onde de 430 nm dans le bleu

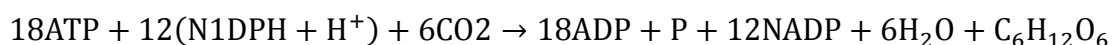
et de 700 nm dans le rouge. La source d'électrons est constituée par les minéraux et les molécules organiques. Le PS II est riche en chlorophylle de type a P680. C'est à son niveau que se produit la photolyse de l'eau, c'est-à-dire qu'il récupère les électrons libérés par les molécules d'eau. La phycocyanine, pigment spécifique aux cyanobactéries, est essentielle au transport de l'énergie vers le PS II [56].

Au cours de cette phase lumineuse, il y a photolyse de l'eau : les molécules d'oxygène et d'hydrogène se séparent. On assiste également à la synthèse d'ATP (Adénosine triphosphate), molécule dont la consommation libère beaucoup d'énergie, et de NADP (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) [56].

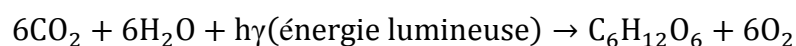


1.2.2.2 Les réactions obscures.

Elles ont lieu dans le stroma (matrice) du thylakoïde, où l'énergie produite lors de la phase lumineuse y est stockée sous forme d'ATP et de NADP réduit. Cette énergie est utilisée pour la synthèse de molécules organiques, par réduction du dioxyde de carbone. Cette phase est dite obscure car elle correspond à une série de réactions qui ne nécessitent pas de lumière ; ce n'est pas pour autant qu'elles se déroulent la nuit, au contraire. Ces réactions forment le cycle de Calvin. A l'issue de ce cycle, une molécule de glucose est synthétisée [56].



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



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

Les chlorophylles sont des pigments photosynthétiques et elles peuvent être excitées par les radiations lumineuses. Cette excitation est due à la présence de liaisons

conjuguées (et donc d'électrons délocalisés) [57] (Appendice B) : l'arrivée d'un photon fait passer un électron délocalisé d'un état fondamental (non excité) à un état excité. La chlorophylle, une fois excitée, retourne à son état fondamental, plus stable thermodynamiquement. Ceci peut se faire de plusieurs manières, en particulier :

- En émettant de la lumière (c'est la fluorescence constatée dans une solution de chlorophylle) ;
- En transférant son énergie à une molécule très proche (c'est la résonance, qui permet aux pigments de l'antenne collectrice des photosystèmes de transférer l'énergie lumineuse de molécule en molécule jusqu'à une chlorophylle piège) ;
- En perdant un électron (c'est la photochimie, laquelle permet à la molécule de chlorophylle piège du photosystème, de réduire un accepteur d'électron et donc de réaliser la chaîne photosynthétique) [56].

La nuit, c'est la respiration qui permet à la spiruline de produire l'énergie nécessaire à son entretien et à sa croissance. Les hydrates de carbone produits pendant le jour, subissent une oxydation qui les convertit en protéines, avec en parallèle une formation de CO_2 (lequel reste dissous dans le milieu de culture) et d' H_2O . Puis, avec le retour de la lumière du jour, le CO_2 participera à un nouveau cycle de photosynthèse [16]. La photosynthèse et la respiration s'équilibrent globalement.

1.3 Ecologie.

La Spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines, contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), et riches en nutriments azotés et phosphorés [16]. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales [58].

Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition dans des lacs de la ceinture intertropicale du globe terrestre. Ces lacs sont situés approximativement entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud ; ils sont peu profonds et agités par des vents légers. En dehors des sites cités en appendice C, d'autres endroits sont possibles, notamment partout où vivent le flamant nain (Afrique et Asie) et le flamant de James, *Phoenicoparrus jamesi* (Amérique du sud). Cet organisme est dit ubiquiste [16 ; 49].

1.4 Reproduction.

La spiruline se reproduit par bipartition par scission simple. C'est une reproduction asexuée, par segmentation des filaments [39 ; 50].

Le filament de Spiruline à maturité forme des cellules spéciales appelées *nécriides*. Elles se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. À 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 et prendre la forme typique hélicoïdale (figure 1.2). Sa vitesse de multiplication est particulièrement rapide dès que la température dépasse 30°C à l'ombre ; lorsque ces conditions sont réunies et que le milieu est favorable, le temps de génération est très court (7 heures) [30].

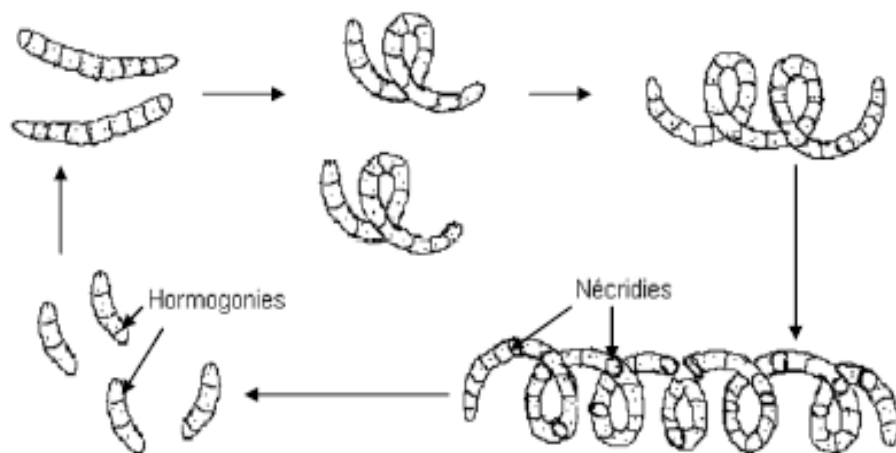


Figure 1.2 : Cycle biologique de la Spiruline [37].

1.5 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 (5µm/secondes) [59-62].

La microscopie électronique a permis de comprendre la motilité des filaments : cette technique met en évidence l'existence de *fimbriae* de 2 à 10 nm de diamètre et 1 à 2µm de longueur ; ces filaments tubulaires dépassent de minuscules pores situés sur le pourtour des extrémités de la cellule [61 ; 63 ; 64]. Les *fimbriae* sont aplatis contre la paroi cellulaire externe et pointent dans la même direction [30]. Comme des rameurs sur une galère, ils propulsent le filament d'arrière en avant [49].

La spiruline flotte, elle peut fabriquer des vésicules de gaz d'environ 70 nm de long et 10 nm de diamètre, faites d'une chaîne de protéines tissées [65]. 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 [66]. 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 [47].

A la fin du jour, 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 [67]. 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, la majeure partie des hydrates de carbone accumulés est convertie en protéines, pendant que du CO₂ 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 [47].

Ces deux méthodes de locomotion permettent à la spiruline de se protéger elle-même contre une overdose mortelle de soleil [39].

CHAPITRE 2

PRODUCTION DE LA SPIRULINE.

En dehors de la "cueillette" de la spiruline issue des lacs où elle pousse naturellement, la spiruline doit être produite si on veut couvrir la demande. Or, le seul moyen de la produire en grande quantité est la culture en bassins.

2.1. Paramètres environnementales influençant la culture de la spiruline.

2.1.1. La température.

La spiruline pousse idéalement lorsque la température du milieu de culture est de 37°C. Des températures supérieures à 40°C ne lui conviennent pas, et, elle meurt lorsqu'elle est exposée à 43°C. Par ailleurs, à 20°C, sa croissance est pratiquement nulle [19].

2.1.2. Luminosité.

Nécessaire pour la photosynthèse, les cellules de la spiruline supportent la lumière jusqu'à un certain point. La spiruline exposée à un fort ensoleillement (120000 lux), est décomposée (décolorée) en quelques minutes et tuée. Les cultures qui démarrent avec une faible population, demandent à être ombragées pour éviter la photolyse. Pour obtenir la meilleure production d'une culture, il faut une lumière juste au-dessous du seuil de photolyse [16] accompagnée de l'optimum des facteurs restants.

2.1.3. Agitation.

Une production, donc une photosynthèse, optimisée, ne peut être atteinte qu'en agitant la culture ce mouvement de l'eau, assure une répartition moyenne de la lumière et

de l'obscurité ainsi que celle des nutriments [16]. Tout cela sans engendrer un stress hydrodynamique risquant de casser les filaments de la spiruline [68 ; 69]. Une exposition directe à un fort soleil provoque la photolyse des filaments de spiruline. Mais, en diminuant l'intensité lumineuse, on diminue aussi la photosynthèse totale. L'agitation du milieu de culture constitue un bon moyen d'éviter la photolyse sans modifier l'intensité lumineuse, en mettant alternativement les filaments à la lumière et à l'ombre. En cas de soleil très fort, on peut se contenter d'agitations plus ou moins fréquentes (quelques minutes toutes les heures, au moins 4 fois par jour [19]).

Les agitations peuvent se faire manuellement, avec un balai ou une rame, ou grâce à des pompes n'endommageant pas les spirulines. En cas d'agitation par une pompe immergée, un débit de 1 à 2 m³/h, peut suffire pour des bassins de 10 à 15 m². Des surfaces de bassin plus grandes nécessitent des pompes plus puissantes qui risqueraient de casser la spiruline [19 ; 70].

Märkl (1980) [71] et Weller et Franck, 1941 [72], ont démontrés que, théoriquement, la photosynthèse la plus rapide serait obtenue avec une cadence des cycles ombre-lumière de mille par seconde ou plus. Cela n'est possible qu'en ajoutant des déflecteurs dans le courant d'eau ; la production de biomasse est triplée par rapport à celle d'un bassin simplement agité par une roue à aubes. Par ailleurs, la fréquence d'agitation est aussi un paramètre important. L'ensemble des spécialistes affirme qu'une agitation discontinue énergique est préférable à une agitation continue mais faible [19].

2.1.4. Facteurs concernant les bassins de culture.

2.1.4.1. Localisation.

Le lieu d'implantation des bassins ne doit pas se faire au hasard. En effet, il faut respecter quelques règles *a priori* pas toujours évidentes : ne pas construire les bassins sous des arbres (besoin d'ensoleillement), ni en un lieu inondable, ni près d'une route ou d'une industrie (pollution). Eviter aussi la proximité de certains éléments comme les haies, barres rocheuses, forêts, etc. qui peuvent entraîner des conséquences importantes sur le microclimat [16].

Le terrain du site choisi pour la construction des bassins doit être aménagé avant toute chose (épierrage, nivellement du sol, confection d'une dalle en ciment). Le site doit être facilement accessible mais clôturé pour prévenir des interventions extérieures (curiosité sur le contenu des bassins, vol du matériel et des matériaux etc.). Il est également préférable d'avoir une source d'eau à proximité des bassins [73].

Le site doit être assez spacieux pour accueillir non seulement les bassins mais aussi les locaux adjacents. Il faut en effet prévoir :

- Des allées de circulation entre les bassins ;
- Un local pour le stockage des matériaux et des produits chimiques (intrants) ;
- Un local pour les pesées, les analyses et les contrôles, le conditionnement et la tenue des registres de production ;
- Un emplacement pour les séchoirs solaires ;
- Un autre local pour un séchoir chauffé au gaz (précaution élémentaire durant la saison des pluies car la spiruline produite serait perdue faute de pouvoir être séchée).

Tous ces locaux peuvent évidemment être regroupés dans un même édifice [19].

2.1.4.2. Mode de construction.

2.1.4.2.1. Les bassins en dur.

Ces bassins sont faits avec du béton renforcé, du ciment, des pierres cimentées, des parpaings, des briques, du banco etc. Ce sont les plus durables (durée moyenne de 10 ans) et les plus faciles à nettoyer, mais aussi les plus chers. L'idéal est de les construire sur une dalle en béton armé de 10 cm d'épaisseur minimum, coulée sur un terrain bien compacté. Soigner l'enduit d'étanchéité (un adjuvant imperméabilisant ou une peinture époxy ou sinon peindre l'enduit ciment à la chaux). Il est bon d'attendre quelques jours, bassin plein d'eau, avant d'ensemencer en spirulines (sinon l'alcalinité de la chaux ou du ciment frais peut jaunir très rapidement les spirulines) [19].

2.1.4.2.2. Les bassins en bois-plastique.

Le sol nivelé est recouvert avec un film plastique et les montants sont constitués par un cadre en bois (planches, panneaux, lattes, tasseaux) supportant une bâche plastique de forte épaisseur. Une épaisseur de film de 0,25 mm à 0,5 mm, est recommandée. Le film (PVC, polyéthylène,...), de qualité alimentaire et résistant aux ultraviolets. En principe, au bout de trois ans, ces bassins exigent des réparations voire un remplacement total [19].

2.1.4.2.3. Les bassins en argile.

Ces bassins constituent une solution faite de mieux : il s'agit d'une excavation ceinturée par un muret en terre compactée rendue étanche par de la glaise, par des briques cuites ou par un film plastique. La spiruline pousse très bien dans ces bassins mais sa pureté bactériologique doit être surveillée de plus près ; il y a, en effet, un risque accru de présence de micro-organismes anaérobies au fond. En général, leur étanchéité est améliorée par l'utilisation d'un film plastique [19].

2.1.4.2.4. Les récipients.

Il arrive que l'on utilise comme petits bassins des récipients translucides comme des bouteilles, bonbonnes, bassines, gaines en film plastique, containers. Il faut savoir que la vitesse de photosynthèse paraîtra plus rapide dans de tels récipients parce que le milieu de culture y reçoit la lumière de plusieurs côtés et s'échauffe aussi plus vite. Cela peut être avantageux, mais il faut surveiller la température et le pH de plus près que dans les bassins ordinaires. L'agitation dans de tels récipients se fait de préférence par air comprimé (compresseur d'aquarium) [19].

Globalement, il faut retenir que les bassins sans garniture intérieure ne sont pas satisfaisants, car on retrouve des grains de sable fin ou des particules d'argile dans le produit fini, du fait de l'agitation. C'est pourquoi la dalle en ciment ou en béton est fortement conseillée [19 ; 71].

Concernant la physionomie des bassins, il est recommandé qu'ils soient de forme arrondie et sans angles vifs. Leur fond doit être aussi plan que possible, avec une légère

penne vers un endroit plus creux d'accès facile pour faciliter la vidange. L'expérience montre que la profondeur idéale est comprise entre 20 et 40 cm. Par ailleurs, les bords du bassin doivent être surélevés par rapport au niveau du terrain, de façon à limiter l'entrée des poussières et des petits animaux [71].

2.1.4.3. Nombre et surface unitaire.

Pour une culture artisanale, l'installation doit comprendre deux sortes de bassins : ceux servant pour l'ensemencement et ceux réservés à la production proprement dite [74].

Les premiers sont petits (2 à 4 m²) et de forme ronde ou rectangulaire ; au nombre de deux ou trois, ces bassins d'ensemencement ont un rôle primordial dans la survie d'une culture. En ce qui concerne les bassins de production, ils sont rectangulaires et leur surface varie généralement entre 30 et 50 m². La largeur maximale conseillée est de 3 à 4 m ; cette largeur est volontairement limitée afin de toujours pouvoir pratiquer une agitation manuelle. La longueur moyenne de ces bassins est comprise entre 8 et 15 m [75].

Les experts dans ce domaine signalent qu'il est préférable de construire deux ou plusieurs petits bassins de production plutôt qu'un seul grand. Ainsi, en pratique, le coût d'investissement au m² décroît quand augmentent la surface unitaire et le rapport surface/périmètre des bassins [19].

Pour une culture familiale, la surface unitaire recommandée est comprise entre 5 et 20 m². Cette surface de bassin permet d'obtenir une production allant de 15 à 80 g de spiruline par jour. A titre indicatif, voici les surfaces requises pour les autres types de production de spiruline [19] :

- 50 à 100 m² pour une production artisanale ;
- 1 000 m² et plus pour une production semi-artisanale ;
- 5 000 m² maximum pour une production industrielle.

2.1.4.4. Couverture.

Il est utile, voire nécessaire, d'installer une serre ou au moins un toit sur le bassin. Il peut être en toile de tente blanche ou en tissu polyamide enduit PVC blanc. Il peut aussi

être en plastique translucide : film de polyéthylène traité anti-UV utilisé pour la construction des serres horticoles [19]. Si le toit est opaque, il faut le mettre suffisamment haut pour que le bassin reçoive assez de lumière par les bords.

Les films utilisés doivent être stabilisés contre les rayons UV et ne pas poser de problème de sécurité alimentaire. Des orifices d'aération et/ou d'accès doivent être prévus, ainsi qu'un dispositif d'ombrage [19 ; 73].

2.1.5. Les photobioréacteurs.

Un photobioréacteur est constitué d'un système de tubes en plastique transparent posé sur un plan plat ou incliné. Placés verticalement ou horizontalement, ils sont souvent agencés sous forme de murs de tubes horizontaux ou verticaux [76].

2.1.5.1. Les photobioréacteurs plats.

Ce sont généralement des réacteurs de petit volume pour usage en laboratoire [77 ; 78]. Ils ont des dimensions variables selon le nombre des panneaux qui les composent [76]. L'épaisseur de la culture, au sein de chacun des panneaux, peut varier de 1 cm à 17 cm [78].

2.1.5.2. Les photobioréacteurs cylindriques.

Utilisés en laboratoire ont un volume de l'ordre de quelques litres [79 ; 80], mais peuvent atteindre facilement quelques dizaines de litres [81 ; 82], voire des volumes plus importants [83]. Ils se composent d'un ou plusieurs tubes transparents, de diamètres et longueurs variables, de configurations diverses : colonne, chambre annulaire, en serpent, ...) et au sein desquels circule la culture [84].

2.1.5.3. Les photobioréacteurs de type colonnes.

Ils font, généralement, 2 m de haut pour environ 30-50 cm de diamètre et sont éclairés latéralement par des tubes fluorescents [76].

2.1.5.4. Les photobioréacteurs annulaires.

Ce sont des photobioréacteurs cylindriques agencés d'une manière particulière : ils sont fabriqués à partir de deux tubes de diamètres différents emboîtés l'un dans l'autre pour constituer ainsi un espace annulaire dans lequel circule la culture. La variante annulaire est intéressante du point de vue distribution de la lumière mais difficile à extrapoler car elle occupe une surface importante au sol pour un volume de culture restreint [84].

2.1.5.5. Les photobioréacteurs tubulaires agencés horizontalement.

La configuration tubulaire se présente sous forme de boucles, ou serpents, qui laissent passer la lumière entre les interstices des boucles [85].

2.1.5.6. Les photobioréacteurs tubulaires agencés verticalement.

Des photobioréacteurs à structure verticale ont été conçus : ils utilisent généralement des tubes de diamètre relativement faible (inférieur à 200 mm) [84]. Ils peuvent être enroulés autour d'une structure verticale, ce qui offre l'avantage de pouvoir utiliser une grande longueur de tube (donc un grand volume de culture) tout en occupant une surface réduite [77 ; 86].

En production industrielle (usages aquacole ou agroalimentaire), les photobioréacteurs cylindriques ont des volumes qui oscillent entre quelques centaines de litres, en intérieur [88], et quelques milliers de litres en extérieur [87 ; 89]. Selon Tzygankov (2001) [87], pour obtenir des volumes importants, la connexion par des tubulures, de plusieurs unités de photobioréacteurs cylindriques entre elles reste la méthode la plus efficace [76 ; 87 ; 90].

Un réservoir en tôle peint en noir reçoit l'eau du tuyau de retour. Le soleil chauffe l'eau de ce réservoir. L'eau chaude, par convection, remonte dans les tubes transparents. Puis elle atteint un réservoir plat en tôle peinte à l'aluminium, placé en haut. Le refroidissement commence là. L'eau en ressort par des tubes formant des serpents dans

un échangeur. Recueillie par un tube transversal, l'eau retourne par le tuyau et boucle le cycle [19].

L'éclairage peut être simplement naturel [91-93] ou artificiel [94] : ils utilisent un harnais de fibres optiques (ou réseau de gaines transparentes) disposé au centre de la chambre du réacteur. Ce système de conduction lumineuse accentue la diffusion de la lumière au cœur du milieu de culture [83].

Tout comme en bioréacteur, un suivi et un contrôle de grandeurs caractérisant la croissance est nécessaire telles que le dégagement d'oxygène, la consommation de dioxyde de carbone, l'augmentation du pH... Une régulation est mise en place afin d'assurer une optimisation des cultures [76 ; 78 ; 82 ; 85 ; 91 ; 95-99]. Le photobioréacteur est surtout utilisé pour la production de biomasse très pure, pour en extraire des molécules de haute valeur. Il ne convient pas à la culture de masse. Les tubes, les bioréacteurs et les micro-fermes sont employés dans les pays tempérés ou froids, où cette micro-algue ne peut pas croître naturellement. Ce sont des systèmes très chers [46].

2.2. Conduite de la culture de spiruline.

2.2.1. Elaboration du milieu de culture initial.

2.2.1.1. L'eau.

Les spirulines vivent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être potable sans sentir le chlore. Les eaux trop dures sont à éviter car elles peuvent gêner la culture en formant des boues minérales, surtout lorsque l'ensemencement initial en spiruline n'est pas assez concentré [100-102].

La conduite de culture de la spiruline nécessite un minimum de ressources en eau. Elle en nécessite pas autant que les cultures irriguées qui en consomment jusqu'à cinq fois plus, mais assez pour un emplissage initial du bassin, peu profond et en suite assez pour compenser l'évaporation. La spiruline, peut supporter la concentration très élevée des sels qui survient quand l'eau des bassins de culture s'évapore [16]. Lorsque celle-ci disparaît, les filaments des algues s'agglomèrent par attraction capillaire en petits agrégats ou

plaques. La pression osmotique très élevée fait sortir des cellules les polysaccharides de la spiruline qui forment une couche protectrice contre la perte d'eau interne ou adhérente. Cette couche, sera dévorée par des bactéries lors d'une réhydratation, cette technique de survie est dite « cryptobiose » ou « anhydrobiose » [16].

En effet, la spiruline préfère une eau où Na^+ est l'ion le plus abondant, avec K^+ abondant, et Ca^{++} et Mg^{++} manquants ou en très faible quantité. Les cations dominants sont les ions carboniques et bicarboniques ; SO_4^- peut être relativement abondant et Cl^- plutôt bas [70].

2.2.1.2. La salinité.

La salinité est apportée par les produits chimiques servant d'engrais (à l'exception de l'urée, ce sont des sels) et complétée par du chlorure de sodium. Elle correspond à la somme des poids de tous les sels dissous dans le milieu, doit être au minimum égale à 13 g/litre [19 ; 101].

2.2.1.3. L'alcalinité.

Elle est apportée sous forme de bicarbonate de sodium ou, à défaut, à partir de soude caustique ou de carbonate de sodium, lesquels vont se bicarbonater lentement au contact de l'air. En pratique, la composition des milieux de culture est variable, en fonction de la disponibilité ou du prix d'achat des produits chimiques nécessaires à leur élaboration. Le pH initial du milieu doit être assez élevé (entre 7,8 et 8,5). Le pH d'une culture florissante doit ensuite se situer entre 9,5 et 10,5. Il faut savoir que lorsque le pH dépasse 10,5, le CO_2 apporté est insuffisant pour compenser le prélèvement par la spiruline et sa croissance est donc limitée par le manque de CO_2 . Un apport de CO_2 permet alors d'abaisser le pH tout en fournissant du carbone pour continuer la croissance de la spiruline [100].

Les limites de salinité et d'alcalinité permises sont assez larges mais, pour des raisons d'économie et de productivité, on fait en sorte de respecter les valeurs minimales nécessaires [16].

2.2.1.4. Nutrition de la spiruline.

Les produits chimiques jouant le rôle d'engrais pour assurer la croissance de la spiruline doivent contenir de l'azote, du phosphore et du potassium ; ces éléments classiques existent sous des formes variées. D'autre part, le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés dès lors qu'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau, le sel et les engrais [19].

- Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite. L'azote est donc le plus souvent apporté par du nitrate, dont on peut mettre sans danger une forte dose, afin de constituer une réserve d'azote à long terme ;
- Le phosphore peut être apporté par du phosphate mono-ammonique ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), du phosphate trisodique ($\text{Na}_3\text{PO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$) ou du phosphate dipotassique (K_2HPO_4) ;
- Le potassium, quant à lui, peut être apporté par le nitrate de potassium, le chlorure de potassium, le sulfate ou le phosphate dipotassique ;
- La source de magnésium employée est généralement le sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) [16 ; 19].

Si l'on ne dispose pas de produits chimiques, certaines méthodes d'utilisation de produit naturels peuvent être employées. Elles sont explicitées dans le Manuel de Culture Artisanale de la spiruline, écrit par J.P. Jourdan [19].

Le milieu doit en outre contenir tous les oligo-éléments nécessaires à la croissance de la spiruline : zinc, acide borique, manganèse, cuivre, chrome, cobalt, molybdène...; ceux-ci sont généralement présents dans l'eau utilisée ou apportés par les impuretés des sels.

Il est important de noter que la consommation d'intrants se fait en deux temps et correspond à deux formulations différentes :

- La première consommation correspond à la préparation du milieu liquide dans lequel on introduit la souche de spiruline que l'on veut voir croître, à travers toutes

les étapes de son développement, depuis les petits bassins successifs d'ensemencement, jusqu'au bassin définitif où la récolte sera possible [101] ;

- La deuxième consommation est une consommation d'entretien : chaque fois qu'on récolte de la spiruline, il faut remettre dans le bassin une quantité d'intrants en rapport avec ce qui vient de sortir du bassin sous forme de spiruline. Une formulation spécifique correspondant à cette consommation est détaillée un peu plus loin [19].

Le milieu proposé par C. Zarrouk (voir matériel et méthodes) est un milieu standard très souvent cité comme référence. Il présente l'intérêt de s'adapter à presque toutes les souches de spiruline et de simplifier considérablement le travail de l'algoculteur. Toutefois, il comporte des minéraux et pas toujours faciles à se procurer.

2.2.2. Ensemencement de la souche choisie.

Les experts en culture de spiruline recommandent aux futurs exploitants de choisir une semence monoclonale, exclusivement spiralée, de grande taille, filtrant facilement et de couleur bleu-vert A partir d'1 g de semence, un taux de croissance de 20 % par jour permet d'obtenir 20 m² d'un bassin de 15 cm de profondeur, la récolte étant possible dès le quarantième jour [16 ; 19 ; 75].

Après l'ensemencement, les dilutions à effectuer dépendent essentiellement des conditions climatiques (température et ensoleillement) ; des dilutions de l'ordre de 15 à 30 % par jour sont possibles. La difficulté de cette étape est justement de réussir à augmenter la taille des bassins sans trop diluer la spiruline, le risque étant de tout perdre. Un instrument simple à utiliser évite ce genre de souci : le disque de Secchi. Cet instrument permet en effet d'évaluer la concentration en spiruline dans les bassins. Une fois la taille de bassin voulue atteinte, on arrête les dilutions et la récolte peut commencer [19].

Une fois que la culture a démarré, il faut tenir compte des constituants qui disparaissent du milieu, après avoir été consommés par la spiruline. Il est préférable d'avoir des ravitaillements fréquents et fractionnés plutôt qu'une nourriture importante mais tardive. L'idéal est de reconstituer le milieu nutritif après chaque récolte de 1 kg de spiruline [101 ; 103].

2.2.3. Entretien des bassins et surveillance des cultures.

Selon J.P Jourdan [19], le nettoyage des bassins doit se faire environ tous les 3 mois. La meilleure méthode consiste à transférer provisoirement la majeure partie du contenu du bassin dans un bassin voisin, puis de vidanger les boues, et broser les bords et le fond, en rinçant. L'idéal pour maintenir un milieu clair est de broser une fois par jour le fond et les côtés du bassin, agiter pendant la nuit, et garder un pH inférieur à 10,5. Si cela ne suffit pas, il faut épurer ou purger le milieu.

En effet, après deux à quatre mois de culture (selon le niveau de productivité) sans purge, il est fréquent que le milieu de culture, neuf et parfaitement clair au départ, devienne plus ou moins trouble ; la vitesse de filtration baisse et le pressage de la biomasse devient difficile. C'est pourquoi la pratique régulière de purges est recommandée [16, 19].

Au cours de la culture, plusieurs paramètres sont à contrôler régulièrement, La température idéale est à 35-37°C ; le pH de 9,5 à 10,5 ; le niveau d'eau initial doit être maintenu. Il faut aussi estimer la quantité d'exo polysaccharide sulfaté (EPS) formée. Il est important aussi d'évaluer régulièrement la densité des bassins en spiruline, afin d'éviter les phénomènes de limitation de croissance. Ceux-ci apparaissent suite au manque de lumière, dans le cadre de cultures trop denses. C'est le disque de Secchi qui permet de savoir s'il est temps de récolter ou pas. Lorsque celui-ci est à inférieur à 3 unités, c'est le bon moment [19].

Un autre paramètre, très important est l'aspect des filaments, en fait, des "spirulines droites" apparaissent fréquemment dans les cultures. Les scientifiques ont pu vérifier que ces "droites" apparues jusqu'à présent étaient bien des spirulines (*Arthrospira platensis*), de composition normale [104]. Ces vérifications ont été réalisées en utilisant des critères dimensionnels, morphologiques et nuances de couleur, et également grâce à une étude des "empreintes génétiques" par l'Université de Genève [105]. Néanmoins, elles ont des inconvénients, notamment une difficulté à se récolter. De plus, il convient d'être vigilant car elles ressemblent aux cyanobactéries *Oscillatoria*, dont il existe des variétés toxiques. Finalement, sur ce sujet des spirulines droites, les experts en culture de spiruline restent humbles et reconnaissent volontiers leur ignorance [19].

Pour être sûr que ces formes sont effectivement de la spiruline et non une *Oscillatoria* toxique, une mesure sous microscope tout en se référant aux clés suivantes :

- *O. agardhi*, peut produire de l'hépatotoxine, microcystine ;
- *O. rubescens* (maintenant *Planktotrix rubescens*) produit un dérivé méthylène de l'anatoxine-a (neurotoxine) appelée homo antx-a [106 ; 107].
- *O. formosa bory*, produit la neurotoxine, homoanatoxine – a [107], maintenant classée comme *Phormidium formosa*, elle produit aussi des mycrocystines [108].
- *O. mougeorii*, maintenant classifiée comme *Planktothrix mougeorii*, produit une hématotoxine [108].
- *O. prolifica*, maintenant : *Planktothrix prolifica*, produit une hépatotoxine.
- *O. nigroviridis* peut être cancérigène et est un poison pour les poissons [109].
- *O. tennius* et *O. brevis* produisent des lipopolysaccharides contenant une endotoxine toxique pour les souris et qui cause des gastro-entérites provenant de l'eau chez l'homme (moins nocif que les endotoxines bactériennes gram négatif).

Par ailleurs, il faut savoir que tant que la spiruline est en croissance active, bien nourrie, récoltée, agitée, à pH > 9,5, d'une belle couleur vert foncé et que le milieu est régulièrement purgé, aucune espèce d'algue concurrente ne réussit habituellement à envahir le bassin. Cependant, l'apparition d'algues étrangères est toutefois possible [110].

D'après J.P Jourdan [110], le fait d'avoir une culture assez dense dès le début, évite le développement des chlorelles, diatomées et autres variétés d'algues : en effet, elles sont privées de lumière donc restent au fond. Les algues intruses peuvent être de simples chlorelles (algues vertes monocellulaires comestibles), des *Oocystis* (grosses chlorelles) ou des cyanobactéries toxiques.

L'observation au microscope permet aussi de constater si les filaments sont cassés (par agitation trop vive, trop de lumière ou manque de potassium), s'ils sont de petite taille (vitesse de croissance trop rapide, salinité ou pH trop élevés) ou à l'inverse, anormalement longs (manque de fer) [111].

2.2.4. Incidences et remèdes.

2.2.4.1. Manque d'oxygène.

Si l'oxygène peut être considéré comme un poison pour la spiruline quand il est en forte sursaturation pendant la photosynthèse active, ce n'est pas le cas en l'absence de lumière puisque la spiruline a alors besoin d'oxygène pour respirer. Comme l'a montré J. Falquet, on atteint facilement l'anoxie en présence de 100 ppm de sucre, même en agitant la nuit [19].

2.2.4.2. Changement de couleur du milieu de culture.

La couleur du milieu de culture est une chose facile à vérifier car elle ne nécessite pas d'équipement particulier. Elle permet généralement de bien apprécier l'état de la culture [111].

2.2.4.2.1. Une couleur pâlie.

Elle signale souvent un manque d'azote fixé ($\text{pH} < 10,5$) et/ou de CO_2 ($\text{pH} > 10,5$) : il faut alors vérifier le pH du milieu. Si l'examen au microscope montre que la couleur pâle est liée à des cellules "vides", alors la culture a probablement été stressée (par un brusque changement de pH ou une variation brutale de la pression osmotique dans les cellules) [16].

2.2.4.2.2. Une culture d'un bleu-vert foncé.

Cette couleur indique que la chlorophylle était masquée par les autres pigments (phycocyanine, phycoérythrine et xanthophylle), lorsque la culture est ombragée ou assez dense [16].

2.2.4.2.3. Une culture jaune ou vert-olive.

Dans ce cas, il y a eu destruction de la chlorophylle (photolyse), suite à un excès de lumière, d'un manque d'azote, d'une agitation trop faible ou d'un pH supérieur à 11,5 [16].

2.2.4.2.4. Une culture jaunâtre avec écumes.

Elle signifie qu'il y'a eu lyse et que les parois des cellules sont rompues, en expulsant des polysaccharides dans l'eau. Il faut ombrager, abaisser le pH avec du CO₂ ou du bicarbonate et ajouter de l'azote fixé et du potassium [16].

2.2.4.2.5. Une culture jaunâtre sur un fond d'eau grisâtre ou laiteux.

Cette apparence signifie que la micro-algue souffre d'un déficit en carbone et éventuellement en azote. De plus, il a en général beaucoup de bactéries. Mais normalement, elles ne s'attaquent pas à la spiruline (surtout si l'agitation est rapide) et elles meurent dès qu'il n'y a plus de polysaccharides dans le milieu [16].

2.2.4.2.6. Une absence de couleur.

Elle indique que la spiruline a été soit piégée (dans des amas de polysaccharides, dans des cristaux de carbonate de calcium ou de phosphate), soit dévorée par des prédateurs, amibes (*C.f.* paragraphe 2.2.4.6). La seule chose à faire est alors de nettoyer totalement le bassin et de recommencer une culture [19].

2.2.4.3. Apparition d'une odeur forte et désagréable.

Les odeurs d'indole, d'hydrogène sulfuré ou de fermentation butyrique peuvent provenir d'infestations bactériennes sévères [16].

2.2.4.4. Viscosité.

La viscosité d'une culture de spiruline est normalement à peu près celle de l'eau (1,002 centipoises). Si la culture devient visqueuse, c'est à cause des exsudats des cellules (quand un filament se sépare en deux, le contenu de la cellule placée à la rupture se répand dans le milieu, les extra-métabolites engendrent une concentration des ions OH⁻ ce qui rend la texture du milieu savonneuse, ainsi se forme l'écume, si le pH dépasse 10,5 il faut rajouter du CO₂ [16].

2.2.4.5. Formation d'amas.

Ces amas se forment suite à l'exsudation des EPS, un excès de bicarbonates dans le milieu, le manque d'azote fixé et le manque de soufre [112]. L'EPS est une espèce d'alginate sécrétée par les spirulines, et qui forme comme une capsule au niveau de leur surface externe. L'EPS est ensuite peu à peu relâché dans le milieu de culture. Dans un premier temps, il se dissout dans ce milieu, le rendant plus épais ; ensuite, il se polymérise, s'insolubilise et finit par former des grumeaux jaune-bruns gélatineux parfois visibles à l'œil nu. Selon J.P Jourdan, le fait de ne pas récolter beaucoup, en laissant monter la concentration en spiruline, augmenterait le passage d'EPS dans le milieu. Un excès de formation est lié à un manque d'azote fixé et/ou à un pH trop bas ; on peut y remédier en ajoutant de l'urée et/ou du carbonate de soude [19].

Les masses gélatineuses de polysaccharides, lorsqu'elles sont nombreuses, piègent les filaments de spiruline, les entraînent au fond du bassin où ils meurent, faute de lumière et d'accès aux éléments nutritifs. En dehors de cette perte de rendement, la forte production d'EPS est aussi un problème dans le sens où elle salit le milieu de culture et conduit à des difficultés de récolte [113] : un excès d'EPS semblait conduire à une impossibilité d'essorer la biomasse par pressage, alors qu'un défaut d'EPS semblait conduire à une biomasse très collante mais facilement essorable [27].

2.2.4.6. Contamination par des micro-organismes.

Par contre, l'activation des spores de bactéries est inhibée par un pH élevé (8,5 et plus) de sorte que les spores ne se développent pas sous forme végétative dans une culture de spiruline. Les contaminations par d'autres algues sont fréquentes. Les plus communes sont la *Chlorella* et la diatomée *Navicula* ; cette contamination apparaît dans les débuts de la culture (diluée). Quand la spiruline devient plus dense, elle les prive de lumière et les autres algues meurent. Il y'a tout de même une possibilité de contamination par d'autres algues bleues, dont certains ont été indiquées comme toxiques : *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Synechocystis*, *Microcystis aeruginosa*, *Aphanazominon flos-aquae* [114]. Beaucoup de virus sont détruits par oxydation [115] sinon, ils seront attaqués par la forte tension de l'eau due à la photosynthèse des algues. Les protozoaires et les amibes aussi bien sous forme végétative que les kystes ne résistent pas à la température du séchage, en outre, les

kystes ne supportent pas un pH élevé [115-117]. Dans le cas de la spiruline, les protozoaires sont utiles en dévorant les bactéries ; ils sont éliminés par effet serre ou en réduisant l'agitation et la profondeur de la culture par jour chaud et bien ensoleillé [16]. Les rotifères sont éliminés Par filtration avant récolte par un filtre de 130µm de diamètre [16].

D'autres contaminants que l'on rencontre souvent sont les larves de certains insectes ; en particulier les moustiques et la mouche des marais salés, *Ephydra*. Ils gênent en consommant beaucoup de spiruline, leurs élimination se fait par des filets –filtres- de 500µm de diamètre [16].

2.2.4.7. Contamination par les métaux lourds.

La spiruline absorbe très facilement les métaux lourds présents dans le milieu de culture. Certains sont toxiques pour l'homme (mercure, plomb, cadmium) [16].

On comprend aisément la nécessité d'avoir, sur le site d'exploitation, un petit laboratoire de contrôle, afin de pouvoir surveiller régulièrement l'absence de contaminants (bactéries, autres micro-algues, protozoaires, larves d'insectes etc.).

2.2.5. Récolte.

Une fois la culture prête pour la récolte, on doit pouvoir prélever au moins 25 % de la culture par jour. D'autre part, l'expérience prouve qu'il est préférable de pratiquer la récolte le matin de bonne heure, car la teneur de la spiruline en protéines y est généralement plus élevée que le soir [16 ; 19].

La récolte étant une opération un peu délicate, il est conseillé de suivre un protocole assez rigoureux, divisible en quatre étapes successives :

2.2.5.1. Filtration.

Afin de récolter une spiruline aussi pure que possible, il est conseillé de la faire passer à travers une toile de 150µm avant celle de 30 ou 60µm de manière à recueillir les débris sur la première et la spiruline sur la deuxième toile et à laisser passer le filtrat qui

pourra être réutilisé dans le bassin de production. Après un temps variable selon l'importance de la récolte et la concentration de la spiruline dans le milieu (entre 30 minutes et une bonne heure), la pâte verte de spiruline qui s'est accumulée sur le filtre peut être récupérée. En cas de production à grande échelle, un tapis vibrant peut être mis après avoir éliminer les débris [16].

2.2.5.2. Lavage et essorage

Lorsque la culture est sale, malodorante ou trop salée, J.P Jourdan conseille de laver la biomasse avec de l'eau douce potable avant le pressage et le séchage [19]. De son côté, J. Falquet pense que le lavage de la spiruline après la récolte et avant le pressage est à éviter. L'essorage est réalisé par pression. Dès l'apparition du liquide vert passant à travers la toile de pressage, il est conseillé de stopper cette opération. Dans tous les cas le temps de pressage ne doit pas excéder 30 à 35 minutes, afin de réduire le risque de fermentation. La biomasse ainsi pressée contient environ 20 % de matière sèche [19].

2.2.6. Séchage.

Le séchage est le seul moyen sûr de conserver et de distribuer la spiruline sans chaîne de froid. Lorsque la spiruline pressée ne peut être séchée de suite, il faut la conserver dans un récipient fermé, au réfrigérateur bien froid et pas trop longtemps. La spiruline est séchée au soleil, ou mieux, dans un courant d'air à faible humidité relative et forte capacité d'absorption d'eau (séchoir solaire indirect, ou électrique,...), jusqu'à ce qu'elle ne soit plus molle du tout. Elle se détache alors facilement du support plastique et se broie aisément. La plupart des cultivateurs commerciaux de spiruline, utilisent le séchage par atomisation. En outre, le séchage au tambour est pratiqué. La lyophilisation demeure la meilleure méthode de séchage [16].

2.2.7. Conditionnement et conservation.

Durant la mauvaise saison, une "souche" de spiruline doit impérativement être conservée dans son milieu de culture. Les contenants devront laisser passer la lumière et être stockés dans un lieu clair mais à l'ombre, à 4°C.

En ce qui concerne la biomasse non lavée et pressée jusqu'à une teneur en matière sèche comprise entre 20 et 30 %, la durée de conservation ne dépasse pas quelques heures à température ambiante. Réfrigérée à 4°C, cette biomasse peut-être conservée deux à trois jours. La congélation de la biomasse de spiruline est possible mais elle doit s'effectuer aussi rapidement que possible sinon, y'aura risque d'endommager ses filaments [19].

Au final, sur le plan de la qualité nutritionnelle du produit sec, quatre paramètres sont à prendre en compte :

- Le type de séchage (gardant les filaments intacts ou brisant les filaments) ;
- Le taux d'humidité résiduel ;
- La protection contre la lumière ;
- La protection contre l'oxygène ;

Par conséquent, seul un conditionnement opaque et sous vide peut garantir la conservation longue durée de la spiruline. Les sachets aluminisés multicouches thermoscellables sont donc fortement recommandés.

Une spiruline de bonne qualité, emballée sous vide dans ces sachets, et conservée à une température inférieure à 30°C se conserve pendant cinq ans [118].

Par ailleurs, la taille des sachets a aussi son importance. En effet, des sachets de 25, 35 ou 50 grammes permettent de garantir la qualité de la spiruline [39].

CHAPITRE 3

LA SPIRULINE : UN ALICAMENT PAR EXCELLENCE

C'est en 1940 que DANGEARD mentionne pour la première fois l'utilisation des spirulines dans l'alimentation humaine [119]. En 2006, l'agence spatiale européenne compte utiliser la spiruline dans ses longues missions sur la Lune: *"Se cultivant facilement, la spiruline est directement comestible et pourra être produite sur la Lune ou Mars. C'est sur elle que reposera en partie la survie de l'équipage* » explique Christophe Lasseur, chef du projet spatial Melissa [120].

3.1. Législation.

La spiruline répond à la législation sur les compléments alimentaires. Un décret a permis de fournir un cadre juridique complet pour les compléments alimentaires en transposant dans le droit national la majeure partie de la directive européenne n° 2002/46/CE. Ce nouveau décret n° 2006/352 du 20 mars 2006, publié au Journal Officiel du 25 mars 2006, reprend la définition européenne des compléments alimentaires : *« On entend par compléments alimentaires, les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité* » [31].

L'étiquetage de ces produits doit comprendre la dénomination de vente de « complément alimentaire », ainsi que d'autres informations comme le mode d'emploi détaillé, la dose journalière recommandée, la liste de toutes les substances utilisées lors de

la fabrication, les précautions d'emploi. Dans plusieurs états africains, une autorisation de mise sur le marché (AMM) est prévue pour la distribution de la spiruline [31].

3.2. Qualité nutritionnelle.

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

3.2.1. Protéines et acides aminés.

La teneur en protéines de la spiruline est élevée. Elle représente 10 à 11% de la masse humide ; en terme de poids sec, cette teneur oscille entre 50 et 70% [16 ; 121]. La spiruline est très riche en matières azotées et en contient deux fois plus que le soja, trois fois plus que la viande ou le poisson [122].

Cette richesse est cependant à relativiser compte tenu de la faible quantité de Spiruline utilisée en complément alimentaire (<10g par jour) [27]. Lors d'une étude de la consommation traditionnelle de spiruline au Tchad, il a été estimé que les protéines provenant de la spiruline ne couvraient que 5 à 8% de l'apport protéique requis pour un homme adulte [123].

Sur le plan qualitatif, les protéines de la spiruline contiennent des acides aminés qui représentent 47% du poids total des protéines [124].

Tableau 3.1 : Pourcentage moyen des acides aminés de *Spirulina platensis* selon différents auteurs [16 ; 121, 125] et de *Spirulina mexicana* [126].

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

Les plus fortes teneurs sont celles de la leucine, la valine, et l'isoleucine. Les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) ainsi que d'autres non-soufrés (tryptophane, lysine et histidine), essentiels chez l'enfant, sont peu abondants [124 ; 127-129] (Tableau 3.1). Ce spectre d'acides aminés montre que la valeur biologique des protéines de la spiruline est très haute, et que l'optimum pourrait être atteint par complémentation avec une bonne source d'acides aminés soufrés [11]. A noter que les protéines majeures de la spiruline sont les phycocyanines [130].

La valeur de l'utilisation protéique nette ou NPU (qui détermine la digestibilité), c'est-à-dire la proportion d'azote protéique absorbée lorsque la source de protéines étudiée est le seul facteur nutritionnel limitant [131]. La spiruline ne contient pas de parois cellulosiques mais une enveloppe de muréine relativement fragile [124 ; 127 ; 132 ; 133] ce qui explique sa très bonne digestibilité 75 à 92% (caséine pure 95.1%) [134-136]. Ainsi la spiruline ne nécessite ni cuisson ni traitements spéciaux destinés à rendre ses protéines accessibles [130]. La valeur NPU de la spiruline est estimée entre 53 et 61% soit 85 à 92% de celle de la caséine [135 ; 137 ; 138].

L'assimilation des protéines est mesurée par l'Efficacité Protéique (PER). Il s'agit du gain de poids de l'animal ou de l'individu, divisé par le poids de protéines ingérées. Les protéines de référence sont la lactalbumine ou la caséine [139]. La valeur du PER pour la spiruline déterminée chez des rats en croissance est estimée entre 1,8 et 2,6 [132 ; 133 ; 135 ; 139-143].

Chez l'homme, bien que rares, les études effectuées tendent à montrer des résultats similaires à ceux obtenus sur les animaux, quoique la digestibilité semble un peu plus faible [139 ; 132 ; 135].

3.2.2. Composition en lipides.

Les lipides représentent généralement 5,6 à 8% du poids sec de la Spiruline [116 ; 1124; 127 ; 136] mais ce pourcentage peut atteindre 13% [137-139]. La composition en lipides totaux se subdivise en deux fractions : une fraction saponifiable (83%) et une fraction insaponifiable (17%) [19 ; 132 ; 135].

3.2.2.1. Les acides gras.

La fraction saponifiable, représente 4,9 à 5,7% de la matière sèche de la Spiruline [16] ; Elle est essentiellement composée de monogalactosyl diglycérade et de digalactosyl diglycérade (23%), de sulfoquinovosyl diglycérade (5%) et de phosphatidyl glycérol (25,9%). Les triglycérides ne sont présents qu'à de très faibles taux (0,3%). La phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine et le phosphatidyl inositol ne sont pas

présents en quantité appréciable. Il est à noter que 4,6% de phospholipides sont encore indéfinis [23 ; 147].

La composition des principaux acides gras de 3 espèces de Spiruline (Tableau 3.2) révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels (qui incluent les oméga-3 et des oméga-6).

Tableau 3.2 : Composition typique en pourcentage des principaux acides gras de trois espèces de Spiruline [148].

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

L'acide gamma-linolénique (GLA) constitue 10 à 20% des acides gras (soit 1-2% du poids sec) chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *S. platensis*, (soit 4% du poids sec). La Spiruline figurerait parmi les meilleures sources connues d'acide gamma-linolénique, avec le lait humain, et quelques huiles végétales peu connues (huile d'onagre, de bourrache, de pépin de cassis et de chanvre) [137, 149]. La présence de cet acide gras [150] est à souligner du fait de sa rareté dans les aliments courants. Il peut néanmoins être directement assimilé avec profit en cas de trouble ou d'insuffisance de sa synthèse endogène [151] et c'est un précurseur de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires [130].

L'absence d'acide alpha-linolénique a été bien établie [152]. Ce dernier acide gras peut même être considéré comme un facteur de discrimination entre le genre *Arthrospira* (qui n'en contient pas) et le genre *Spirulina*, qui en contient toujours [153].

A noter aussi l'absence d'acides gras au nombre de carbone impair [75] et une très faible teneur en acides gras à chaînes ramifiées [124], deux types de lipides non métabolisables par les animaux supérieurs.

Les sulfolipides tels les sulfoquinovosyl-diglycérides (5% de la fraction saponifiable), intéressent les chercheurs pour leur activité thérapeutique [154] depuis qu'une activité protectrice contre l'infection des cellules helper-T par le VIH leur a été attribuée [155]. Le composant lipide sulfoquinovosyl-diacyl-glycerol (SQDG), de *Spirulina platensis* riche en sulfolipides, a démontré par expérience *in vitro* sa capacité à inhiber la transcriptase inverse¹ du hiv-1 et du hiv-2 alors que ce dernier est naturellement résistant à cette classe de molécules [156]. Enfin, la spiruline a été recommandée comme supplément alimentaire en cas de carence en acides gras essentiels [145].

3.2.2.2. La fraction insaponifiable.

La fraction insaponifiable est composée essentiellement de stérols, de terpènes, d'hydrocarbures saturés (paraffines) et de pigments. Cette fraction représente 1,1% à 1,3% de la matière sèche de la Spiruline [16].

Bien que certaines études [124] révèlent l'absence de stérols, il semblerait que ces derniers représentent néanmoins 1,5% de la fraction lipidique non polaire de la Spiruline [130]. D'après Clément, 1975 [23], Santillan, 1974 [135] et Hudson & Karis, 1974 [145], les taux de stérols libres ne dépassent pas 0,015% du poids sec de la Spiruline. Ces stéroïdes sont principalement le colionastérol, l'avenasterol et en plus faible quantité, le cholestérol [157]. On trouverait aussi du betasitosterol [158 ; 159]. Certains de ces stérols pourraient partiellement expliquer l'activité antimicrobienne de la Spiruline [23].

Les terpènes représentent de 5 à 10% de la fraction insaponifiable [121]. Chez *Spirulina platensis*, ils sont essentiellement représentés par l'alpha et le beta-amyrine : un triterpène pentacyclique [23].

Les hydrocarbures saturés à longues chaînes (paraffine) constituent 25% de l'insaponifiable chez *Spirulina platensis* et *Spirulina maxima* [124], soit 0,1 à 0,3% de la matière sèche [160]. Les deux tiers sont constitués de n-heptadécane ; le tiers restant

comprend dans l'ordre, les hydrocarbures linéaires saturés en C15, C16, C18 ainsi que trois hydrocarbures saturés à chaînes ramifiées, non identifiés [160]. La métabolisation de ces produits, et plus particulièrement de l'heptadécane, peut être toxique [130].

3.2.3. Les glucides.

Les glucides représentent 13,6 à 25% de la matière sèche des Spirulines [130 ; 148 ; 161]. La paroi des Spirulines comme les bactéries Gram-négatives, est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides. L'essentiel des glucides assimilables est constitué de polymères tels que des glucosannes aminés (1.9% du poids sec) et des rhamnosannes aminés (9.7%) ou encore de glycogène (0.5%) [130].

Les glucides simples ne sont présents qu'à l'état de traces : ce sont le glucose, le fructose et le saccharose; on trouve aussi des polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol [130].

Présents sous forme phosphorylée, les cyclitols correspondent à 2-3 % de la matière sèche de la Spiruline. Ils se composent essentiellement de méso-inositol phosphate (la seule substance glucidique intéressante par sa quantité chez la spiruline) qui constitue une excellente source de phosphore organique ainsi que d'inositol (350-850 mg/kg mat. sèche) [132 ; 162]. Il faut toutefois remarquer qu'une teneur si élevée en cyclitols phosphates pourrait avoir à la longue un effet décalcifiant, si l'apport en calcium se trouvait insuffisant. Dans le cas de la spiruline, ce danger est écarté par sa richesse en calcium [132 ; 144].

Un polysaccharide spécifique de la spiruline, le spirulan, a été isolé et partiellement caractérisé [163 ; 164]. Porteur de nombreux résidus sulfatés et se composent de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, d'acide glucuronique et galacturonique, ainsi que d'ions calcium et sodium., il est fortement polyanionique. Cette substance semble prometteuse comme anti-virale, anticoagulantes et immunostimulantes [165-167].

Le Polyhydroxybutyrates (PHB) est un polymère de réserve. Non-métabolisable par l'homme, il ne semble présenter aucune toxicité. Certaines publications font état de teneurs

en PHB voisines de 6% du poids sec de la spiruline [168], des fois, pas plus de 0.3% de PHB [169].

Un nouveau polysaccharide d'un poids moléculaire élevé a été isolé chez *Spirulina platensis*. Cet activateur potentiel des monocytes et macrophages humains [170 ; 171] a été nommé « *Immulina* ». Ce polysaccharide, structurellement complexe et fortement hydrosoluble, représente entre 0,5% et 2% du poids sec de cette cyanophycée [130].

3.2.4. Les acides nucléiques.

La Spiruline renferme 4,2 à 6% d'acides nucléiques totaux (30% ADN et 70% ARN) dans sa matière sèche [127 ; 135]. La richesse en acides nucléiques d'un aliment peut induire à terme une production importante d'acide urique par dégradation biochimique des purines. L'ARN en produit deux fois plus que l'ADN. L'excès de cet acide peut entraîner à la longue des calculs rénaux et des crises de gouttes. Il est admis que la dose maximale d'acides nucléiques tolérables à long terme est de 4g/j pour un adulte [172]. Il faudrait consommer 80 g de Spiruline sèche pour atteindre cette dose (la quantité de Spiruline usuellement consommée ne dépasse pas 10 g de matière sèche) ; On peut donc raisonnablement penser que la teneur en acides nucléiques de la spiruline ne pose pas de problèmes, même à long terme et pour des doses élevées [130, 173].

3.2.5. Les vitamines.

La Spiruline contient une large gamme de vitamines (Tableaux 3.3 et 3.4). Les valeurs du tableau sont variables car elles concernent différentes productions avec des procédés de conservation variés. En effet, les vitamines sont sensibles à la chaleur. D'après une étude [124], les teneurs en vitamines du Tableau 3.3 et 3.4 seraient diminuées d'environ un tiers dans le cas de séchage sur des tambours chauffants. La granulométrie du produit final intervient également dans la préservation immédiate et la conservation à long terme des vitamines notamment pour le β -carotène [174]. Une granulométrie plus élevée permettrait une meilleure conservation. Le séchage par pulvérisation étant déconseillé.

3.2.5.1. Les vitamines liposolubles.

Tableau 3.3 : Teneur en vitamines liposolubles en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de Spiruline [130].

| Vitamine | Teneur ($\mu\text{g/g}$) |
|----------------------------|--|
| Provitamine A (B-carotène) | 700-1700 |
| Vitamine E | 50-190 |
| Cryptoxanthine | 100 |

3.2.5.1.1. Le Bêta- carotène.

Parmi les vitamines liposolubles, on note une teneur très élevée en β -carotène. Il représente 40 à 80% des caroténoïdes de la spiruline, le reste étant composé principalement (par ordre décroissant) de xanthophylle, de cryptoxanthine, d'échinénone, de zéaxanthine et de lutéine [175 ; 176]. On trouve entre 700 et 2000 mg de β -carotène et environ 100 à 600 mg de cryptoxanthine par kilo de spiruline sèche [177], ces deux caroténoïdes sont convertibles en vitamine A par les mammifères qui ne synthétisent pas cette vitamine [130, 178]. Les besoins en vitamine A sont estimés chez l'adulte à moins d'un (01) mg par jour [179]; d'autre part, la conversion du β -carotène en vitamine A se fait chez l'humain à 17 à 20% (en partie selon la dose de β -carotène absorbée) [180]. Quelques grammes de spiruline suffisent donc à couvrir entièrement les besoins en vitamine A d'un adulte. D'autre part, l'absence de rétinol exclut un éventuel risque de surdosage, le β -carotène n'étant pas toxique par accumulation au contraire de la vitamine A.

La biodisponibilité des caroténoïdes de la spiruline a été démontrée aussi bien chez le rat que chez le poulet [181-183]. Cette biodisponibilité a aussi été démontrée chez l'homme [184]. Des études cliniques ont également prouvé l'excellente utilisation des caroténoïdes de la spiruline chez l'humain [185]. De 80% à 10%, La déficience chronique en vitamine A chez 5000 enfants était de 80% à 10% (dose quotidienne unique de spiruline : 1g, pendant 5 mois [186].

La vitamine A est impliquée dans la croissance des os et la synthèse des pigments de l'œil. Divers travaux sur la supplémentation en vitamine A avaient suggéré une relation entre la carence en cette vitamine et le risque de transmission materno-fœtale du virus HIV [187]. Bien que ce sujet reste controversé [188]. Une étude récente de Wang et *al.* En 2008 [189] portant sur des chinois adultes montre que l'ingestion de 4.5 mg de β -carotène provenant de la spiruline apporte 1mg de vitamine A.

3.2.5.1.2. Vitamine E (tocophérols).

On note dans la spiruline des teneurs en vitamine E de la Spiruline variant de 13 [190] à 120 mg/Kg [191] voire même 190 mg/Kg [132 ; 144]. Ces différences sont liées aux méthodes de dosage, aux conditions de culture, mais surtout de séchage de la spiruline. Il est très probable que le séchage par « *spray-drying* » qui brise très fortement les filaments de spiruline réduise considérablement la durée de conservation des vitamines sensibles à l'oxydation, dont la vitamine E [130].

Les besoins quotidiens en vitamine E seraient de 15 U.I. ; Les besoins journaliers d'un enfant de 6 mois à 3 ans sont de 5.10^3 à 6.10^3 μ g ; si la biodisponibilité était de 100%, une dose de 10 g de spiruline couvrirait de 2 à 22 % de ces besoins soit 12 mg de tocophérols libres [192]. Les propriétés anti-oxydantes du tocophérol pour les acides gras insaturés pourraient expliquer la bonne conservation de ces derniers dans la spiruline séchée.

3.2.5.2. Vitamines hydrosolubles.

La teneur en vitamines hydrosoluble de la spiruline, est représentée dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Teneur en vitamines hydrosolubles en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de Spiruline [130].

| Vitamine | Teneur |
|----------------------|---------------|
| B1 (thiamine) | 34 - 50 |
| B2 (riboflavine) | 30 – 46 |
| B3 (niacine) | 130 |
| B5 (pantothénate) | 4,6 -25 |
| B6 (pyridoxine) | 5 – 8 |
| B8 (biotine) | 0,05 |
| B9 (folate) | 0,5 |
| B12 (cobalamine) | 0,10 – 0,34* |
| C (acide ascorbique) | Traces |

* Hors pseudo vitamine B12.

3.2.5.2.1. Vitamine B12.

Parmi les vitamines hydrosolubles, on note la présence de vitamines du groupe B. Il faut souligner la teneur exceptionnelle en vitamine B12 (cobalamine) qui est de loin la vitamine la plus difficile à obtenir dans un régime sans viande car aucun végétal courant n'en contient. La spiruline en serait quatre fois plus riche que le foie cru, longtemps donné comme meilleure source. A propos de la biodisponibilité réelle du complexe B12 de la spiruline chez l'homme. Certains travaux nieraient la présence de vitamine B12 "active" dans la spiruline [193]; d'autres révèlent de hautes teneurs en B12 "active" dans certaines souches de spiruline [194]. Selon Messina et *al.*, 1996 [195] et Donaldson, 2000 [196], la spiruline, comme les autres algues alimentaires, peut contenir des analogues de la vitamine B12 ; mais ne peut être considérés comme une source fiable de vitamine B12 active [97 ; 98]. Une étude de la composition d'une souche de spiruline (NIES-39) en corrinoïde montre que le corrinoïde prédominant (83%) est une pseudo-B12, la 7-adeninyl cyanocobamide, mais que la véritable vitamine B12 représente tout de même 17% des corrinoïdes totaux [199 ; 200]. Le composé prédominant ne semble pas avoir d'activité B12 chez l'homme, mais il n'interfère pas dans le métabolisme normal de la vitamine B12 [199].

Une note technique de la firme « Cyanotech » mentionne une teneur totale en corrinoïdes de 7 micro-gramme par gramme de spiruline et une fraction de 36% représentant la vitamine B12 assimilable par l'homme [201]. Ces valeurs indiquent qu'un gramme de cette spiruline couvrirait plus de 80% des apports quotidiens en B12 pour un adulte. Quoiqu'il en soit de la spiruline, il est maintenant établi que bien d'autres sources alimentaires de vitamine B12, voire même les préparations multivitaminées synthétiques contiennent elles-aussi de fortes proportions d'analogues non-métabolisables par l'homme [202-205].

La vitamine C n'existe qu'à l'état de trace dans la Spiruline [130].

3.2.5.2.2. Bioptérine.

La spiruline contient une grande quantité de bioptérine (plus précisément l'alpha-glucoside de la bioptérine), qui semble jouer un rôle fondamental dans la protection de l'appareil photosynthétique contre les rayons UV [205]. Cette substance fortement fluorescente peut, chez l'homme, être convertie en un co-facteur enzymatique d'une très grande importance, la tétrahydrobioptérine. On ne peut considérer cette substance comme une vitamine, car elle peut être entièrement synthétisée chez l'humain; il existe toutefois des situations pathologiques [206] liées à un manque de synthèse, situation qui peuvent être améliorée par un apport externe de tétrahydrobioptérine. L'efficacité de la bioptérine elle-même, par voie orale, n'est pas connue à ce jour [130].

3.2.6. Minéraux et oligo-éléments.

La composition en minéraux de la Spiruline apparaît dans le Tableau 3.5. On observe une grande variabilité dans les teneurs. Elle s'explique par le fait qu'elles concernent les spirulines en milieu naturel et celles cultivées. En outre, il est possible d'augmenter les teneurs en minéraux des organismes cultivés [130].

Tableau 3.5 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en $\mu\text{g/g}$ de sa matière sèche [130].

| Minéraux | Teneur de la spiruline sèche (mg/kg) | Doses requises* (mg/jour) |
|-----------------|---|--------------------------------------|
| Calcium | 1300-14000 | 1200 |
| Phosphore | 6700-9000 | 1000 |
| Magnésium | 2000-4000 | 250-350 |
| Fer | 600-6000** | 18 |
| Zinc | 21-6000** | 15 |
| Cuivre | 8-2000** | 1,5-3 |
| Chrome | 2,8 | 0,5-2 |
| Manganèse | 25-37 | 5 |
| Sodium | 4500 | 500 |
| Potassium | 6400-15400 | 3500 |
| Sélénium | 0,01-50** | 0,05 |

*Pour l'adulte [207].

**Valeurs obtenues par enrichissement spécifiques.

Les minéraux spécialement intéressants chez la spiruline sont le fer, le zinc, le magnésium, le calcium, le phosphore et le potassium.

3.2.6.1. Fer.

Les Spirulines naturelles ont rarement des teneurs en fer dépassant 500 mg/kg bien que des valeurs supérieures à 1000 mg/kg aient été trouvées [208]. La Spiruline de culture peut être enrichie en Fer et les teneurs obtenues peuvent être alors plus de 10 fois supérieures à celles présentées dans le tableau 3.5.

Le fer est essentiel à l'organisme humain car il intervient dans la constitution de l'hémoglobine, de la myoglobine et d'enzymes jouant un rôle capital dans de nombreuses réactions métaboliques. Johnson et Shubert (1986) [209] et Kapoor (1993) [210], ont étudié la biodisponibilité du fer de la Spiruline chez le rat et Puyfoulhoux et al. (2001)

[211], sur des cellules Caco-2. Cependant la biodisponibilité (absorption + utilisation) ne peut-être mesurée chez l'Homme que par des études *in vivo* avec des isotopes stables.

3.2.6.2. Zinc.

Le Zinc est considéré comme un micronutriment majeur dans la lutte contre la malnutrition [212]. Des carences en zinc sont fréquemment associées à des diarrhées, à l'anorexie, à des problèmes cutanés, ou à l'infection au VIH [213].

La Spiruline cultivée ne contient généralement que des traces de Zinc (21-40 µg/g). Ces teneurs sont insuffisantes pour que la Spiruline soit considérée comme une bonne source en Zinc. Cependant la Spiruline peut être enrichie [214]. Une Spiruline de Biorigin l'Azina titrerait 6000 µg Zn/g [215 ; 130].

3.2.6.3. Magnésium.

Le Mg est un élément important pour la santé et une carence est fréquente chez les enfants malnutris [216]. La Spiruline est naturellement riche en Mg. Planes et al. (2002) ont montré par des études sur des cellules intestinales Caco-2 qu'un enrichissement en Mg n'améliorait pas la disponibilité en magnésium [217].

3.2.6.4. Sélénium.

Le sélénium est un micro-élément essentiel a effet antioxydant. Il n'y a pratiquement pas de sélénium dans la Spiruline naturelle mais il est possible d'enrichir la Spiruline en sélénium par addition de sélénite de sodium au milieu de culture [218 ; 219]. Cases et al. (1999, 2001, 2002) ont montré la biodisponibilité par les rats du sélénium à partir de Spiruline fortifiée [220-222].

3.2.6.5. L'iode.

La carence en iode est la première cause de maladie mentale évitable [223], Il est possible d'obtenir des souches de Spiruline capables de fixer l'iode [224 ; 225] mais les sels d'iodes sont chers et la Spiruline ne semble pas concentrer activement cet élément qu'en présence de cobalt qui s'avère carcinogène [226].

3.2.7. Pigments.

La Spiruline contient des chlorophylles dont la chlorophylle *a*, des caroténoïdes dont le principal est le β -carotène et des phycobiliprotéines telles la phycocyanine et la phycoérythrine. Les teneurs en pigments de *Spirulina platensis* apparaissent dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de *Spirulina platensis* [120].

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

Les teneurs en phycocyanine et phycoérythrine varient selon la souche et les conditions de culture. En effet, les teneurs en phycobiliprotéines (qui captent l'énergie lumineuse vers les photosystèmes) sont régulées par l'intensité de l'éclairement. Le tableau 3.6 montre que la cyanobactérie *Spirulina platensis* est une excellente source de phycocyanine. D'après Vonshak (1997), la fraction protéique pourrait contenir jusqu'à 20 % de phycocyanine [227]. En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel. D'après l'étude de Fedkovic et *al.*, 1993, les antioxydants comme le β carotène contenus dans la spiruline permettraient d'inhiber à la fois l'effet mutagène et l'effet régulateur induit par les radicaux libres, préservant ainsi nos tissus [228]. Le β -carotène est d'autre part un précurseur de la vitamine A.

3.3. Valeur thérapeutique.

Dans les pays développés, et depuis peu dans quelques régions d'Afrique, la Spiruline est consommée comme complément alimentaire « bénéfique à la santé » [229]. Elle est vendue dans le secteur des produits dits « Bio ». La spiruline semble être un

complément thérapeutique idéal. Les propriétés thérapeutiques de la spiruline sont utilisées aux traitements de diverses pathologies en se basant sur la composition de cet organisme et les études sur les activités de ses composants.

La spiruline semble être un excellent antiviral [9 ; 155 ; 23-234], un anti herpes [235] et lutte contre le HIV-1 [9 ; 155 ; 236-238] elle est aussi un anti bactérien [239]. Elle baisse le taux de cholestérol et des lipides sanguins [240-250]. Son effet hypo-glycémiant a été prouvé [251-259] ainsi que son effet contre l'hypertension artérielle [250].

Cette portion magique stimule le système immunitaire [260-263]; elle aurait une activité anti-tumorale [7 ; 264] et peut induire un mécanisme d'apoptose des cellules cancéreuses [219] : elle prévient le cancer [6 ; 264-273]. Toute fois, elle exerce une activité anti-oxydante [5 ; 274-276]. Elle est douée d'activité anti-inflammatoire sur les articulations [2], d'un effet protecteur contre les radiations en stabilisant le DNA [6], d'un effet sur la flore intestinale [277]. Elle Prévient l'anémie : [209 ; 278-280], stimule l'érythropoïèse [281] et diminue la leucoplasie [282 ; 283].

La spiruline, possède une propriété de réduire les métaux lourds : arsénic [9; 284-286], cadmium [287] et mercure [288], et des substances néphro-toxiques de l'organisme [4 ; 258]. C'est un hépato-protecteur [5 ; 270 ; 289], lutte contre toxicité cardiaque [290 ; 291], empêche le développement de l'athérosclérose [292] et l'ischémie cérébrale [290 ; 291; 293] et les agents responsables de la pneumonie [294]. En outre, la spiruline joue un rôle dans réactivité vasculaire [295], elle est anti-plaquette [296], Anti cataracte [297]; Prévient la rhinite allergique [8 ; 298 ; 299] voire même le Parkinson [300]. L'efficacité de la spiruline pour perdre du poids [301] reste à prouver, en outre elle, elle permet une meilleur croissance de la musculature [302 ; 303].

3.3.1. Toxicité.

A l'issue des nombreuses études menées par des chercheurs spécialisés dans le domaine des cyanobactéries, il ressort que la spiruline (genre *Arthrospira*) n'est pas toxique, contrairement à la plupart des autres cyanobactéries [172 ; 304]. Elle ne possède pas les gènes qui assurent la synthèse des cyanotoxines [27].

A côté de ce genre de contamination, il faut également envisager celle par les micro-organismes et les métaux lourds (tableau 3.7). La forte capacité de la spiruline à fixer certains poly-cations (cadmium, plomb, chrome, cuivre) nécessite d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à la consommation humaine.

Tableau 3.7 : Normes imposées en France pour la contamination des spirulines alimentaires en bactéries et métaux lourds (Arrêté du 21/12/1979) [16].

| Type d'agent contaminant | Norme admise |
|--------------------------------------|---|
| Métaux lourds | Sur poids sec, en ppm (mg/Kg) |
| Arsenic | ≤ 3 |
| Plomb | ≤ 5 |
| Etain | ≤ 5 |
| Cadmium | ≤ 0,5 |
| Mercuré | ≤ 0,1 |
| Iode | ≤ 5000 |
| Bactéries | Sur produit frais ou sec (germe/g) |
| Germes aérobie (30°C) | ≤ 100 000 |
| Coliformes fécaux (44,5°C) | < 10 |
| Anaérobies sulfito-réducteurs (46°C) | < 100 |
| <i>Clostridium perfringes</i> | ≤ 1 |
| <i>Salmonella</i> | Absence dans 25 g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ≤ 100 |

3.3.2. Réactions allergiques.

Dans différentes publications, il est toujours souligné l'excellente tolérance de la spiruline au niveau métabolique. Il n'a jamais été signalé d'allergies [305], jusqu'à l'an 2010 où un travail de Pétrus et son équipe [306] signale la détection de la première manifestation allergique de la spiruline chez un enfant atopique de treize (13) ans, après six (6) heures de son ingestion, des troubles digestifs à type de diarrhée et érythème diffus. L'allergène responsable, la phycocyanine C, a été identifié [307].

3.4. Précautions d'emploi.

La dose courante de spiruline utilisée comme complément alimentaire (en dehors des états de malnutrition sévère) se situe aux alentours de 3 à 5 g par jour. En lien direct avec ses propriétés détoxifiantes, lorsque les dosages de départ sont trop élevés, des symptômes que des troubles gastro-intestinaux et/ou des céphalées peuvent survenir. Les sociétés commercialisant la spiruline conseillent donc de commencer par une dose de 1 g/j et d'augmenter progressivement par palier de 1 g tous les trois jours, jusqu'à la dose quotidienne souhaitée [44].

De plus, la spiruline pouvant exercer un effet stimulant chez certaines personnes, il est préférable de ne pas en prendre le soir. Par ailleurs, les personnes souffrant de phénylcétonurie doivent éviter la spiruline car, comme tous les aliments renfermant des protéines, elle contient de la phénylalanine. Aucune interaction médicamenteuse n'a été signalée jusqu'alors [44].

CHAPITRE 4

LA SPIRULINE FACE A LA TECHNOLOGIE.

De récentes recherches sur les photobioréacteurs ont montré la possibilité de faire pousser l'algue dans l'espace sous microgravité avec des fibres optiques [308], de quoi nourrir d'espoir l'astronautique moderne. Cette fraction magique peut être utilisée dans le traitement des effluents industriels et comme source d'énergie durable et de biocarburant [301 ; 309].

En outre, l'industrie utilise les spirulines pour l'alimentation animale et la fabrication d'aliments diététiques, destinés, par exemple, aux régimes hyperprotéiques, elle fait donc partie des innovations de la technologie agro-alimentaire. En agriculture ou biologie, le groupe des cyanobactéries produit une variété de métabolites secondaires dans leur milieu de culture [310]. Beaucoup de ces produits naturels ont des activités antibiotiques, algicide, antiviral, fongicide [311-313].

4.1. Spiruline à usage animal.

La spiruline est utilisée comme complément alimentaire pour les animaux [314 ; 315] pour plusieurs raisons.

4.1.1. Favoriser la croissance et la fertilité.

Des études sur les poissons d'aquarium tels le *Xiphophorus helleri* [316] et la crevette *Fenneropenaeus chinensis* [317] ont montré les effets bénéfiques de *Spirulina platensis*. Ainsi l'influence bénéfique sur la croissance, de l'incorporation de Spiruline dans la nourriture des poulets de chair a été étudiée par Razafindrajaona, 2008 [318].

4.1.2. Renforcer les défenses immunitaires.

En aquaculture, la spiruline est ajoutée aux granulés dans la nourriture des poissons d'élevage, plus souvent soumis à des infections virales et/ou bactériennes que les poissons sauvages. Watanuki et *al.*, 2006 [219], ont mis en évidence l'effet immunostimulant de *Spirulina platensis* chez la carpe *Cyprinus carpio*.

Chez les chiens et les chats, la spiruline permet d'améliorer l'état de la peau et des poils et d'éviter les carences en calcium [320 ; 321]. La dose dépend du poids de l'animal [322]. Elle prévient les infections respiratoires chez les lapins [323] ; surmonte la fatigue physique et les états de stress en période de mue chez les oiseaux, et favorise un plumage doux et plus solide [324].

4.1.3. Pour augmenter la pigmentation.

La spiruline est utilisée pour ses pigments :

- En aquariophilie pour accentuer la coloration des poissons d'ornement [316];
- En aquaculture pour améliorer la pigmentation des crevettes et des poissons [325];
- En agroalimentaire pour rendre les œufs et la chair de poulet plus attrayants au consommateur par les caroténoïdes qu'elle contient [122 ; 137 ; 326].

4.1.4. Pour améliorer les performances des animaux.

Elle est vendue comme additif à la nutrition des taureaux reproducteurs, Elle donne une robe plus brillante pour les chevaux et exerce une action énergisante [327].

4.2. Spiruline à usage humain.

La spiruline est utilisée dans le domaine cosmétologique ; c'est un aliment fonctionnel et un supplément alimentaire. En plus de ses effets thérapeutiques et nutritionnels notés dans le chapitre 3 telle la lutte contre la malnutrition, la dénutrition et les carences protéiques : le kwashiorkor, elle est spécialement intéressante en tant que source de fer hautement assimilable. Riches en molécules anti-oxydantes.

4.2.1. Industrie cosmétique.

En cosmétique, la spiruline est utilisée dans les masques cryogéniques et crèmes anti-âge, par son action sur le renouvellement cellulaire et la tonicité des tissus [328].

La phycocyanine extraite de la spiruline est aussi utilisée dans le domaine de la cosmétologie, elle rentre ainsi dans la composition de rouges à lèvres et de crayons pour souligner les yeux [329]. Ainsi, en utilisant de la spiruline en complément d'une alimentation équilibrée, la peau devient plus nette et fraîche, les cheveux retrouvent vigueur et brillance, tandis que les ongles fortifiés cassent moins facilement [330].

De façon un peu plus détaillée, sa teneur en vitamine A permet un bronzage plus rapide et plus uniforme au soleil. Sa teneur en vitamine B5 permet à la peau de conserver son hydratation et sa souplesse ; elle aide aussi à renforcer les cheveux contre les agressions chimiques et mécaniques. La vitamine B8, en diminuant l'excrétion de sébum, réduit la principale cause de chute des cheveux [330].

Par ailleurs, la spiruline renferme une teneur élevée en acide qui exerce une action thérapeutique importante sur le derme : atténuation de certains phénomènes inflammatoires (notamment après des brûlures) et amélioration de la qualité des cicatrises cutanées. Cet acide étant très rare dans la nature (onagre, bourrache, cassis), son extraction à partir de la spiruline pourrait constituer une offre intéressante pour l'industrie cosmétique.

4.2.2. Industrie agro-alimentaire.

4.2.2.1. Adjuvant de régimes amaigrissants.

La spiruline, grâce à son apport naturel et équilibré en vitamines, minéraux et oligo-éléments, peut donc être considérée comme une véritable alliée pour les personnes qui veulent entamer un régime. De plus, par son effet détoxifiant, elle aide à éliminer les toxines [331].

Après quelques jours d'utilisation, l'effet énergisant de la spiruline fait que la personne, non seulement ne se sent pas fatiguée (puisqu'elle n'est pas carencée), mais en plus elle se sent plus dynamique qu'avant le début de son régime. Cette constatation émane de nombreux témoignages de femmes (et d'hommes aussi) qui l'ont testée [331]. Par ailleurs, la prise de 5 à 10 g de spiruline 20 à 30 minutes avant les repas, entraîne un sentiment de satiété lequel facilite le suivi d'un régime hypocalorique.

Ce phénomène est lié à sa teneur en phénylalanine (2,8 g pour 100 g de matière sèche) : cet acide aminé est métabolisé dans l'intestin en phényléthylamine, laquelle déclenche la sécrétion d'une hormone (la cholécystokinine) qui donne au cerveau un signal de satiété ; c'est en quelque sorte un coupe-faim naturel et sans danger [332].

4.2.2.2. Colorant alimentaire.

Trois pigments peuvent être extraits, mais actuellement c'est la phycocyanine qui est la plus utilisée dans cette indication ; les deux autres pigments sont plutôt utilisés dans le domaine pharmaceutique.

- La phycocyanine.

C'est un pigment retrouvé exclusivement chez les cyanobactéries, la spiruline étant celle qui en renferme le plus (10 à 15 %). Cette substance hydrosoluble donne une couleur bleue lorsqu'on la mélange à de l'eau. Le bleu est une couleur primaire recherchée car très rare dans la nature. On l'utilise aussi pour obtenir, en le mélangeant à d'autres couleurs, des tons différents. Au Japon, divers aliments renfermant de la phycocyanine extraite de spirulines chewing-gums, sorbets, sucettes glacées, bonbons, boissons sans alcool, gelées et produits laitiers. L'extraction de la phycocyanine à partir de la spiruline se fait après culture en photobioréacteurs. En Europe, la phycocyanine représente le seul colorant bleu naturel autorisé dans l'industrie alimentaire. [329].

- La chlorophylle.

C'est un pigment vert abondant dans le monde végétal La spiruline, avec sa teneur de 1 % en chlorophylle-a, présente un meilleur rendement (0,2% pour les autres végétaux). Néanmoins, elle reste encore peu utilisée [329].

- Les caroténoïdes.

Ce sont des pigments orangés qui sont actuellement extraits à partir de certains végétaux (carotte, potiron, courge) [329].

On note l'enrichissement de plusieurs aliments par la spiruline : pain à la spiruline, couscous, gâteaux, crèmes, yaourts, ..., tous enrichis en spiruline se trouvent actuellement sur le marché, en Europe et Asie. La spiruline semble aussi avoir un effet stimulant sur la croissance de la flore lactique.

Dans notre travail, on essayera de toucher à cet effet en l'appliquant dans le domaine de l'industrie laitière : en fromagerie.

4.3. L'aliment fromage en bref.

La fabrication du fromage est apparue il y a 8000 ans, peu après la domestication des animaux. A l'origine, l'intérêt majeur de la transformation du lait en fromage était de conserver les principaux constituants du lait. Aujourd'hui, il s'agit plutôt d'un aliment, possédant des qualités nutritionnelles indéniables. Plus de mille variétés de fromages sont actuellement recensées à travers le monde [333 ; 334]. Selon leur procédé de fabrication, on les regroupe en 8 grandes familles : pâte fraîche, pâte molle, pâte persillée, pâte pressée, pâte dure, pâte filée, les fromages de lactosérum et, enfin, les fromages salés conservés en saumure [435]. Les fromages à pâte molle, dont le fromage frais, sont définis dans la norme internationale *Codex Alimentarius* (Codex Stan A-6-1978, révisé 1-1999, amendé 2001) comme étant tous les fromages dont la teneur en eau après élimination des matières grasses est supérieure à 67% [436].

Quatre ingrédients principaux interviennent dans la fabrication du fromage : le lait, la présure, les micro-organismes et le sel [337]. Les principales étapes de fabrication des fromages à pattes molle sont la standardisation de matière première, la coagulation, l'égouttage et l'affinage [335].

Sur le plan nutritionnel, le fromage est un aliment noble grâce à ses protéines de haute valeur biologique et à sa richesse minérale. Une enquête réalisée aux Etats-Unis en 1994 a permis de déterminer la contribution du fromage à l'apport alimentaire global en éléments nutritionnels. Cette enquête a révélé qu'environ 8 % des protéines totales ingérées, 23 % du calcium et 5 % de la riboflavine sont fournis par le fromage [338].

CHAPITRE 5

MATERIEL ET METHODES

5.1. Matériel utilisé.

5.1.1. Matériel biologique.

5.1.1.1. Souche de spiruline.

La cyanobactérie, *Arthrospira sp*, dénommée *Arthrospira htam* et dont aucun travail ne confirme la classification, a été obtenue à partir de la ferme de culture artisanale de la spiruline du Dr. HIRI. Située au sud algérien : Tamanrasset. Algérie.

Il s'agit d'une souche isolée et purifiée en 1998, à partir de la guelta de Tin Aman à Tamanrasset, par le docteur HIRI A., en collaboration avec le Docteur FOX R. (USA), et JOURDAN J.P. (France).

5.1.1.2. Lait de vache.

Cru, collecté le jour même de la fabrication, non standardisé, provenant d'une ferme située à Soumâa, Blida.

5.1.1.3. Lait UHT.

Il s'agit de lait entier, stérilisé par ultra haute température, de la marque CANDIA.

5.1.1.4. Présure.

Produit de CHY-MAX Ultra, poudre à 100% de chymosin provenant d'une fermentation naturelle.

5.1.1.5. Ferments lactiques.

5.1.2. Matériel chimique.

5.1.2.1. Milieux de culture.

Quatre milieux de culture ont été utilisés. Le premier, de référence : milieu Zarrouk (tableau 5.1.) ; le second est un milieu établi par le Docteur HIRI : milieu HIRI ; les deux autres sont le milieu BG-11 et un nouveau milieu d'essai que nous avons-nous même proposé (ME).

Tableau 5.1. : Composition chimique, en gramme par litre d'eau, des différents milieux de culture utilisés pour la culture de la spiruline [16].

| Milieu de culture | Zarrouk | Hiri | BG-11 | ME |
|--|----------------|-------------|--------------|-----------|
| Composé | | | | |
| Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃) | 16,8 | / | / | / |
| Natron | / | 16 | / | / |
| Nitrates de sodium (NaNO ₃) | 2,5 | / | 1,5 | / |
| Urée | / | 1 | / | 0,5 |
| Chlorure de sodium (NaCl) | 1 | 1 | 1 | 13 |
| Phosphate d'Ammonium | / | 0,1 | / | 0,1 |
| Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄) | 1 | 0,5 | / | 0,5 |
| Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O) | 0,2 | 0,1 | 0,075 | 0,1 |
| Chlorure de calcium (CaCl ₂) | 0,04 | 0,1 | 0,036 | 0,1 |
| Sulfate de fer (FeSO ₄ , 7H ₂ O) | 0,01 | 0,01 | / | 0,01 |
| Phosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄) | 0,5 | / | 0,04 | / |

| | | | | |
|--|------|---|-------|-----|
| Acide éthylène diamino tétracétique (EDTA) | 0,08 | | 0,001 | / |
| Acide citrique | / | / | 0,006 | / |
| Citrate d'ammonium ferrique | / | / | 0,006 | / |
| Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) | / | / | 0,02 | 0,2 |
| Engrais NPK | / | / | / | 0,2 |
| Solution A5 | 1 ml | / | / | / |
| Solution B6 | 1 ml | / | / | / |
| Mélange d'oligo-éléments | / | / | 1 ml | / |

La composition des solutions A5 et B6 additionnées au milieu Zarrouk (tableau 5.2.) et celle du mélange d'oligo-éléments pour le milieu BG-11, est détaillée dans le tableau 5.3.

Tableau 5.2. : Composition des solutions A5 ; B6 pour le milieu Zarrouk [16].

| Solution A5 | |
|---|---------------------------|
| Produit chimique | Quantité g/l d'eau |
| H ₃ BO ₃ (Acide borique) | 2,86 |
| MnCl ₂ , 4H ₂ O (Chlorure de manganèse) | 1,81 |
| ZnSO ₄ , 7H ₂ O (Sulfate de zinc) | 0,222 |
| CuSO ₄ , 5H ₂ O (Sulfate de cuivre) | 0,079 |
| MoO ₃ (Oxyde de molybdène) | 0,015 |
| Solution B6 | |
| Produit chimique | Quantité g/l d'eau |
| NH ₄ VO ₃ (Vanadate d'ammonium) | 229 x 10 ⁻⁴ |
| K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ , 24 H ₂ O (Alun de chrome) | 960 x 10 ⁻⁴ |
| NiSO ₄ , 7H ₂ O (Sulfate de nickel) | 478 x 10 ⁻⁴ |
| NaWO ₄ , 2H ₂ O (Tungstate de sodium) | 179 x 10 ⁻⁴ |
| Ti ₂ (SO ₄) ₃ (Sulfate de titanium) | 400 x 10 ⁻⁴ |
| Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O (Nitrate de cobalt) | 44 x 10 ⁻⁴ |

Tableau 5.3. : Composition du mélange d'oligo-éléments additionné au milieu BG-AA
[16].

| Produit chimique | Quantité g/l d'eau |
|---|---------------------------|
| H ₃ BO ₃ (Acide borique) | 2,86 |
| MnCl ₂ , 4H ₂ O (Chlorure de manganèse) | 1,81 |
| ZnSO ₄ , 7H ₂ O (Sulfate de zinc) | 0,22 |
| CuSO ₄ , 5H ₂ O (Sulfate de cuivre) | 0,079 |
| Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O | 0.39 |
| Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O (Nitrate de cobalt) | 0.094 |

5.1.2.2. Réactifs et solvants.

Les différents produits chimiques utilisés (réactifs et solvants) proviennent de : Aldrich ; Cheminova ; Fluka ; Janssen ; Merck ; Organics ; Panreac ; Prolabo et Sigma.

5.2. Culture de la spiruline.

Pour initier la culture de notre spiruline, un stage pratique au niveau de la ferme du Dr. HIRI A. à Tamanrasset a été effectué (décembre 2009) et cela dans le but de mieux maîtriser sa culture en se référant au père de la spiruline algérienne : le docteur HIRI.

5.2.1. Lieu et bassins de culture.

La ferme, qui se situe au niveau de l'agence 4X4, à Aderrin (à 5Km de Tamanrasset ville), s'étend sur une superficie de 120 m² où sont installés 2 bassins en dur, couverts, de 4 m² chacun et 3 bassins en plastiques (montés par le fer) constituant des bassins de réserve (figure 5.1.). L'ensemble des bassins ont une capacité de production maximale de 20 kg de spiruline par an.

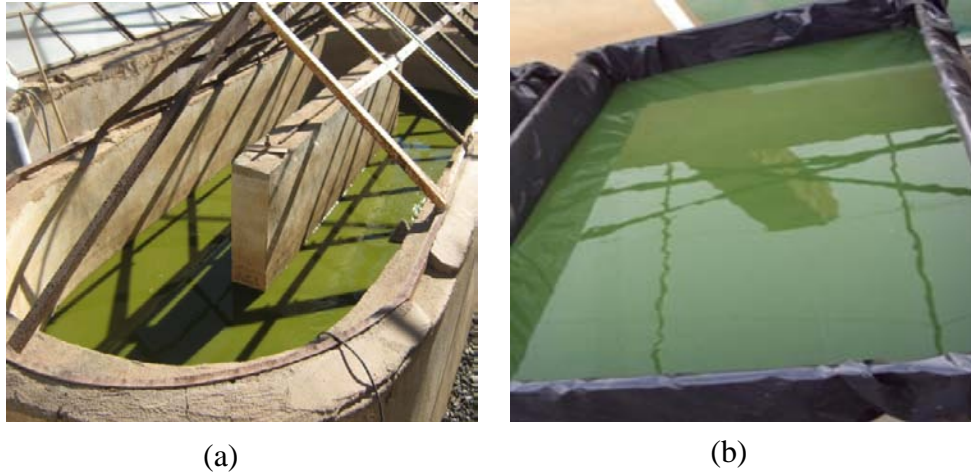


Figure 5.1. : Bassins de culture de la spiruline au niveau de la ferme du docteur HIRI : Tamanrasset. : a : Bassins en dur ; b : bassins en plastique (originale, 2009).

5.2.2. Conditions environnementales.

5.2.2.1. Milieu de culture.

Le milieu de culture utilisé, est le milieu HIRI (tableau 5.1.). En effet, en se basant sur le trona « natron », les dépenses seront minimisées.

Le trona est un complexe de carbonates et bicarbonates : $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{HNaCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
Le natron : $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ne se trouve dans la nature qu'en solution [339].

Le trona utilisé (figure 5.2.) a été ramené des massifs du Hoggar (EDLESS) par le docteur HIRI. L'eau utilisée est potable.



Figure 5.2. : Trona utilisé dans le milieu HIRI (originale, 2009).

5.2.2.2. Température.

A Tamanrasset, où le climat est assez rude, altitude 1400m et 1500m de la mer, la production hivernale est minime voire impossible pendant 5 mois de l'année en bassins ouverts : La température étant basse.

Lorsque la température est environ de 29°C dans les bassins nous avons une bonne production. D'après l'O.N.M. (2009) [340], La température moyenne du mois de décembre à Tamanrasset était de 19,2°C.

5.2.2.3. Lumière.

La lumière solaire est très indispensable pour la culture de la spiruline. Elle est considérée comme étant la principale matière première. Tamanrasset, est bien placées pour cultiver la spiruline (appendice D).

5.2.2.4. Précipitations.

Les pluies étaient rares et irrégulières à Tamanrasset, durant le mois de décembre 2009, une moyenne de 0,15 mm était enregistrée [340].

5.2.2.5. Agitation.

L'agitation des bassins est assurée par une pompe à air, fonctionnant pendant quinze (15) minutes par heure. A noter que les vents d'une moyenne de 2,5m/s en Décembre 2009, ne contribuent pas assez à un bon développement de notre cyanobactérie.

5.2.3. Récolte.

La récolte de la spiruline se fait dès que le disque de Secchi (Appendice E) ne s'observe à 2 voir 3 cm au-dessous de la culture de spiruline. Mais, avec l'expérience, à vue d'œil, on peut dire si c'est le bon moment de récolte ; en fonction de l'intensité de la couleur des cultures.

La spiruline est récoltée en la faisant passer à travers une écumoire, pour éliminer les débris et insectes dans le milieu ; puis à travers un filtre de 50 μ m et en fin un autre de 30 μ m (figure 5.3.).



Figure 5.3. : Récolte de la spiruline dans la ferme du Dr. HIRI
(originale, 2009).

5.2.4. Séchage.

Le séchage de la pate de spiruline se fait dès sa récolte dans un séchoir solaire, conçu par le docteur HIRI.

Donc, la spiruline se sèche dans un endroit ambré. Cela se fait par étalage de la pate en couches minces sur un tissu en nylon, qui sera mis à son tour sur un grillage constituant les étages du séchoir (figure 5.4.).



(a)



(b)

Figure 5.4. : Séchage de la *Spirulina htam* : (a) : pate de spiruline en couche mince ; (b) : séchoir solaire (originale, 2009).

5.3. Optimisation des conditions de culture.

5.3.1. Effet du milieu de culture sur la croissance.

Pour optimiser les conditions de cultures de la *Spirulina Htam*, nous avons procédé dans un premier temps à une comparaison de la croissance algale dans quatre milieux de culture différents : milieu Zarrouk, Hiri, BG-11 et un nouveau milieu que nous avons proposé (voir paragraphe 5.1.5.1.)

L'évolution de la biomasse spirulinaïenne a été observée pendant une durée de 21 jours et en effectuant des dénombrements un jour sur deux : soit 11 fois pendant la durée citée. Le comptage a été effectuée par la cellule de nageote après avoir initié la culture à échelle pilote dans des béchers, en commençant par une même concentration (40 000 cellules/ml) dans les différents milieux de culture.

En revanche, toutes les autres conditions opérationnelles de culture étaient les mêmes : température de 32°C assurée par une résistance, lumière artificielle de 2000 lux, agitation par pompe à air à environ 150 bulle d'air par minute, connectée par un tube en plastique : faible agitation en continu.

5.3.2. Optimisation des conditions opérationnelles de culture.

Vue les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet du milieu de culture sur la croissance de la spiruline, Les conditions opérationnelles de la culture (température, potentiel d'hydrogène et agitation), n'ont été optimisées qu'en cultivant la spiruline sur le milieu Hiri.

La lumière étant assurée par un néant : lumière de jour.

5.3.2.1. Evaluation de la croissance microbienne.

La croissance cellulaire de la spiruline dans les deux milieux et en variant les conditions ambiantes, a été estimée par méthode spectrophotométrique toutes les 72

heures. L'expérimentation est considérée terminée dès l'observation d'une diminution de la croissance microbienne.

A partir d'une culture de spiruline (du milieu Hiri), nous avons procédé à une récolte. Cinq (5) mg de la pâte ont été remis en suspension dans quatre (4) ml d'eau distillée : la suspension mère a été ainsi préparée.

De cette suspension, 2 ml ont été prélevés et dilués dans 2 ml d'eau distillée : c'est la première dilution.

Ainsi, nous avons procédé à la préparation de plusieurs dilutions (V/V).

Nous avons mesuré l'absorbance de chaque dilution à 560 nm, contre un blanc d'eau distillée et nous avons préparé notre courbe d'étalonnage (appendice F). La croissance de la spiruline, a été estimée en se référant à cette courbe.

5.3.2.2. Effet de la température sur la croissance.

En fixant les autres conditions opérationnelles de culture : pH = 9,8 ; agitation en continu par une pompe à air \approx 150 bulles/min ; et lumière artificielle : 2000 lux.

Nous avons choisi d'expérimenter quatre températures : 28, 32, 36 et 38°C. Ce choix s'est fait selon les données bibliographiques.

Les résultats, ont été représentés par des courbes de cinétique de la croissance algale.

5.3.2.3. Effet du pH sur la croissance.

Les conditions environnementales fixées pour ces essais ont été comme suit : température = 30°C ; agitation en continu par une pompe à air, et lumière artificielle 2000lux.

Quatre valeurs du pH ont été étudiées : 8, 9, 10 et 11.

5.3.2.4. Effet de l'agitation sur la croissance.

Nous avons optimisé deux type d'agitation : l'une par pompe à air, fonctionnant en continu à environ 150 bulles/ minute, et l'autre assurée manuellement, par retournement des béchers 2 à 3 fois toutes les 24 heures. La température a été fixée à 30°C ; le pH à 9.5 ; et la lumière toujours à 2000 lux.

La cinétique de croissance a été ainsi mesurée et reportée sur des courbes (taux de croissance par rapport au temps).

5.4. Caractérisation de l'*Arthrospira htam*.

5.4.1. Optimisation du séchage de la *S. htam*.

Nous avons procédé à des essais visant l'optimisation de la température de séchage de la spiruline, en se basant sur sa teneur en protéines. Outre de la poudre de spiruline issue par lyophilisation, trois autres échantillons, issus par séchage par entraînement (étuvage) à 40, 60 et 80°C, ont fait l'objet d'une quantification de leurs taux de protéines en se référant à la teneur en protéines de la masse fraîche de spiruline.

La lyophilisation a été réalisée à l'aide d'un lyophilisateur « Christ beta 1.8 » à une température de -45 à -50°C, sous une pression de 10⁻¹ bar et une humidité relative de 4 à 8% et cela pendant 48 h.

La pate de spiruline, étalée en une couche d'environ 1,5 mm d'épaisseur, sur du papier aluminium a été mises dans des étuves à différentes températures (40, 60 et 80°C) laissée pendant (plus de 72h, 48 et 36 heures respectivement : jusqu'à ce que la pate se sépare du papier sans se coller).

Les résultats, ont été exprimés en ratio de la concentration des protéines dans la spiruline séchée par rapport à leur teneur dans la masse fraîche de spiruline.

$$PR = \frac{C_p}{C_{pi}}$$

PR : Protéine ratio.

C_p : Concentration en protéines dans la spiruline séchée ;

C_{pi} : Concentration en protéines dans la masse sèche de la spiruline.

5.4.2. Caractérisation nutritionnelle.

Dans cette étude, la détermination de la valeur nutritionnelle de la spiruline a porté sur :

- L'analyse de la composition générale (Eau, protéines, lipides, cendres, glucides) ;
- Le dosage des pigments majeurs (caroténoïdes, C-phycoyanine et chlorophylle-a) ;
- Dosage des polyphénols ;
- Détermination de l'activité antioxydante de l'*Arthrospira htam*.

5.4.2.1. Analyse de la composition bromatologique générale.

5.4.2.1.1. Détermination de la teneur en humidité (NF V 04-282/ ISO 5534).

La détermination de la teneur en humidité s'est faite par étuvage à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à stabilité du poids. Les résultats exprimés en pourcentage du poids d'eau par rapport au poids initial, sont exprimés par l'équation suivante :

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

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

m_0 : masse, en grammes, de la capsule vide ;

m_1 : masse, en grammes, de la capsule et de la prise d'essai ;

m_2 : masse, en grammes, de la capsule et le résidu sec.

Il faut signaler que cette méthode ne mesure pas la teneur en eau proprement dite, le terme « humidité » que nous avons utilisé pose problème également. Le terme correct pour le résultat de cette méthode devrait être « perte de masse » ce qui ne correspond pas

seulement à de l'eau, mais à tous les composés volatils dans les conditions opérationnelles de séchage [341].

5.4.2.1.2. Détermination de la teneur en protéines.

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

Après un traitement à la vapeur de l'ammoniac, un titrage par de l'acide chlorhydrique 0,25N. Les résultats exprimés en pourcentage du poids de protéines par rapport au poids total de la prise d'essai, sont donnés par l'équation suivante :

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

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

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

V_1 : Volume, en millilitres, d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination ;

V_0 : Volume, en millilitres, de l'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination sur blanc ;

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

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

5.4.2.1.3. Détermination de la teneur en matière grasse.

L'extraction de la matière grasse s'est faite par entraînement avec l'hexane par procédé *Soxhlet* à partir de la poudre de spiruline additionnée d'acide chlorhydrique. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du poids de gras par rapport au poids initial, sont donnés par la formule suivante :

$$MG = \frac{B_P - B_V}{P} \times 100$$

MG : Taux de la matière grasse, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

B_P : Masse, en grammes, du ballon plein (après extraction) ;

B_V : Masse, en grammes, du ballon vide ;

P : Masse, en grammes, de la prise d'essai initiale.

5.4.2.1.4. Détermination du taux de cendres.

Le taux de cendres a été déterminé après incinération d'une prise d'essai dans un four à moufle réglé à 560°C selon la norme (NA 732). Les résultats, exprimés en pourcentage du poids de cendres par rapport au poids initial, ont été obtenus à partir de l'expression suivante :

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

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

m_0 : Masse, en grammes, du creuset vide ;

m_1 : Masse, en grammes, du creuset et de la prise d'essai ;

m_3 : Masse, en grammes, du creuset et son contenu (cendres) après incinération.

5.4.2.1.5. Détermination de la teneur en sucres solubles.

Nous avons utilisé une méthode colorimétrique. En effet, après une extraction des sucres par l'éthanol, et leur piégeage à l'aide de l'antrone, une lecture au spectrophotomètre a été effectuée à une longueur d'onde de 625 nm.

En rapportant les différentes densités optique sur la courbe d'étalonnage du glucose que nous avons établie (appendice G), nous avons déduit la concentration en sucres.

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

$$Q_S = C \times \frac{V}{v} \times \frac{1000}{P}$$

- Q_S : Teneur en sucres, en milligramme par gramme de spiruline ;
- C : Concentration de sucres dans le volume à doser (mg/ml) ;
- V : Volume, en millilitres, de l'extrait ;
- v : Volume, en millilitres, à doser ;
- P : Poids, en gramme, de la prise d'essai.

5.4.2.2. Quantification des pigments majeurs.

5.4.2.2.1. Analyse des caroténoïdes totaux.

La méthode utilisée est une méthode spectrophotométrique améliorée pour quantifier les caroténoïdes totaux, comparativement à la méthode AOAC pour les légumes secs. Elle a été validée par chromatographie liquide haute pression (CLHP) pour avoir une précision de 5%.

Il est recommandé que le test soit effectué dans une pièce sombre tout en maintenant des températures aussi basses que possible.

Partie 1: Extraction des caroténoïdes.

L'extraction des caroténoïdes de la spiruline est effectuée dans du méthanol. Si l'extrait obtenu est nuageux, une centrifugation est nécessaire.

Partie 2: Analyse des caroténoïdes totaux.

Faite par lecture de l'absorbance maximale de l'extrait spirulinier à l'éther à une absorbance de 450-453 nm contre un blanc d'éther.

La quantification s'y fait selon l'équation :

$$CT (\%) = \frac{Max A_{(450-453)}}{259,2 \times P \times MS} \times 25 \times \frac{V_E}{2} \times 100$$

CT (%) : Total des caroténoïdes exprimé en pourcentage en masse sèche ;

$Max A_{(450-453)}$: Maximum d'absorbance à 450-453 nm ;

P : Poids de la prise d'essai en mg ;

MS : Poids de la matière sèche en mg ;

V_E : Volume d'éther, en millilitre ;

P : Poids de l'échantillon en mg .

5.4.2.2.2. Chlorophylle-a.

La quantification de cette chlorophylle-a se fait par spectrophotométrie en lisant l'absorbance d'un extrait de spiruline dans un mélange d'acétone-eau à 666 et 642 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chlorophylle-a par rapport à la matière sèche selon l'équation :

$$Chlorophylle - a (\%) = \frac{[(9,93 \times A_{666}) - (0,0777 \times A_{642})] \times 0,05 \times 100}{P \times MS\%}$$

A_{666} : Absorbance à 666 nm ;

A_{642} : Absorbance à 642 nm ;

P : Poids, en milligramme, de la prise d'essai ;

$MS\%$: Matière sèche, en pourcentage en masse, de la spiruline ;

5.4.2.2.3. C-Phycocyanine.

La C-Phycocyanine a été quantifiée par une méthode à froid [342] en lisant son absorbance à 620 nm après une extraction dans une solution de phosphate. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la C-PC brute dans la matière sèche de la spiruline suivant les équations suivantes :

$$\% C - PC \text{ pure} = \frac{A_{620} \times (10) \times (100)}{\alpha \times P \times MS\%}$$

A_{620} : Coefficient d'absorbance de la C-phycocyanine à 620 nm ;

10 : Volume total ;

100 : Représente 100% ;

α : Coefficient d'extinction de la C-PC à 620 nm (égale 3,39 pour la C-PC brute) ;

P : Poids de l'échantillon en milligramme ;

$MS\%$: Pourcentage du poids sec.

5.4.2.3. Teneur en composés phénoliques.

L'évaluation de la teneur en composés phénoliques s'est faite après extraction des polyphénols, se fait par agitation de 10g de spiruline dans un mélange méthanol : eau (4 :1/ V : V) à 25°C pendant 3h suivi d'une filtration et une centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 10 min. L'extrait ainsi obtenu, est sujet du dosage.

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu [343-345]. Ce réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols [346] donnant une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu. Un maximum d'absorption est donné à 760nm. Une gamme d'étalonnage (appendice H), établie à partir de différentes concentration d'acide gallique (0 à 0,17 mg/ml), utilisé comme standard [347] sert à cette détermination.

5.4.3. Détermination de l'activité antioxydante.

L'activité antioxydante de la *Spiruline Htam*, a été déterminée par extraction des composés phénoliques totaux et mesure de l'activité antiradicalaire de l'extrait in vitro, par le test DPPH (DiPhényl Picryl-Hydrazyl).

L'activité antioxydante a été déterminée à ce niveau, par un test *in vitro* en se basant sur la propriété des antioxydants à réduire le DPPH qui vire, en leur présence, du violet au jaune et dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (figure 5.5.) [345] selon la méthode décrite par Mansouri et *al.*, 2005 [343].

La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25 µl de l'extrait ont été ajoutés à 975 µl DPPH, le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min. La densité optique a été mesurée à 517 nm. Contre un blanc de solution DPPH seule.

Les concentrations de l'extrait dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 0,3 mg/ml, alors que celle de l'antioxydant standard (BHT) sont comprises entre 0 et 10 µg/ml.

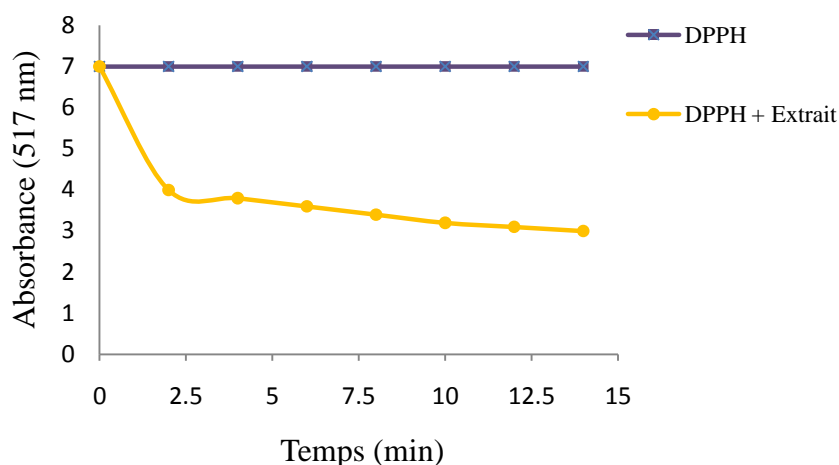


Figure 5.5. : Courbe de variation de la densité optique en fonction du temps dans le test DPPH [346].

Les résultats, exprimés en pourcentage du potentiel antioxydant, sont obtenus par l'équation ci-dessous et rapporter en courbe :

$$PA (\%) = \frac{(A_{Blanc} - A_{Ech})}{A_{Blanc}} \times 100$$

$PA (\%)$: Potentiel antioxydant des polyphénols, exprimé en pourcentage ;

A_{Blanc} : Absorbance du blanc à 517 nm ;

A_{Ech} : Absorbance de l'échantillon (différentes concentrations) à 517 nm.

5.5. Application industrielle.

5.5.1. Fabrication du fromage frais.

Nous avons procédé à une fabrication du fromage frais à partir du lait cru, transformé trois heures après sa traite.

Trois fabrications réalisées et notées comme suit :

- **FT** est le fromage témoin ;
- **FEC** est un fromage enrichi en spiruline dans le caillé ;
- **FEE** est un fromage enrichi en spiruline lors de l'emprésurage.

5.5.2. Analyses physico-chimiques.

Pour ces fabrications, nous avons procédé à l'analyse du caillé égoutté, lactosérum et fromages frais correspondants ainsi qu'à celle du lait cru utilisé. Toutes les analyses chimiques ont été réalisées avec une triple répétition.

5.5.2.1. Mesurage du potentiel d'hydrogène (pH).

Il s'agit d'une mesure directe de l'acidité ionique, elle a été faite par incorporation directe de l'électrode dans le lait, le lactosérum et la solution du fromage (10g dans 50ml d'eau distillée) [348]. Les résultats, exprimés en unités pH, ont été obtenus par lecture directe sur le pH mètre.

5.5.2.2. Extrait sec total (EST).

Déterminé par étuvage jusqu'à stabilité du poids : pour le lait et le lactosérum à 95°C selon la norme (NF T90-029). Et à 102±2°C, selon la norme (NA1130 / ISO5534, 1995) pour les échantillons de fromage. Les résultats exprimés en pourcentage massique de l'extrait sec total ont été calculés par l'équation suivante :

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

EST (%) : Taux de l'extrait sec total, exprimé en pourcentage (%) en masse ;

m_0 : Masse, en grammes, de la capsule vide ;

m_1 : Masse, en grammes, de la capsule et de la prise d'essai ;

m_2 : Masse, en grammes, de la capsule et le résidu sec.

5.5.2.3. Cendres.

Le taux de cendres a été déterminé après une éventuelle incinération des prises d'essai dans un four à moufle réglé à une température de 550°C [349]. Les résultats, exprimés en pourcentage du poids de cendres par rapport au poids initial, ont été obtenus à partir de l'expression suivante :

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

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

m_0 : Masse, en grammes, du creuset vide ;

m_1 : Masse, en grammes, du creuset et de la prise d'essai ;

m_3 : Masse, en grammes, du creuset et son contenu (cendres) après incinération.

5.5.2.4. La matière grasse (AFNOR, 1986).

La matière grasse a été déterminée par la méthode acido-butyrométrique (méthode de Gerber).

La matière grasse est séparée dans un butyromètre après centrifugation en présence d'acide sulfurique et d'alcool iso-amylque. Le pourcentage de la matière grasse en masse de produit est donné par la formule suivante :

$$M.G. (\%) = N \times 100$$

M.G. (%) : Teneur en matière grasse, exprimée en pourcentage massique ;

N : Volume lu, en millilitres, de la matière grasse.

5.5.2.5. Différentes fractions azotées.

Le dosage de l'azote est effectué par la méthode standard de Kjeldahl (ISO 8968-1 FIL 20-1, 2001). L'azote total (NT) est dosé directement sur le lait, l'azote non protéique (NNP) sur le filtrat après action de l'acide trichloroacétique à 12% [350] et l'azote non caséinique (NNC) après acidification à pH à 4,6 [351]. Les fractions azotées suivantes ont été calculées comme suit :

$$NP = NT - NNP$$

$$NC = NT - NNC$$

$$NPS = NNC - NNP$$

NP. : Azote protéique

NT : Azote total ;

NNP : Azote non protéique ;

NC : Azote caséinique ;

NNC : Azote non caséinique ;

NPS : Azote des protéines solubles.

Les différentes teneurs d'azote ont été converties en matières azotées équivalentes moyennant un facteur de conversion de 6,38 [352].

5.5.3. Exploitation des données analytiques.

Les résultats concernant les critères de composition physico-chimique du lait, du caillé, du fromage et du lactosérum et leurs pesées, constituent des variables brutes pour évaluer de la fabrication fromagère. D'autres variables, calculées, ont été prises en compte. Il s'agit de :

- L'extrait sec dégraissé (ESD) du lait, du lactosérum et du fromage;
- Le rapport gras sur sec (G/S) du fromage (en %) [353];

- Les bilans "entrées - sorties" qui permettent d'évaluer les pertes au cours du processus de fabrication, soit par évaporation soit sous forme de fines particules du caillé sur les grilles d'égouttage (avec pertes de constituants) :

$$\text{Matière brute (\%)} = \text{Entrées (P}_L) - \text{Sorties (P}_C + \text{P}_{LR})$$

P_L (%) : poids du lait ;

P_C (%) : poids du caillé ;

P_{LR} (%) : poids du lactosérum.

Les valeurs exploitées sont rapportées au poids initial du lait.

- Les pourcentages de récupération des constituants du lait (voir et de la spiruline) dans le caillé : pour évaluer les différences de composition des produits et les pertes notamment par la détermination de la matière brute (MB), c'est à dire le rendement fromager frais (R_f en Kg/Kg de lait) qui correspond au poids du fromage obtenu au démoulage pour 100Kg de lait mise en œuvre ; la détermination de NT, MG, EST et ESD.

$$MB = \frac{\text{Poids}_C}{\text{poids}_L} \times 100$$

Pour les autres constituants telle que la MG, le calcul se fait comme suit :

$$MGr(\%) = \frac{MG_C}{MG_L} \times 100$$

MGr : Pourcentage de récupération de la matière grasse dans le caillé

Le rendement ajusté (Ra) à partir de la connaissance analytique de la teneur en extrait sec du lait, du fromage et du sérum [355] :

$$Ra = R_f \times \frac{MS_C - MS_{LR}}{MS_{Cmoy} - MS_{LR}}$$

$MS_{C_{moy}}$, MS_{LR} et MS_C : Matières sèches respectives du caillé (moyenne), du lactosérum et du caillé de fin d'égouttage.

Le rendement fromager sec (R_s) qui est défini comme suit :

$$R_s = MS_C(\%) \times R_f \times 100$$

A noter, que dans le cas où l'ajout de la spiruline était fait lors de l'emprésurage, il faut tenir compte de la quantité de spiruline dans les entrées, ou dans le caillé.

5.5.4. Analyses microbiologiques.

Les analyses microbiologiques, effectuées sur les échantillons de spiruline, de lait, lactosérum et du caillé, visaient à contrôler la qualité hygiénique de ces produits : il s'agissait donc d'un contrôle des matières premières et des produits finis.

5.5.4.1. Méthode de prélèvement aseptique des échantillons.

Pour l'échantillonnage et le prélèvement de nos produits laitiers, la norme NA 676/ISO 707 était prise comme référence. Après avoir bien mélanger le lait et le lactosérum, un prélèvement aseptique, sous hotte a été effectué. Le fromage, subis des prélèvements de la surface au centre.

5.5.4.2. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

La spiruline et le fromage destinés aux analyses microbiologiques dans notre étude sont des produits solides donc pas directement pipetables, de ce fait, ils nécessitent une fluidisation représentée par ce qu'on appelle : la suspension mère. Cette suspension doit être préparée dans des conditions d'asepsie rigoureuse en manipulant sous hotte à flux laminaire, on a procédé à leurs préparations selon la norme NF V 08-301, 1983.

Dans un sachet Stomacher stérile, 10g prélevés du centre de la pièce et de surface jusqu'au fond pour le fromage (NA 676/ISO 707) ont été introduits aseptiquement, puis 90ml de diluant : tryptone-sel-eau (TSE) ont été ajoutés, une homogénéisation par le malaxeur Stomacher a eu lieu. La suspension ainsi préparée correspond à la dilution 10^{-1} .

Pour les produits liquides (lait et lactosérums), nous avons prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile 1 ml de lait que nous avons introduit dans un tube stérile contenant 9 ml de diluant : TSE : nous avons obtenu la dilution 10^{-1} . Nous avons procédé à la préparation des dilutions successives décimales de raison 10 à partir de la suspension mère: 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} à 10^{-5} .

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

5.5.4.3. Contrôle microbiologique de la qualité.

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

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

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

Le tableau 5.4. donne les différents germes recherchés au niveau de nos différents produits, ceux recherchés sont indiqués par le signe positif : (+) ; les germes non recherchés portent le signe négatif : (-)

Tableau 5.4. : Germes recherchés dans la spiruline et les différents échantillons laitiers (JORA N° 37).

| Germes recherchés. | Spiruline | Lait cru | Fromage |
|---|------------------|-----------------|----------------|
| Germes aérobies mésophiles totaux à 30°C. | + | + | + |
| Coliformes totaux | + | - | + |
| Coliformes fécaux | + | - | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | + | + |
| <i>Salmonella</i> | + | - | + |
| Anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C. | + | + | + |
| <i>Clostridium perfringens</i> | + | - | - |

5.5.4.3.1. Dénombrement des germes aérobies à 30°C.

Le dénombrement de la flore mésophile totale a été effectué selon la norme (NA 759, 1990 pour la spiruline et la norme NF V08-051 pour les produits laitiers).

Un volume de 1ml pris à l'aide d'une pipette automatique à embouts jetables stériles à partir de chaque dilution (suspension mère et dilutions décimales), pour chaque produit, a servi à l'inoculation de deux boîtes de Pétri stériles. Dans chaque boîte environ 12 à 15 ml de gélose pour dénombrement sur gélose PCA (milieu solide) ramenée à la température de 44 à 47°C. a été coulée. L'inoculum a été mélangé soigneusement au milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Pétri puis laisser pour se solidifier.

Après solidification, les boîtes ont été incubées dans une étuve à 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) pendant 72h ($\pm 3\text{h}$). Après la période d'incubation, nous avons procédé au comptage des colonies qui sont de taille et de formes différentes.

5.5.4.3.2. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux.

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

Pour les coliformes totaux et selon la norme (ISO 5541), 15ml du milieu sélectif solide : gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) à 45°C. ($\pm 0,5^\circ\text{C}$.) ont été coulés dans la boite de Pétri contenant l'inoculum, et un mélange de l'inoculum au milieu de culture a été effectué. Après solidification, environ 4 ml du milieu VRBL ont été coulés de nouveau et laisser se solidifier. Les boites ainsi préparées ont été retournées et incubées dans une étuve réglée à 37°C. pendant 24h \pm 2h.

En ce qui concerne les coliformes fécaux, le même mode opératoire a été fait à la différence de la température d'incubation qui sera de 44,5°C. ($\pm 0,5^\circ\text{C}$.)

Le dénombrement des colonies caractéristiques violacées de 0,5 mm de diamètre ou plus a été réalisé sur les boites ne contenant pas plus de 150 colonies caractéristiques et non caractéristiques.

5.5.4.3.3. Dénombrement de *Staphylococcus aureus*.

Réalisé sur milieu de Baird-Parker (milieu solide) considéré comme le mieux adapté à cette espèce avec addition de jaune d'œuf au téllurites de potassium comme additif ; suivant la norme NF 08-052 pour les produits laitiers et la norme NA 760, 1990 pour la spiruline.

Pour chaque dilution, deux boites de Pétri contenant au préalable le milieu de Baird-Parker, ont étéensemencées en surface avec 0,2 ml d'inoculum à l'aide d'un étaleur stérile en verre. Les boites ainsi préparées ont été renversées puis incubées dans une étuve réglée à 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) pendant 24h sinon 48h.

Les colonies caractéristiques noires ou grises, brillantes et convexes de 1,5 à 2,5 mm de diamètre et entourées d'une auréole claire, sont visées lors du dénombrement.

5.5.4.3.4. Recherche de *Salmonella* (NF V08-052).

La recherche des *Salmonella* nécessite trois phases successives :

- 1) Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide : Une prise d'essai de 25g (du produit frais) étaitensemencée dans 225 ml de l'eau-peptonnée-tamponnée à température ambiante, puis incubation à 37°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$.) pendant $18\text{h} \pm 2\text{h}$;
- 2) Enrichissement en milieu sélectif liquide : Un tube contenant 10 ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (RVS) et un autre contient 10 ml de bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) ont étéensemencé avec 0,1 ml et 1 ml respectivement de la solution du pré-enrichissement puis le bouillon RVSensemencé a été incubé à 41,5°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$.) et le bouillon MKTTnensemencé incubé à 37°C. ($\pm 1^\circ\text{C}$.) pendant $24\text{h} \pm 3\text{h}$.
- 3) Isolement et identification : Après la période d'incubation, chacun des bouillons récupérés a servi à l'ensemencement, à l'aide d'une anse, la surface de deux boîtes de Pétri, l'une contenant la gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD) et l'autre contenant l'héctoène. Les boîtes renversées ont été placées dans une étuve réglée à 37°C ; pendant $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

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

5.5.4.3.5. Dénombrement des anaérobies sulfite-réducteurs à 46°C.

À partir de chaque dilution, 1 ml a été transféré dans une boîte de Pétri stérile à l'aide d'une pipette automatique à embouts stériles jetables, un volume d'environ 15 ml du milieu tryptose-sulfite à la cyclosérine (TSC) maintenu entre 44 et 47°C est ensuite coulé

dans chaque boîte. L'inoculum a été mélangé au milieu, Ce mélange a été laissé se solidifier, puis 5 ml du milieu TSC sont ajoutés.

Les boîtes obtenues ont été renversées et placées dans des jarres pour anaérobiose puis incubées dans une étuve réglée à 46°C pendant 20h ± 2h.

Lors du comptage, seules les boîtes contenant moins de 30 colonies caractéristiques (noires) ont été choisies.

5.5.4.3.6. Recherche des *Clostridium thermophiles*.

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

Pour les formes végétatives : Trois tubes à essai contenant le milieu de gélose sulfitée au citrate de fer (10 ml) et préalablement désaérés, ont étéensemencés à partir de la suspension mère à l'aide d'une pipette automatique à embouts stériles jetables délivrant 1 ml.

Pour les formes sporulées : En suivant les mêmes étapes, trois autres tubes ont été préparés de la même façon. Ces tubes ont été plongés pendant 10 minutes dans un bain d'eau bouillante puis refroidis immédiatement sous un courant d'eau froide.

Les six tubes ainsi préparés ont été incubés en suite dans une étuve réglée à 55°C (± 2°C) pendant 8 jours. La présence de ces germes se traduit par l'apparition de colonies noires.

5.5.4.3.7. Recherche des résidus d'antibiotiques.

Cette recherche a été effectuée sur l'échantillon du lait de vache cru. Une ose de *Lactobacillus bulgaricus* lyophilisée a été introduite dans 1 ml de bouillon MRS, nous avons procédé à une incubation à 37°C pendant 24 heures. Cette culture sera mise dans 9 ml de bouillon MRS puis incubé à 37°C pendant 18h.

Où : N est le nombre des dilutions prises pour le calcul de la charge moyenne.

Cette moyenne arithmétique sera comparée avec les normes.

5.5.4.4.2. Cas de dénombrement en milieu liquide.

Considérant les résultats suivants :

- | | | |
|--|---|-------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Dilution 10^{-1} : essai 1 : (+) ; essai 2 : (+) \Rightarrow Chiffre : 2 • Dilution 10^{-2} : essai 1 : (+) ; essai 2 : (+) \Rightarrow Chiffre : 2 • Dilution 10^{-3} : essai 1 : (-) ; essai 2 : (-) \Rightarrow Chiffre : 0 | } | Nombre= 220 |
|--|---|-------------|

En se référant à la table de MacGrady, le nombre 220 correspond à un nombre caractéristique : 25, cela veut dire que le produit contient 25 germes par grammes dans la dilution 10^{-2} , soit : 250 germes par grammes de produit.

5.5.4.5. Etude de l'effet de la spiruline sur la flore lactique.

Le suivi de l'évolution de la flore lactique : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* du fromage s'y fait à des temps différents. Il consiste en un dénombrement de ces bactéries lactiques.

5.5.4.5.1. Dénombrement de *Streptococcus thermophilus*.

Un (1) millilitre de la troisième à la cinquième dilution décimale des échantillons de lait et du fromage, a été transféré dans une boîte de Pétri contenant la gélose M17.

Après une incubation à 37°C pendant 72 heures, un comptage des colonies lenticulaires de *Streptococcus thermophilus* a été effectué.

5.5.4.5.2. Dénombrement de *Lactobacillus bulgaricus*.

De la même manière citée précédemment, nous avons remplacé la M17 par la gélose MRS, tout en créant une anaérobiose.

L'incubation se fait à 37°C pendant 72h puis les colonies lenticulaires, souvent polylobées (étoiles) de 1 à 3 mm de diamètre de *Lactobacillus bulgaricus* sont comptées.

Pour représenter nos données, nous avons procédé après le dénombrement des unités formant colonies (UFC), au calcul du log UFC/ml de produit en vue d'une représentation de l'évolution de la biomasse bactérienne en fonction du temps.

Une autre méthode d'évaluation de la croissance de cette flore a été faite par établissement des courbes d'acidification : un suivi du pH au cours du temps. La vitesse d'acidification, soit la variation du pH (ΔpH) en fonction de la variation du temps (Δt).

Les temps choisis, selon procès de fabrication fromagère, sont comme suit :

| | |
|----|--------------------------------------|
| T0 | Lait cru |
| T1 | Laitensemencé en bactéries lactiques |
| T2 | Caillé égoutté (T0+30 h) |
| T3 | (T0+78h) |
| T4 | (T0+126h) |
| T5 | (T0+174) |
| T6 | (T0+222h) |

5.5.5. Représentation graphiques et analyse statistique des résultats.

Afin d'exploiter les résultats relatifs à la caractérisation de l'*Athrospira htam*, et l'optimisation de ses conditions de culture et son application industrielle, nous avons utilisés des méthodes statistiques.

La comparaison entre la *Spirulina htam*, cultivée sur le milieu de culture Hiri et celle cultivée sur le milieu de culture Zarrouk, pour les différents paramètres a été effectuée en utilisant le logiciel ANOVA. Ainsi ce logiciel a été utilisé pour les résultats des applications industrielles.

L'établissement des courbes et graphiques a été fait par l'utilisation de Microsoft Office Excel 2007.

CHAPITRE 6

RESULTATS ET DISCUSSIONS

6.1 Réalisation de la culture de l'*Arthrospira htam*.

6.1.1 Culture à petite échelle.

A partir d'une quantité de deux litres de suspension de spiruline concentrée issue de la ferme de Tamanrasset, nous avons procédé à des multiplications du volume dans des béchers et aquariums de contenances croissantes (figure 6.1.) pour y arriver à une production à grande échelle (des bassins).

Les conditions de culture ont été comme suit : Température de 35°C, lumière de jour, agitation, en continu, par pompe à air : 150 bulles par minute.



Figure 6.1. : Culture à petite échelle de la *Spirulina htam*
(originale, 2009).

La culture s'est étendue pour une durée de quatre mois, durant laquelle, différentes anomalies ont été observées (figure 6.2.).

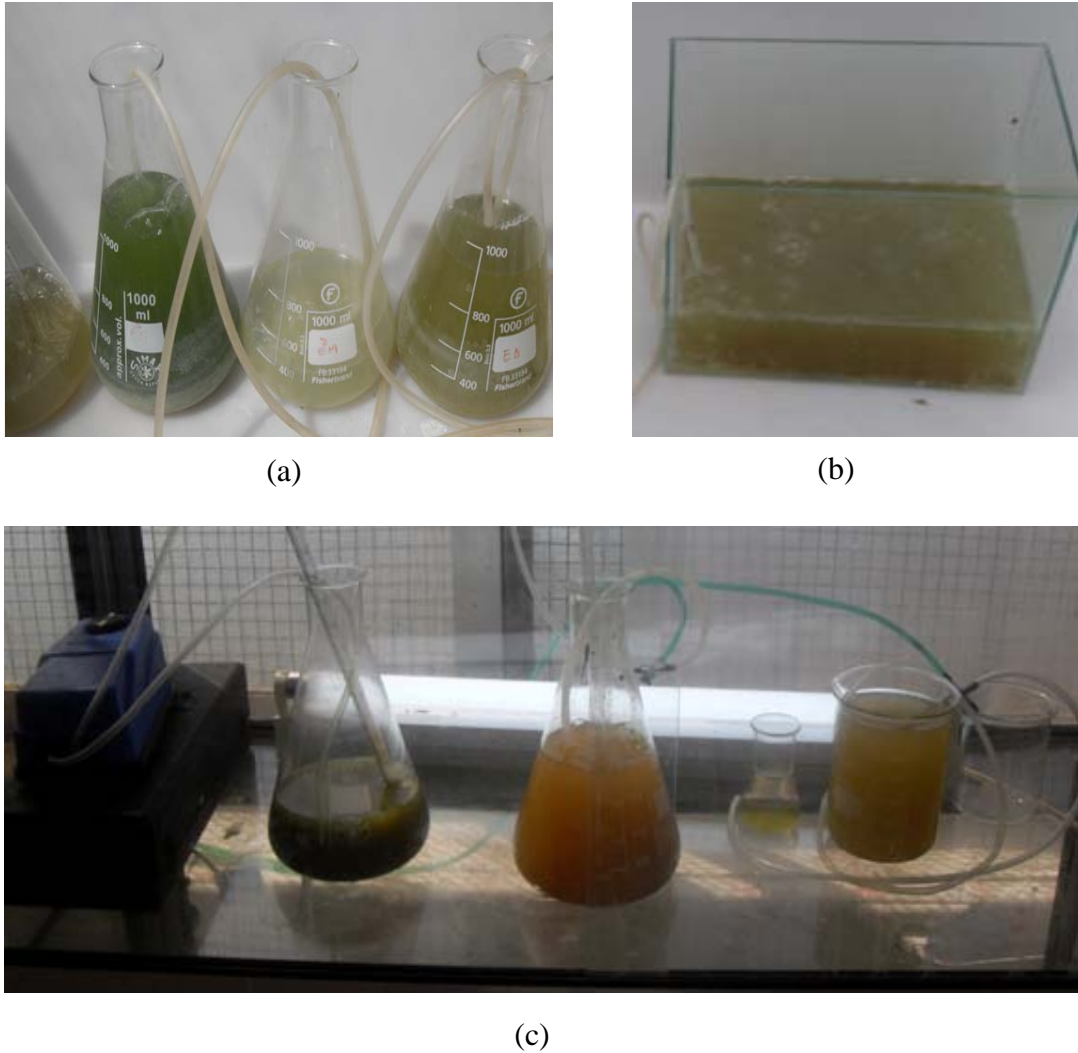


Figure 6.2. : Différentes anomalies de couleur du milieu de culture de la *Spirulina htam* observées lors de la culture à petite échelle (originale, 2009).

En effet, toutes les anomalies décrites par FOX, 1999 [16] ont été observées.

Une couleur palie (figure 6.2. : a) : suite à un manque d'azote fixé (pH= 9.8) ; Puis à un manque de CO₂ (pH= 10.8).

Une culture jaunâtre sur un fond grisâtre : signe d'un déficit en carbone et éventuellement en azote (figure 6.2. : b et c).

Une culture jaunâtre signifiant qu'il y'a eu lyse et que les parois des cellules sont rompues, en expulsant des polysaccharides (figure 6.2. c au milieu) [16].

6.1.2 Culture à grande échelle.

Arthrospira htam objet de notre recherche a été cultivée, à grande échelle dans deux milieux de culture à savoir le milieu de culture algérien de Hiri et le milieu de culture de référence : Zarrouk. Nous avons utilisés pour cela, deux bassins de 0,8m³ de contenance, opaques, mis sous serre (en se référant aux normes établis par Jourdan, [19]). L'agitation a été assurée par des pompes à air livrant environ 150 bulles d'air par minutes (figure 6.3.).



Figure 6.3. : Serre et bassins, lieu de production de la spiruline
(Original, 2010).

Ces cultures, ont aussi été sujettes à des anomalies, une disparition complète de la couleur a été observée après avoir atteint un volume de 50 litres (figure 6.4.).

Toute la culture a été jetée : la spiruline a été, selon FOX, soit piégée (dans des amas de polysaccharides, dans des cristaux de carbonate de calcium ou de phosphate), soit dévorée par des prédateurs [16]. Après quoi, nous avons procédé à un nettoyage des bassins et redémarrage de cultures.

D'autres anomalies ont continué à apparaitre, nous avons refais la culture de la spiruline sept (7) fois. A chaque fois, nous avons observé différentes anomalies, qui nous

ont finalement permis de mettre au point une meilleure façon d'aborder la culture de la *Spirulina htam*.

En effet ; nous n'avons pu récolter une bonne biomasse qu'à partir du mois d'aout 2010 ; soit environ neufs mois après le lancement de la culture sur Alger.



Figure 6.4. : Disparition de la coloration de la culture de la spiruline
(Original, 2010).

La récolte de notre spiruline s'est faite en faisant passer cette dernière par une écumoire (tamis) de 150 μ m avant de la récupérer dans un filtre de pores de 30 μ m de diamètres (figure 6.5.).



Figure 6.5. : Récolte de la spiruline (Originale, 2010).

La spiruline ainsi récoltée et pressée (figure 6.6. a), a subi un séchage par convection dans une étuve à 40°C : température choisie après différents essais d'optimisation de la température de séchage en fonction de la teneur en protéines (*C. f.* paragraphe 6.2.3.).

Une réduction en poudre a été également réalisée grâce à un broyage (figure 6.6. b).



(a)



(b)

Figure 6.6. : Pâte (a) et poudre (b) de la spiruline récoltée (Originale, 2010).

La spiruline collectée en fin du parcours a été mise dans des boîtes étanches et opaques pour éviter tout risque d'oxydation et de détérioration de sa qualité nutritionnelle.

6.2 Optimisation des conditions de culture.

6.2.1 Effet de la composition du milieu de culture sur la croissance.

Les résultats des essais visant à étudier l'effet de différents milieux de culture (au nombre de quatre) sur l'évolution de la biomasse de spiruline, en fonction du temps, ont conduit à l'établissement des cinétiques de croissances figurées ci-dessous (6.7 à 6.10).

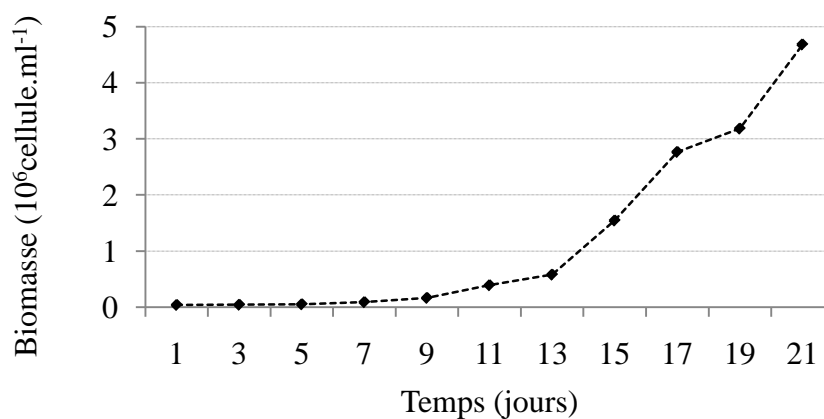


Figure 6.7. : Evolution de la biomasse de la *Spirulina Htam* dans le milieu de culture Hiri.

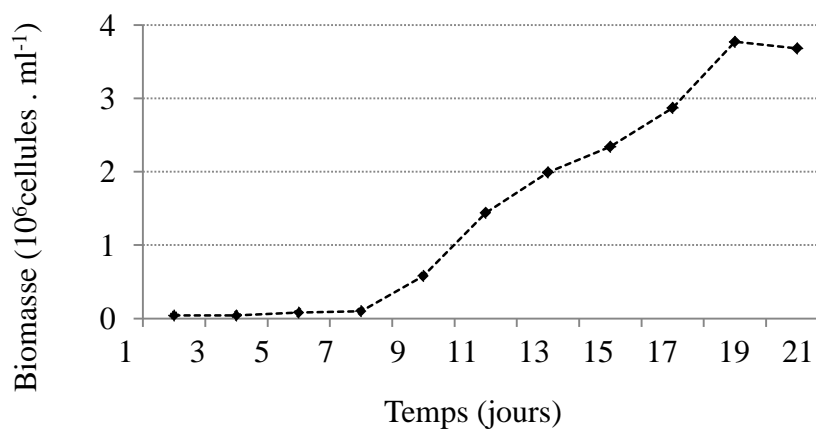


Figure 6.8. : Evolution de la biomasse de la *Spirulina Htam* dans le milieu de culture Zarrouk.

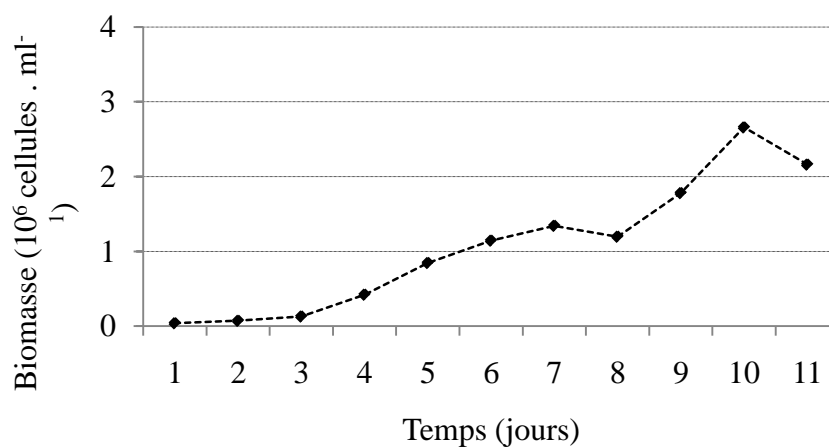


Figure 6.9. : Evolution de la biomasse de la *Spirulina Htam* dans le milieu de culture BG-11.

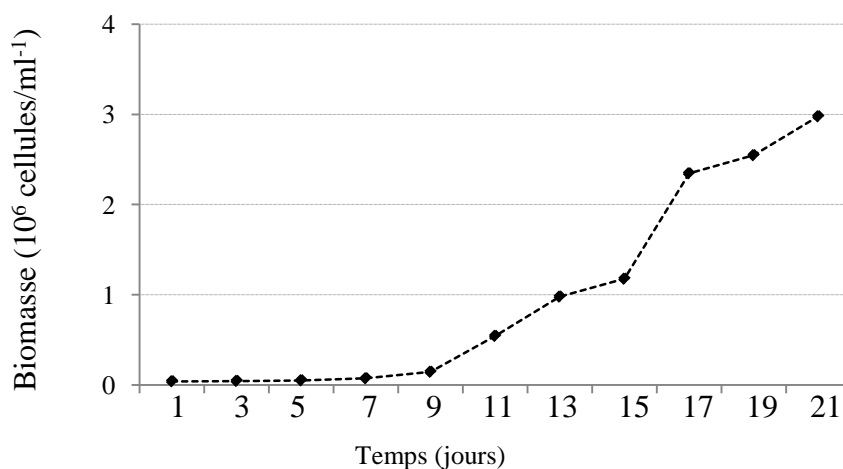


Figure 6.10. : Evolution de la biomasse de la *Spirulina Htam* dans le nouveau milieu proposé.

Nous avons constaté que la *Spirulina htam* cultivée sur les différents milieux, ne commence à manifester sa croissance qu'à partir d'un certain temps : cinq (5) à onze (11) jours après sa mise en culture. Cette période que l'on peut dénommer : phase de latence, correspond en réalité à une phase d'adaptation au milieu de culture du faite de la variation des conditions ambiantes.

Cette phase est plus courte dans les milieux de culture Zarrouk (7 jours) et BG-11 (5 jours) que dans les milieux de culture Hiri (11 jours) et le milieu de culture proposé (9 jours).

Ceci est probablement du au fait que dans les milieux Zarrouk et BG-11, il y'a présence d'un « activateur de la croissance » : le zinc. C'est un contrôleur de la synthèse de l'acide indolacétique qui est un important régulateur de la croissance, c'est l'activateur de l'enzyme anhydrase carbonique, essentielle pour l'utilisation de l'acide carbonique [356].

Aussi, il semblerait que seul le milieu Hiri tarde à donner des résultats. Cela pourrait être expliqué par sa pauvreté en potassium : paramètre jouant un rôle essentiel dans la régulation de la pression osmotique.

Une deuxième phase arrive juste après l'adaptation au milieu : c'est la phase exponentielle. La spiruline se montre dans son état de croissance maximal, en se multipliant rapidement, des dédoublements de la biomasse peuvent être observés au bout de 24h.

Une légère fluctuation de la croissance dans le milieu BG-11 lors du 15^{ème} jour a été observée et pourrait être attribuée à une chute de la disponibilité du fer qui constitue plusieurs enzymes à hème et sans hème. L'hème étant un complexe qui forme le groupement prosthétique de plusieurs enzymes : catalase, peroxydase et cytochrome oxydase en relation avec le métabolisme donc la biomasse.

Il se pourrait également que cette fluctuation soit due (et c'est la raison la plus probable) à la faible quantité d'azote ajoutée, qui en s'épuisant, est substituée par l'effet du cuivre ajouté sous forme de sulfate et qui est impliqué dans la chaîne photosynthétique et dans le processus de fixation de l'azote.

Dans les milieux de culture Zarrouk et BG-11 et à partir du 19^{ème} jour de la culture, un déclin s'observe. En théorie [357], ce déclin s'interprète par un épuisement du milieu de culture.

Seulement, dans ce cas, il ne s'agit pas d'un épuisement des nutriments, mais plutôt dans le cas du milieu Zarrouk d'une hyper-sécrétion d'exopolysaccharides conduisant à la formation d'amas qui décantent au fond du bûcher.

Quand au milieu de culture BG-11, la coloration a virée vers le jaune et le pH mesuré indiquait une valeur de 9.98, ce qui mène à dire, selon FOX [16], qu'il ya eu manque d'azote. En effet, la quantité d'azote ajouté au milieu : 1.5 g/l de Nitrate de sodium dans l'eau est assez faible.

Dans le milieu Hiri et le milieu que nous avons proposé, cette régression n'a pas été observée. Cela peut être lié au fait que la phase exponentielle dans ces deux derniers milieux de culture, n'a commencé que deux jours après celle des milieux de culture Zarrouk et BG-11.

En termes de biomasse, les milieux de culture Zarrouk et Hiri semblent être les plus efficaces avec des valeurs de $4.68 \cdot 10^6$ et $3.77 \cdot 10^6$ cellules par millilitre de milieu de culture respectivement. Cela pourrait être attribué au taux de calcium apporté par ces deux milieux : il joue un rôle déterminant au cours des principales phases de la vie. Sa présence dans le suc cellulaire est indispensable pour le développement de la spiruline. Il est impliqué dans la division cellulaire [356].

6.2.2 Rendement en spiruline.

En fonction des résultats issus de la partie précédente (optimisation des milieux de culture), la culture à grande échelle : et donc l'évaluation du rendement en spiruline, n'a été fait que sur deux milieux de culture à savoir le milieu de culture de Hiri et celui de Zarrouk. Les résultats de l'estimation du rendement obtenus en terme de matière fraîche « pate de spiruline » et en matière sèche, dans les deux milieux de culture, ont été représentés dans la figure ci-dessous (6.11) :

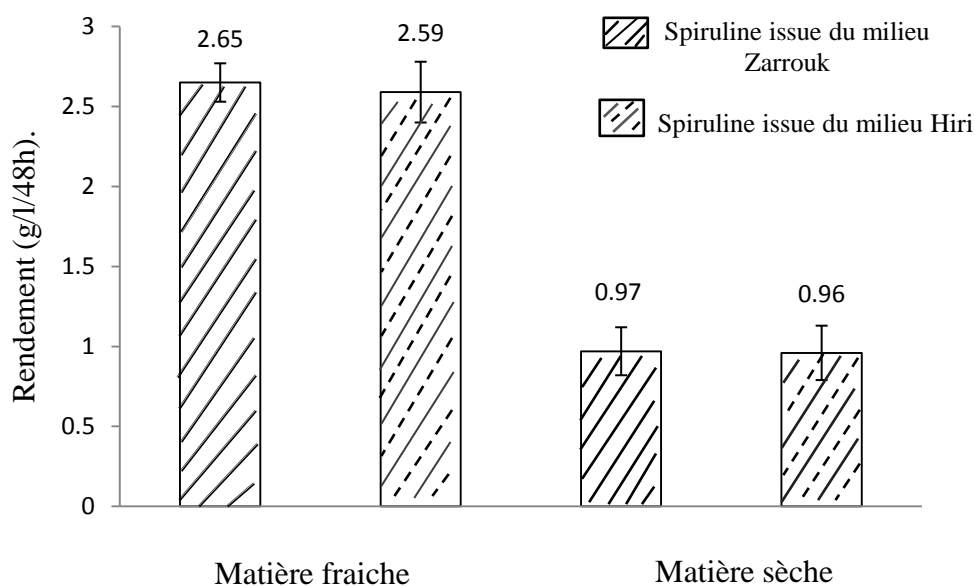


Figure 6.11 : Rendements en spiruline, rapporté à la matière sèche et matière fraîche, de la spiruline cultivée dans le milieu Zarrouk et Hiri.

Nous avons trouvé que les rendements en matière fraîche sont de $2.59 \text{ g/l/48h} \pm 0.19$ et $2.65 \text{ g/l/48h} \pm 0.12$ pour la spiruline cultivée sur milieu de culture Hiri et Zarrouk respectivement.

Les rendements en terme de matière sèche (poudre de spiruline) sont de l'ordre de $0.96 \text{ g/l/48h} \pm 0.17$ et $0.1 \text{ g/l/48h} \pm 0.15$ pour la spiruline cultivée sur milieu de culture Hiri et Zarrouk respectivement.

Cette différence non significative, est en effet due en premier lieu à la présence dans les deux milieux de culture, de tous les nutriments dont la spiruline en a besoin pour sa croissance et sa multiplication. En second, toutes les conditions opérationnelles favorables pour la culture de la spiruline : Température, agitation, lumière, ont été réunies.

6.2.3 Effet des conditions opérationnelles de culture sur la croissance.

Pour l'optimisation des conditions opérationnelles de la culture de la spiruline, nous avons opté pour le milieu de culture : Hiri.

Par ce choix, nous avons visé à mettre en place le milieu de culture Hiri, vue que les rendements ont été très proches voir équivalents entre ce milieu de culture et le milieu de culture Zarrouk. En outre, ce choix a été fait en fonction de la disponibilité des intrants du milieu de culture et du prix de revient.

6.2.3.1 Effet de la température sur la croissance.

Les cinétiques de croissance de *Spirulina htam* dans le milieu de culture sélectionné et aux quatre températures expérimentées : 28, 32, 36 et 38°C., sont représentées par la figure 6.12.

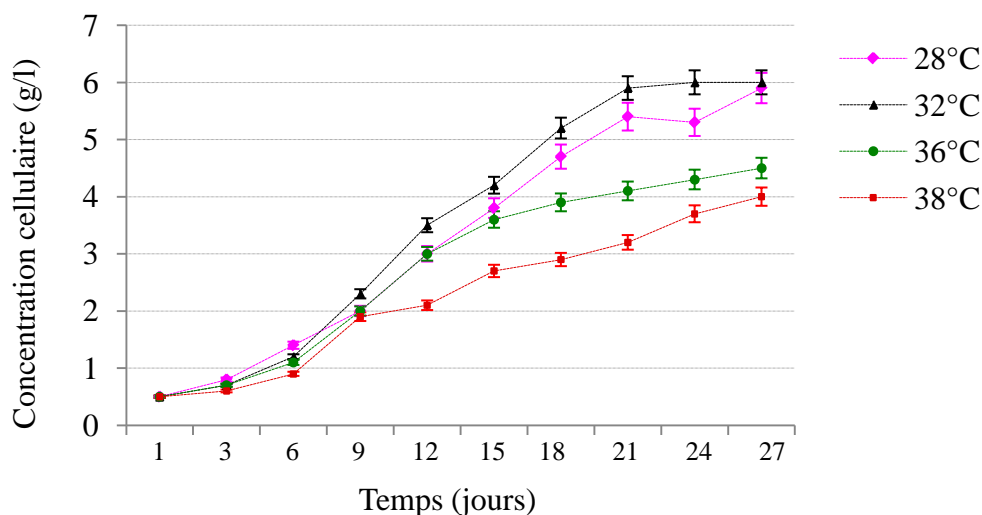


Figure 6.12. Cinétique de croissance de *Spirulina htam* dans le milieu Hiri à différentes températures.

Il en ressort de ces cinétiques que notre spiruline s'adapte mieux aux basses températures. Une croissance maximale est observée et est à 32°C, de l'ordre de 6g/l ; alors qu'une évolution minimale s'affiche à 38°C et est de l'ordre de 4g/l.

Comme toute autre bactérie, la spiruline, cyanobactérie alimentaire, passe dans son évolution par Trois phases principales :

La première correspond à la phase de latence ou d'adaptation, d'une durée de 1 à 3 jours et dont l'évolution en termes de biomasse tend vers le zéro. Cela est logique car en cas de grande variation en température, un choc thermique pourrait provoquer une lyse cellulaire.

Dans la seconde phase de croissance, dite exponentielle : du 3^{ème} au 22^{ème} jour, il ya évolution de la biomasse, due à une accélération des activités métaboliques conduisant à la genèse cellulaire. Il s'agit en outre, d'une augmentation de l'activité photosynthétique et enzymatique.

A de fortes températures (supérieures à 32°C dans notre cas), le CO₂ devient plus soluble, ce qui peut engendrer une exsudation des exopolysaccharides formant des amas qui freinent la croissance. Les enzymes sont des protéines et à partir d'une certaine

température, leurs structures se modifient. A fortes températures les protéines se dénaturent et perdent donc une partie de leurs activités enzymatiques. L'activité enzymatique sera donc la résultante de la variation de la vitesse de la réaction enzymatique et du pourcentage de dénaturation de l'enzyme en fonction de la température.

A noter qu'au niveau de la culture à 38°C, nous avons observé une modification de la couleur : la culture a jauni. Cela pourrait signifier qu'il y'a eu lyse et que les parois des cellules ont été rompues, en expulsant des polysaccharides dans l'eau. Il aurait fallu dans ce cas soit abaisser la température, ou diminuer l'apport en CO₂, ombrager ou diminuer l'agitation [16].

Nos résultats sont comparables à ceux de Zarrouk [30] qui préconise une température de 30°C pour la culture de la spiruline alors que Jourdan et Fox, préconisent des températures allant de 34 à 40°C [16 ; 30].

Via certains essais que nous avons menés et dont les résultats n'ont pas été rapportés, la spiruline algérienne semble être plus productive à des températures élevées lorsqu'elle est cultivée sur milieu Zarrouk. En milieu Hiri la température optimale est de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Cela nous a mené à penser à une possibilité de destruction de certains principes actifs codant la croissance bactérienne, en température élevées dans le milieu Hiri. La richesse du milieu Zarrouk en catalyseurs/inhibiteurs serait, probablement, derrière le fait que cette anomalie soit empêchée.

6.2.3.2 Effet du pH sur la croissance.

La figure 6.13., représente les cinétiques de croissance en biomasse de la spiruline en fonction du temps dans le milieu Hiri et à des valeurs de pH différentes : 8, 9, 10 et 11 unités pH.

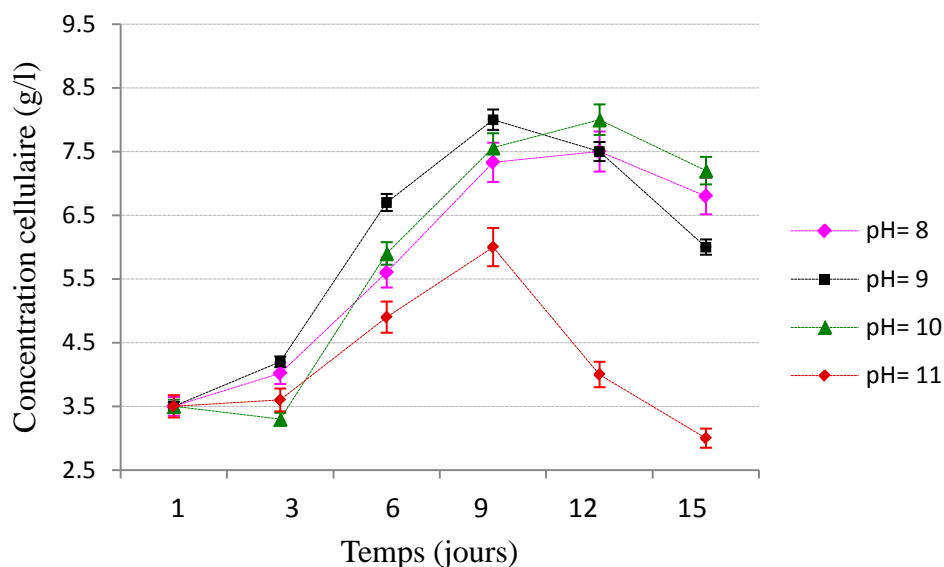


Figure 6.13. : Cinétique de croissance de *Spirulina htam* dans le milieu Hiri à différentes valeurs de pH.

Aux valeurs de pH testées, nous notons une phase de latence de deux jours avec un taux de biomasse variant de 3.5 à 4.2g/l suivie d'une phase exponentielle du 3^{ème} au 9^{ème} jour. Un maximum de 8g/l est observé au 9^{ème} jour à pH 9 et au 12^{ème} jour à pH 10.

Nos valeurs sont comparables à celles rapportées par Jourdan [23] à pH 9.8. Zarrouk [30] observe une meilleure croissance à pH de 10.

ABU et *al.* [358] trouvent que la spiruline cultivée sur milieu Zarrouk a une meilleure croissance maximale à pH 9 jusqu'à 9.5 et 10.

Cela peut être attribué au fait que chaque enzyme intervenant dans le métabolisme est active à certain pH. L'activité est maximale à un pH précis : c'est le pH optimal. A ce pH, l'enzyme possède une conformation bien déterminée qui va lui conférer son activité. Lorsque ce pH varie, la structure de l'enzyme varie et donc son activité diminue.

6.2.3.3 Effet de l'agitation sur la croissance.

Les résultats représentés dans la figure 6.14., montrent le suivi, pendant 21 jours, de l'évolution de la croissance de la *Spirulina htam* dans le milieu Hiri et cela avec deux modes d'agitation : agitation électrique par pompe à air, à environ 150 bulles par minute,

en continu ; et une agitation manuelle trois à quatre fois par jour, par simples mouvements de détournements des béciers contenant la culture de la spiruline.

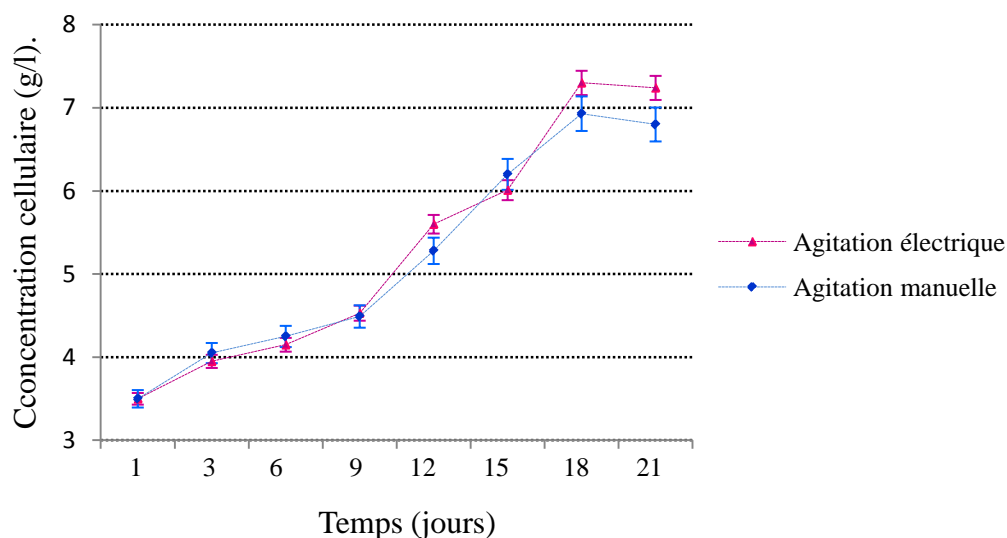


Figure 6.14. : Cinétique de croissance de *Spirulina htam* dans le milieu Hiri à différents modes d'agitation.

D'après la figure 6.14., nous remarquons que la croissance maximale est observée au bout du 21^{ème} jour de la culture quelque soit le mode d'agitation. Seulement les concentrations cellulaires sont de 7.3 g/l pour la culture agitée électriquement et 6.93 g/l pour la culture agitée manuellement.

Une agitation électrique semble donc avoir un meilleur effet sur la croissance de la spiruline.

Cela pourrait s'expliquer par l'homogénéisation assurée par la pompe. Nous remarquons que la spiruline a tendance à flotter lorsque l'agitation n'est pas continue conduisant à une concentration des filaments de la spiruline à la surface.

6.3 Optimisation du séchage.

La biomasse fraîche de la spiruline, est une matière biologique très riche en eau (50 à 90%), il s'agit donc d'une denrée alimentaire très périssable car les risques de

dégradation biologiques, enzymatique et/ou microbienne sont certains si on ne procède pas rapidement à sa conservation [16].

La figure 6.15., indique la variation du taux de protéines de la *Spirulina htam* cultivée sur les milieux de culture Zarrouk et Hiri en fonction du mode de séchage.

Nous avons procédé à un séchage par lyophilisation, et un séchage dans une étuve à différentes températures : 40, 60 et 80°C.

Le taux de protéine est indiqué en ratio protéique en gardant comme référence le taux protéique de la biomasse fraîchement récoltée.

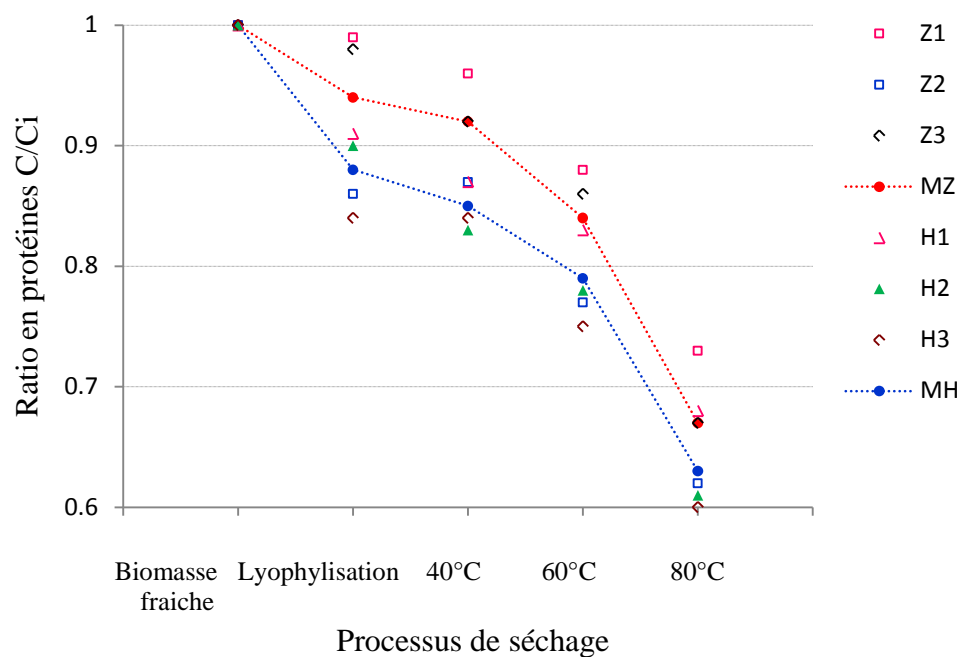


Figure 6.15. : Ratio entre le taux de protéines initial et après séchage (C/Ci) par différent modes et à différentes températures. Z : Spiruline cultivée dans le milieu Zarrouk ; H : celle du milieu Hiri. 1 à 3 : les essais. M : la moyenne.

La valeur moyenne du taux de protéines dans la spiruline séchée par lyophilisation est de $62.29\% \pm 2.13$ pour la spiruline cultivée sur Zarrouk et $57.72\% \pm 1.64$ pour celle cultivée sur le milieu Hiri. Le séchage en couches minces à 40°C mène à des valeurs de

60.64% \pm 0.18 et 55.16% \pm 0.42 respectivement pour les deux échantillons de spiruline ; ce taux est inversement proportionnel à la montée en température.

Il ressort de la figure 6.15, que les pertes minimales en termes de protéines de la spiruline sont observées lors d'un séchage par lyophilisation ou un séchage à 40°C. Ces dernières sont de l'ordre de 6 à 8% respectivement pour la spiruline cultivée sur Zarrouk et 12 à 15% pour celle cultivée en milieu Hiri.

Des pertes protéiques de 16 à 21% à 60°C et 34 à 37% à 80°C sont également observées.

Toutefois, nos résultats sont semblables à ceux trouvés par DESMORIEUX et HERNANDEZ, 2004 [359] et qui sont de l'ordre de 10% à 40°C, 20% à 70°C et 40% à 90°C.

Cette perte pourrait s'interpréter par une combinaison des protéines en réaction de Maillard après une éventuelle dénaturation [360]. Ainsi, Les molécules biologiques complexes sont très sensibles à la température. La plupart des protéines se dénaturent rapidement à des températures supérieures à 45°C ce qui explique les pertes protéiques minimales lors du séchage à 40°C et celles remarquables lors du séchage à 60 et 80°C. La lyophilisation consiste en sublimant le solvant aqueux (l'eau) pour ne récupérer que les molécules résiduelles non volatiles, dont les protéines. La sublimation est une approche technique particulièrement utile puisqu'elle se fait justement à de basses températures où les protéines en solution sont stables donnant réponse aux faibles pertes protéiques dans la spiruline.

6.4 Caractérisation nutritionnelle.

6.4.1 Composition bromatologique générale.

Les résultats relatifs à la composition nutritionnelle générale des deux échantillons de spiruline : cultivée sur milieu Zarrouk et Hiri, sont regroupés dans le tableau 6.1.

Tableau 6.1. : Composition nutritionnelle générale de la *Spirulina Htam* cultivée sur le milieu Zarrouk et Hiri.

| Echantillon | Moyenne \pm E.T. |
|------------------------|--------------------------------------|
| Taux d'humidité (%) | |
| S _Z | 8.64 \pm 0.55 |
| S _H | 13.62 \pm 0.54 |
| Taux de protéines (%) | |
| S _Z | 60.64 \pm 0.18 |
| S _H | 55.16 \pm 0.42 |
| Teneurs en lipides (%) | |
| S _Z | 7 \pm 0.53 |
| S _H | 6.8 \pm 1.02 |
| Taux de cendres (%) | |
| S _Z | 8.27 \pm 1.5 |
| S _H | 6.70 \pm 0.4 |
| Teneur en glucides (%) | |
| S _Z | 18.78 \pm 2.01 |
| S _H | 16.25 \pm 0.3 |

S_Z : *Spirulina htam* cultivée sur milieu Zarrouk ;

S_H : *Spirulina htam* cultivée sur milieu Hiri.

Pour ce qui est du taux d'humidité de la poudre de spiruline, il est de l'ordre de 8.64 \pm 0.55% pour la spiruline cultivée sur milieu Zarrouk et 13.62 \pm 0.54% pour celle cultivée sur le milieu Hiri.

Ce taux semble bien conforme pour la spiruline cultivée sur Zarrouk (Sz). Par contre, la spiruline cultivée sur Hiri (Sh), présente un taux élevé par rapport à celui apporté par ESPIRARD, 2002 qui préconise pour les poudres un taux d'humidité allant de 4 à 6%. Cette forte teneur en eau peut être due à un séchage insuffisant, une poudre avec un tel taux d'humidité risque de s'agglomérer [361]. Aussi, la répercussion sur le stockage de la spiruline en poudre serait à considérer [362].

Les taux de protéines enregistrés sont de $60.64\% \pm 0.18$ pour la spiruline sur Zarrouk et $55.16\% \pm 0.42$ pour la spiruline en milieu Hiri. Ces teneurs semblent être proches de celles de la spiruline de Madagascar 59.3% [363].

Notons pour la même occasion que cette teneur dépasse toute les sources de protéines alimentaires connues : levure de bière (38.8%), lait écrémé en poudre (35.9%), viandes séchées salées (34.3%), graines de soja séchés (34.1%) [363].

Le soufre, apporté sous forme de dioxyde, SO_2 , est un constituant de trois acides aminés (cystine, méthionine et cystéine) et est nécessaire pour la synthèse de protéines, ceci pourrait expliquer, en partie, la teneur élevée en milieu Zarrouk [364].

Toutefois, nous avons relevé au cours de nos différentes expérimentations une variation du contenu en protéines de 10 à 15% selon le moment de la récolte par rapport à la photopériode, les valeurs les plus fortes étant obtenues au début de la période lumineuse [127 ; 16].

Pour ce qui est de la matière grasse, les résultats trouvés varient de 6.8 ± 1.02 et $8\% \pm 0.53$ pour la spiruline cultivée sur le milieu de culture Hiri et celle cultivée sur le milieu de culture Zarrouk respectivement. Ces teneurs se rapprochent de celles données dans la littérature et qui varient de 5.6 à 7% [124 ; 132 ; 134 ; 143].

Pour les cendres, notre spiruline cultivée sur le milieu de culture Zarrouk contient 8.27 ± 1.5 de cendres ; la spiruline cultivée sur le milieu de culture Hiri en contient 6.70

± 0.4 . Ces teneurs sont légèrement inférieures à celle de la spiruline de Madagascar : 9.8% [363].

Quant aux sucres, ils sont présents à $18.78\% \pm 2.01$ chez la spiruline cultivée sur le milieu de culture Zarrouk et à $16.25\% \pm 0.3$ chez la spiruline cultivée sur le milieu de culture Hiri.

Ces teneurs sont conformes à celles rapportées par la littérature et qui sont de l'ordre de 14 à 24% [363].

Il semblerait que la présence de magnésium dans le milieu de culture participe à la formation et la mise en réserve des sucres et des hydrates de carbonés.

6.4.2 Teneur en pytonutriments.

6.4.2.1 Teneur en pigments majeurs.

La spiruline contient des chlorophylles dont la chlorophylle *a*, des caroténoïdes et des phycobiliprotéines telles la phycocyanine. Les résultats des taux de ces pytonutriments dans la *Spirulina htam* issue du milieu Zarrouk et Hiri sont représentés dans le tableau 6.2.

Tableau 6.2. : Teneurs en pytonutriments de la *Spirulina htam* cultivée sur Zarrouk et sur Hiri.

| Composé | Caroténoïdes (% de la MS) | Chlorophylle-a (% de la MS) | C-Phycocyanine (% de la MS) |
|----------------------------|--------------------------------------|--|--|
| Spiruline (Zarrouk) | 0.84 ± 0.18 | 15.01 ± 0.71 | 102.15 ± 2.81 |
| Spiruline (Hiri) | 0.83 ± 0.33 | 9.82 ± 0.08 | 0.98 ± 0.25 |

D'après les données regroupées dans le tableau 6.2., nous remarquons que la spiruline cultivée sur milieu Zarrouk contient $0.84\% \pm 0.18$ de la matière sèche de

caroténoïdes totaux ; celle cultivée sur Hiri contient $0.83\% \pm 0.33$ de sa matière sèche soit 8.4 mg/g et 8.3 mg/g de matière sèche.

Ces résultats sont inférieurs à ceux donnés par O'REILLY, 2006 [120] pour *Spirulina platensis*. Elles dépassent les résultats de ABD EL BAKY, 2004 [265] de l'ordre de 7.32 mg/g de matière sèche. Cette différence pourrait être due à la différente composition des milieux de culture utilisés.

Pour ce qui est de la différence de la teneur en caroténoïdes totaux de la *S. htam* issue des deux milieux, elle pourrait être attribuée au fait qu'il existe une relation inverse entre le taux des caroténoïdes et la concentration en azote dans le milieu de culture [365].

Il semblerait que, la croissance de la *Spirulina htam* dans le milieu Zarrouk a été négativement associé avec une amélioration de la biosynthèse des caroténoïdes [365 ; 366]. En effet, la privation d'azote conduit à une accumulation des caroténoïdes : ce dernier auteur trouve que la plus faible teneur en caroténoïdes totaux (7.32 mg/g MS) a été trouvée dans la spiruline cultivée dans le milieu Zarrouk contenant 2.5 g/l de NaNO_3 : milieu que nous avons utilisé ; et que la valeur la plus élevée est observée sur la culture dans le milieu Zarrouk contenant 0.625 g/l de NaNO_3 .

Des travaux antérieurs [367 ; 368], ont rapporté la même constatation en attribuant ceci au fait que la division des cellules des algues cultivées sous azote, engendre un blocage pendant que la photosynthèse se poursuit, menant aux installations de stockage de composés spécifiques dont les caroténoïdes.

La biosynthèse de ces composés, n'a pas besoin d'azote ; en outre la synthèse des enzymes intervenant dans ce système semble être moins sensible que celles responsables de la synthèse des autres composés [369 ; 370].

La chlorophylle-a est présente à des taux élevés : $15.91\% \pm 0.28$ dans la spiruline cultivée sur le milieu de culture Zarrouk et $9.74\% \pm 0.17$ de celle sur le milieu Hiri, soit 159.1 mg/g de MS et 97.4 mg/g de MS de la spiruline cultivée sur milieux Zarrouk et Hiri respectivement.

Ces teneurs sont comparables à celles trouvées par ABD EL BAKY et *al.*, 2004 [365] de l'ordre de 25.6 à 128.7% trouvés sur la *Spirulina maxima* cultivée sur le milieu Hiri.

La différence de contenance dans la spiruline cultivée sur les deux milieux semble être principalement due à la teneur élevée en magnésium dans le milieu Zarrouk comparativement à celle du milieu Hiri. Cet élément intervient dans la composition de la chlorophylle [363].

La spiruline algérienne contient 102.15 ± 2.81 mg/g de matière sèche de la C-phycoyanine lorsqu'elle est cultivée sur le milieu de culture Zarrouk et $98.24 \text{ mg/g} \pm 0.25$ en matière sèche en culture sur milieu Hiri.

Nos résultats semblent être proches de ceux rapportés par la littérature de l'ordre de 106.4 mg/g de matière sèche [365].

Ainsi, il semblerait que le nitrate de sodium NaNO_3 est nécessaire pour la synthèse des acides aminés, qui composent les protéines et d'autres composants cellulaires comme les chlorophylles et La phycoyanine [368 ; 371].

L'intensité lumineuse, la souche ainsi que les conditions de culture semblent avoir un effet sur la teneur en ces pigments.

6.4.2.2 Teneur en polyphénols extractibles totaux.

La teneur de la spiruline, cultivée sur le milieu Zarrouk, en polyphénol extractibles totaux est de l'ordre de 166.74 mg éq AG/100 g de MS de poudre de spiruline.

Nos résultats semblent être largement supérieurs à ceux trouvés par colla et *al.*, 2007 [368] et qui varient de 2.45 à 4.9 $\mu\text{g/g}$.

A noter que la teneur de la spiruline en polyphénol, est influencée par la température.

6.5 Activité antioxydante.

Le profil de l'activité antioxydante obtenu est représenté par la figure 6.16.

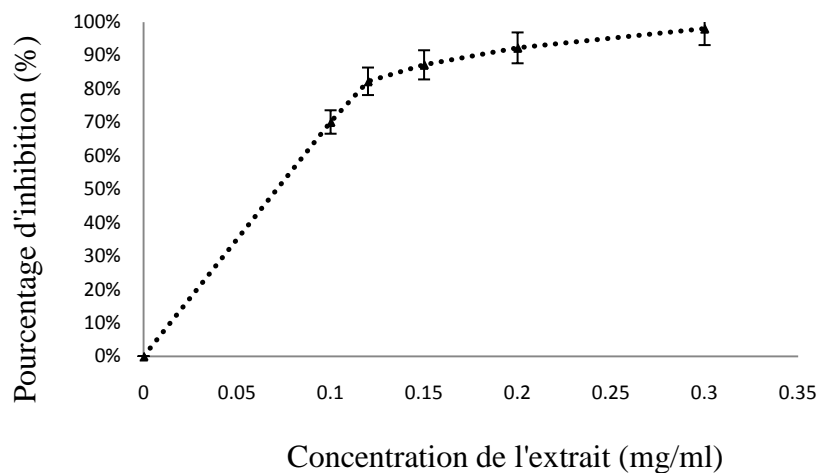


Figure 6.16. : Courbe du pouvoir antioxydant de la spiruline (extrait de spiruline).

La spiruline semble avoir une activité antioxydante. En effet, la courbe de cette activité biologique augmente graduellement, partant de la concentration de 0,1 mg/ml à la concentration 0,15 mg/ml. Cette phase exponentielle se termine en se stabilisant à la concentration de 0,2 mg/ml. Il s'agit du sommet de l'activité antioxydante.

En se référant à la courbe d'étalonnage du BHT (appendice I) ; Il en ressort une très forte activité antioxydante (96% : pouvoir anti-radicalaire, PAR).

Cette activité n'est pas liée seulement aux polyphénols mais plutôt à la présence dans la spiruline d'une multitude variée d'antioxydants dont le sélénium, le β -carotène, et le roi des antioxydants, la vitamine E.

6.6 Résultats de l'application industrielle.

Dans cette partie, nous avons procédé à un enrichissement du fromage frais par la spiruline pour évaluer d'un côté l'effet de la spiruline sur l'évolution de la flore lactique, d'autre part pour une amélioration de la qualité nutritionnelle du fromage frais.

6.6.1 Résultats des analyses des matières premières.

6.6.1.1 Résultats des analyses physico-chimiques du lait.

Le tableau 6.3. regroupe les résultats de la composition chimique du lait utilisé pour l'application fromagère qu'on a choisi.

Tableau 6.3. : Caractéristiques chimiques du lait de vache cru utilisé (valeur moyenne \pm écart type).

| Paramètre chimique | Valeur moyenne (g/l) \pm écart type |
|-------------------------------------|---|
| Extrait sec total (EST) | 127.2 \pm 0.95 |
| Matière grasse | 36.20 \pm 0.36 |
| Azote total | 37.31 \pm 0.2 |
| Azote non protéique | 4.37 \pm 0.63 |
| Protéines totales | 33.33 \pm 0.18 |
| Azote non protéique/azote total (%) | 11.71 \pm 1.77 |
| Protéines caséiniques | 26.68 \pm 0.48 |
| Caséine / azote total (%) | 71.51 \pm 0.93 |
| Protéines solubles | 6.26 \pm 0.36 |
| Cendres | 7.78 \pm 0.33 |
| pH | 6.51 \pm 0.006 |

Ces résultats montrent que le lait utilisé est riche en extrait sec total (EST) : 127.2 g/l \pm 0.95 ; tout en restant dans la marge de variation du taux de l'EST établie par l'agence française de normalisation (AFNOR) et allant de 120 à 130 g/l selon AFNOR. Seulement, ce taux est supérieur à celui mentionné par ABI AZAR, 2007 [372] de l'ordre de 98g/l.

La teneur en matière grasse (MG) : de l'ordre de 36.20 \pm 0.36 (g/l) est incluse dans l'intervalle des valeurs normalisées par AFNOR (34-40 g/l). Selon LUQUET, 1985, la teneur en MG du lait de vache est en moyenne de 39 g/l [373]. A noter que la matière grasse du lait est principalement sous forme globulaire à l'état d'émulsion [374].

La différence de composition observée, peut être due à plusieurs facteurs de variation tels le mode de conduite et l'alimentation des vaches. Selon Bocquier et Caja, 2001 [375], le niveau d'alimentation correspond au principal facteur agissant sur la composition du lait des rémunants.

L'analyse de la fraction azotée du lait montre que l'azote non protéique (ANP) représente $11.71\% \pm 1.77$ de l'azote total (AT) du lait. Ce dernier taux est nettement plus élevé que celui rapporté par Swaisgood, 1982 avec un taux de 5% [376] et celui par Remeuf, 1994 [377] égal à 9%. D'un autre coté, la fraction du ANP qu'on a trouvé ($4.37 \text{ g/l} \pm 0.63$) est très élevée que celle mentionnée dans la littérature de 1.5 à 1.6 g/l [378]. Cette différence est liée au système d'élevage. Ainsi, selon Grappin [379], l'urée constitue la majeure partie de l'ANP (33 à 79%) [380] et sa teneur varie considérablement en fonction de l'apport alimentaire. Les laits à teneurs élevées en ANP semblent avoir une teneur faible en protéines.

Dans notre lait, les protéines représentent 33.33 ± 0.18 : teneur très proche de celle notée par Walstra et Jenness, 1984 [381] de 33.0 g/l. Elle est proche de celle trouvée par Srairi et *al.*, 2005 [382] de 30.8 à 32.7 g/l.

La caséine représente la protéine dominante avec $80.06\% \pm 1.03$ du taux de l'azote protéique, valeur identique au résultat de Brule, 1997 [383] de 80% et proche des résultats donnés par Walstra et Jenness, 1984 de 79.5% [381]. L'indice de caséine (caséine%AT) qui est un facteur de référence analytique particulièrement représentatif de la valeur fromagère du lait, est de $71.51\% \pm 0.93$.

La teneur en cendres $7.78 \text{ g/l} \pm 0.33$ est légèrement faible en se référant aux données bibliographiques [384 ; 385].

La mesure du potentiel d'hydrogène (pH) indique une valeur moyenne de 6.51 unité pH ± 0.006 : conforme à la norme AFNOR, 1986 de 6.5 à 6.6.

Les données relatives à la composition de la fraction azotée, notamment le fort indice de caséine, suggèrent que notre lait possède, à *priori*, une bonne aptitude fromagère. C'est ce qu'on tente de vérifier dans la partie suivante, en prenant en considération,

l'enrichissement effectué pour déterminer ainsi, l'effet de la spiruline sur les aptitudes fromagère du lait de vache.

6.6.1.2 Résultats des analyses microbiologiques.

6.6.1.2.1 Résultats des analyses microbiologiques de la spiruline.

Les résultats des analyses microbiologiques (germes/g) de la spiruline montrent une absence totale des germes pathogènes. Cela s'explique du fait des conditions extrêmes de culture de la spiruline qui ne favorisent pas la prolifération de ces germes.

Par contre nous remarquons la présence de quelques germes mésophiles totaux qui restent heureusement dans les normes recommandées.

En se référant aux normes imposées en France (Arrêté du 21/12/1979) [16], notre spiruline possède une bonne qualité microbiologique.

6.6.1.2.2 Résultats des analyses microbiologiques du lait cru.

Sur le lait de vache cru, nous avons noté :

- Absence totale des germes fécaux ;
- Absence totale des germes pathogènes ;
- Les germes totaux, présents à $4 \cdot 10^4$ ($<10^5$) donc propre à la consommation ;
- Présence de coliformes totaux à 720 ($<10^3$).

Donc, on peut conclure que notre lait est aussi d'une bonne qualité microbiologique.

Nous avons aussi procédé à une recherche d'antibiotiques, le taux de contamination du lait par les antibiotiques s'est avéré nul (0%). Ceci nous rassure et nous évite la probable apparition de problèmes techniques lors de la transformation du lait, due à une inhibition de l'activité de la flore lactique [386].

6.6.2 Méthodologie de fabrication fromagère.

Le lait collecté est filtré par passage à travers une écumoire pour éliminer les particules étrangères présentes (mouche, poils etc.) puis pesé. Il est ensuite chauffé dans un bac à l'aide d'un bain marie. Le chauffage est accompagné d'une agitation jusqu'à l'obtention d'une température de 65°C. Puis le lait est refroidi dans un bain d'eau froide jusqu'à une température de 20 à 25°C. Il subit ensuite, une maturation à température ambiante (18 à 22°C) en présence de levains lactiques concentrés lyophilisés.

Les levains sont préalablement remis en culture dans du lait UHT à 28 à 30°C pendant 18 heures. Après une durée de maturation de 3 heures, correspondant à une baisse de pH du lait de 0,20 unités, l'emprésurage est effectué, à la même température. 17 à 25 heures après l'ajout de la présure, le caillé est découpé en petits cubes et brassé.

La mise en moules a lieu quelques minutes après le découpage. Lors de l'égouttage, après chaque retournement (2 au total), un salage à sec de la face supérieure à raison environ de 0,2 g/face/portion de fromage de 100g est réalisé.

Le démoulage a lieu après 32 heures d'égouttage, et il est immédiatement suivi de la pesée des produits (caillé et lactosérum).

Les pièces du fromage ainsi obtenues sont conservées dans une chambre froide (+4°C) en vue de leur commercialisation, après avoir été emballées dans l'étain. Le délai d'entreposage dans la chambre froide est au maximum d'une semaine.

Nous obtenant donc, trois échantillons de fromage. Le premier témoin (FE), le second enrichi lors de l'emprésurage (FEE), et le troisième enrichis en spiruline dans le caillé (FEC). Les lactosérums correspondants sont notés : LT ; LEE et LEC respectivement.

La figure 6.17, représente les principales étapes de la fabrication fromagère.

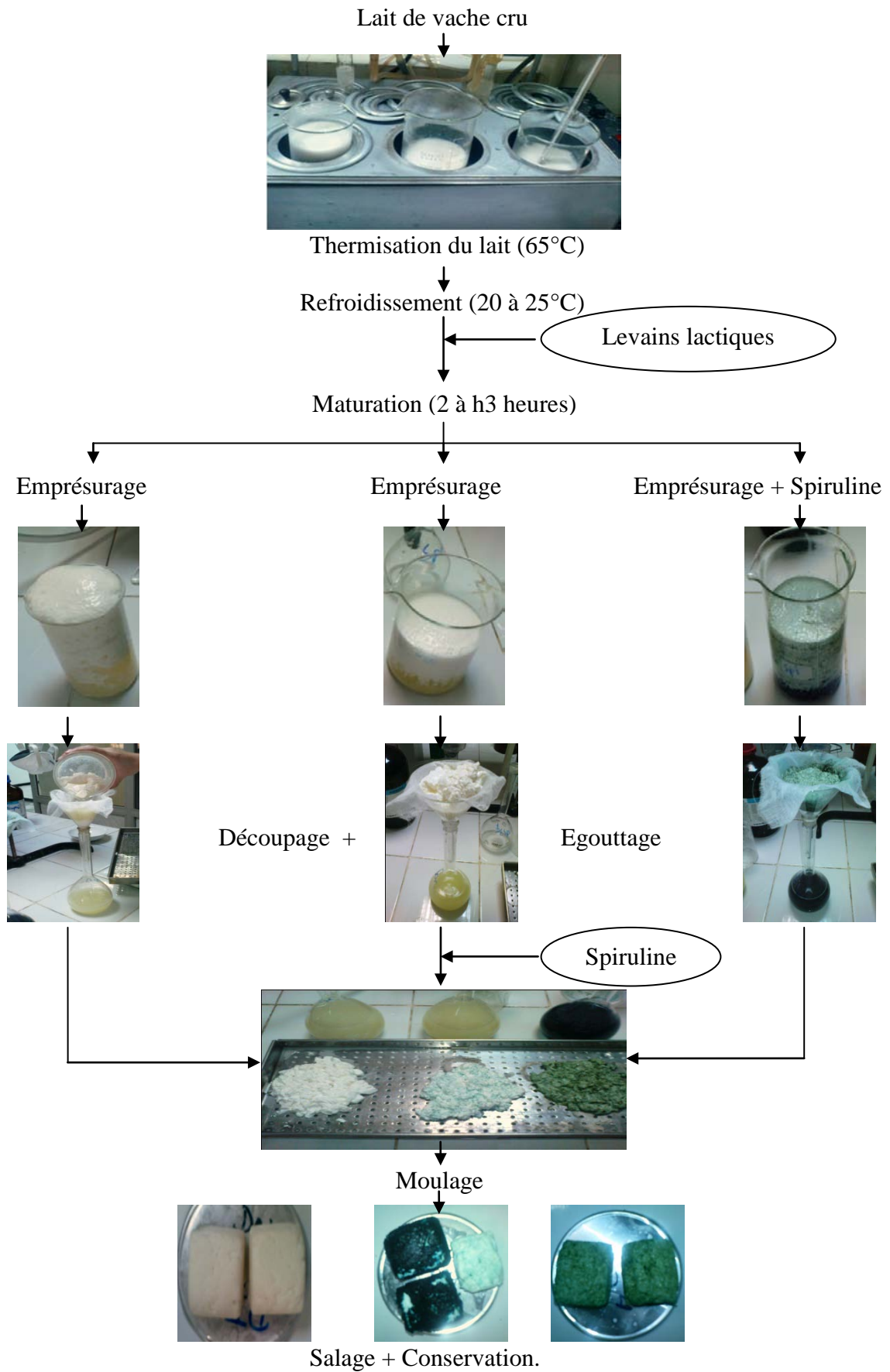


Figure 6.17: Schéma de la fabrication du fromage frais (originale, 2010).

6.6.3 Caractérisation des fabrications fromagères.

Les résultats des caractéristiques des différentes fabrications fromagères, auxquelles nous avons opté, sont regroupés dans le tableau 6.4.

Tableau 6.4. : Résultats de la caractérisation des différentes fabrications fromagères :
Caillé égoutté et lactosérum (moyenne \pm écart-type).

| | FT | FEE | FEC |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Composition du caillé | | | |
| Poids | 251.31 \pm 3.73 | 253.31 \pm 5.70 | 307.82 \pm 1.99 |
| Azote total (AT) | 33.70 \pm 1.77 | 33.46 \pm 1.40 | 38.32 \pm 0.75 |
| Protéines solubles (PS) | 1.76 \pm 0.26 | 2.83 \pm 0.29 | 2.78 \pm 0.28 |
| Matière grasse (MG) | 31.9 \pm 0.35 | 32.37 \pm 1.90 | 32.13 \pm 1.88 |
| Matière sèche (MS) | 65.18 \pm 2.66 | 67.63 \pm 1.61 | 74.71 \pm 0.61 |
| Extrait sec dégraissé (ESD) | 33.29 \pm 2.90 | 35.26 \pm 1.92 | 42.58 \pm 2.12 |
| Gras / sec (G/S) | 49 \pm 2.42 | 47.86 \pm 2.57 | 43.62 \pm 2.62 |
| Potentiel d'hydrogène (pH) | 5.00 \pm 0.01 | 4.88 \pm 0.01 | 4.86 \pm 0.01 |
| Composition du lactosérum | | | |
| Poids | 692.01 \pm 2.73 | 713.17 \pm 5.29 | 690.71 \pm 2.84 |

| | | | |
|---|------------------|------------------|-------------------|
| AT | 7.51 ± 0.45 | 17.5 ± 0.28 | 7.63 ± 0.46 |
| PS | 6.6 ± 0.38 | 14.74 ± 0.26 | 6.78 ± 0.65 |
| Cendres | 5.14 ± 0.22 | 6.37 ± 1.19 | 5.24 ± 0.21 |
| MG | 0.55 ± 0.05 | 0.72 ± 0.08 | 0.55 ± 0.05 |
| MS | 35.92 ± 0.8 | 53.77 ± 1.36 | 36.39 ± 0.53 |
| ESD | 35.37 ± 0.76 | 53.05 ± 1.42 | 35.37 ± 0.55 |
| Bilans : Entrées-Sorties (%) | | | |
| MB | 5.66 ± 0.64 | 3.82 ± 0.62 | 0.64 ± 0.19 |
| Pourcentage de récupération dans le caillé | | | |
| R _f | 25.13 ± 0.37 | 25.21 ± 0.56 | 30.63 ± 0.20 |
| AZ | 90.33 ± 4.60 | 89.66 ± 3.49 | 102.72 ± 2.45 |
| MG | 88.13 ± 0.85 | 89.43 ± 5.45 | 88.77 ± 5.21 |
| ESD | 38.04 ± 3.23 | 39.05 ± 2.41 | 47.13 ± 2.27 |

Le tableau 6.4 exprime les données sur les caractéristiques des fabrications fromagères. Le poids moyen des caillés, issus des trois fabrications, rapporté à 1 kg du lait présente une différence en faveur de la fabrication enrichie dans le caillé (56.51 soit 18.36%) conséquence de l'ajout de la spiruline qui entraîne en outre que la participation de son poids, à l'augmentation de la récupération des composés secs. Ce résultat se répercute en sens inverse sur les poids des lactosérums émanant des différentes

fabrications. Ce poids rapporté à 1 kg de lait est plus élevé pour la fabrication enrichie lors de l'emprésurage (22.46 g/kg soit plus de 3.15%). Cette différence est due au fait que la spiruline a augmenté l'expulsion du lactosérum.

Pour la fabrication témoin et celle enrichie dans le caillé, les teneurs en azote total et en azote soluble, sont probablement dus à l'indice de caséines du lait : $26.68\% \pm 0.48$. Ces teneurs sont élevées dans le lactosérum de la fabrication enrichie lors de l'emprésurage.

La teneur en matière sèche des fromages mesurée au démoulage tend à augmenter avec le niveau de la teneur en protéines. Si l'effet négatif de la teneur en matières grasses sur la synérèse est bien établi [387 ; 391], l'influence des protéines ou des caséines a été moins étudiée : Marshall, 1982 [387] et Storry *et al.*, 1983 [388] notent un ralentissement de la synérèse, avec l'augmentation de la teneur en composants colloïdaux ou en caséines.

En effet, la composition du caillé et du lactosérum est directement influencée par celle du lait [392]. Selon Fox [393], la composition chimique du lait, plus particulièrement les concentrations en caséines, matière grasse, calcium et pH ont une influence majeure sur plusieurs aspects de la production fromagère, spécialement l'aptitude à la coagulation par la présure, la fermeté du gel, l'aptitude à la synérèse et, par-là, la composition du fromage et le rendement fromager.

La teneur en ESD des caillés varie entre 33.29 ± 2.90 pour la fabrication témoin à 42.58 ± 2.12 pour le caillé enrichie dans sa masse. Ceci confirme l'effet de la MG sur l'EST du caillé. Malgré ces différences, le rapport Gras/Sec (G/S) des caillés ne présente pas de différence significative entre les différentes fabrications.

Les bilans "Entrée - Sortie" de la matière brute, indique que les pertes sont plus élevées dans la fabrication témoin que les autres fabrications. Cela est attribué à l'ajout de la spiruline.

La teneur en caséines est de $26,68 \pm 0,48$ g/kg pour le lait. A cette valeur correspondent déjà, des rendements fromagers frais qui sont de : 25.13 ; 25.21 et 30.63 %.

Ces valeurs sont proches de celle rapportée par Guerzoni *et al.* [394] : 20,3% qui est enregistrée sur du lait de chèvre.

Le rendement fromager plus élevé pour la fabrication enrichie dans le caillé est lié à l'addition de la spiruline dans sa masse : donc pas de perte en masse de cette dernière.

L'influence de la teneur en protéines du lait sur le rendement fromager a été mise en évidence par Portman *et al.* [395] et Ricordeau et Mocquot [396] qui ont observé que la teneur en caséines conditionne le rendement fromager. Selon Maubois et Mocquot [397], ce rendement est conditionné à la fois par la teneur en protéines et en matière grasse, et ceci plus particulièrement pour les fromages frais. Selon Gilles et Lawrence [398], la concentration en caséines influence le rendement fromager.

Les rendements fromagers ajustés et secs : figures 6.18 et 6.19, sont respectivement de $25.14\% \pm 2.51$ et $16.39\% \pm 0.82$ pour la fabrication témoin ; et $25.13\% \pm 3.36$ et $17.05\% \pm 0.79$ pour la fabrication enrichie lors de l'emprésurage et pour la fabrication enrichie dans la masse du caillé : 30.62 ± 0.59 et $22.88\% \pm 0.8$.

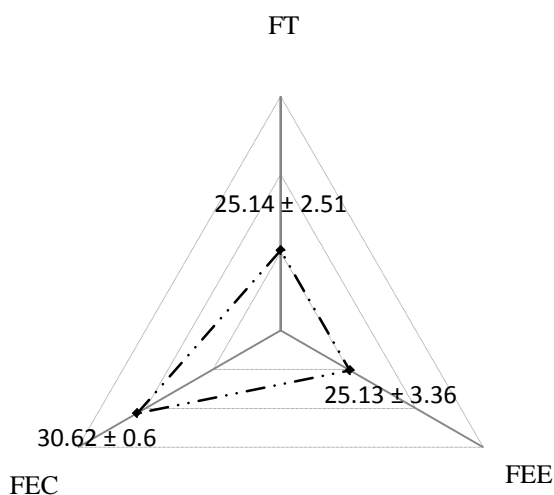


Figure 6.18 : Radar représentatif des rendements ajustés des fabrications fromagères. FT : Fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l'emprésurage ; FEC : fabrication enrichie dans le caillé.

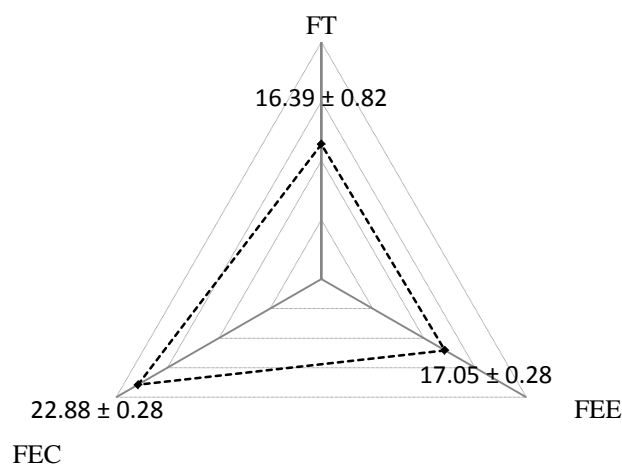


Figure 6.19 : Radar représentatif des rendements secs des fabrications fromagères. FT : Fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l'emprésurage ; FEC : fabrication enrichie dans le caillé.

Selon Colin *et al.* [399], ces rendements augmentent significativement avec l'augmentation du niveau de protéines dans le lait. Nos résultats confirment cette observation : les teneurs en protéines du lait est de l'ordre de 33.33 ± 0.18 g/kg. Nos différentes fabrications, présentent, en effet, des rendements très proches : les valeurs élevées de ces rendements dans la fabrication enrichie dans le caillé, semblent être dues à la quantité de spiruline ajoutée.

D'après Remeuf *et al.* [377], le coefficient de récupération de la matière sèche semble plus particulièrement influencé par les paramètres qui conditionnent l'aptitude à la coagulation par la présure, à savoir la teneur en caséines, les proportions de caséines α S, le degré de minéralisation calcique des micelles et leur diamètre moyen.

Evolution du pH durant le stockage du fromage frais.

Les résultats de l'évolution des valeurs du pH des différentes fabrications de fromage frais au cours du stockage sont résumés dans le tableau 6.5.

Tableau 6.5. : Variation du pH des différentes fabrications fromagères.

| | Temps | FT | FEE | FEC |
|-----------|--|-------------|-------------|-------------|
| T0 | Lait cru | 6.51 ± 0.02 | 6.51 ± 0.02 | 6.51 ± 0.02 |
| T1 | Lait encemensé par bactérie lactiques | 6.48 ± 0.03 | 6.48 ± 0.03 | 6.48 ± 0.03 |
| T2 | Caillé égoutté (T0+30h) | 5.00 ± 0.01 | 4.88 ± 0.01 | 4.86 ± 0.01 |
| T3 | (T0+78h) | 4.89 ± 0.02 | 4.79 ± 0.01 | 4.73 ± 0.03 |
| T4 | (T0+126h) | 4.66 ± 0.01 | 4.63 ± 0.02 | 4.58 ± 0.02 |
| T5 | (T0+174) | 4.49 ± 0.02 | 4.43 ± 0.02 | 4.40 ± 0.01 |
| T6 | (T0+222h) | 4.38 ± 0.01 | 4.35 ± 0.01 | 4.32 ± 0.02 |

Ce tableau permet de comprendre l'effet de la spiruline sur la variation du pH des différentes fabrications fromagères réalisées. Une diminution progressive du pH avec une légère différence entre les différentes formules a été observée.

La formulation témoin débute avec un pH (dans le caillé égoutté) de l'ordre de 5.00 ± 0.01 Unités pH pour atteindre le septième jour une valeur de 4.38 ± 0.01 . La formulation enrichie par la spiruline lors de l'emprésurage montre une diminution de 4.88 ± 0.01 à 4.35 ± 0.01 alors que celle enrichie dans le caillé subie une régression de 4.86 ± 0.01 à 4.32 ± 0.02 .

Nous avons constaté alors que plus la spiruline est présente dans le caillé, plus le pH a tendance à diminuer plus rapidement.

6.6.4 Détermination de la vitesse d'acidification.

Tableau 6.6. Vitesse d'acidification des différents fromages.

| Fabrication | FT | FEE | FEC |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| Variation du pH (ΔpH) | 2.1 ± 0.02 | 2.13 ± 0.02 | 2.16 ± 0.02 |
| Vitesse d'acidification (Unité pH/h) | $9.46 \cdot 10^{-3}$ | $9.60 \cdot 10^{-3}$ | $9.73 \cdot 10^{-3}$ |

On note que la fabrication fromagère enrichie dans le caillé présente la plus grande vitesse d'acidification (tableau 6.6) avec une vitesse de $9.73 \cdot 10^{-3}$ unité pH/h. suivie par celle enrichie lors de l'emprésurage égale à $9.60 \cdot 10^{-3}$ unité pH/h et enfin la fabrication témoin avec une vitesse d'acidification de $9.46 \cdot 10^{-3}$ unité pH/h.

Nos valeurs semble être supérieures à celles trouvées par [400] de l'ordre de 0,015 Unités pH/jour pour un yaourt enrichi dans sa mase avec la même quantité de spiruline.

On conclue, que la spiruline accélère l'acidification du fromage frais et donc augmente le rendement.

Selon Guiraud [357], le pH est inversement proportionnel à l'acidité. L'acide lactique est produit à partir de lactose, ce qui abaisse légèrement le pH. Pour mieux interpréter cette variation de l'évolution du pH, le suivie de la flore lactique semble avoir une importance.

6.6.5 Résultats des analyses microbiologiques des fromages frais.

6.6.5.1 Evolution de la flore lactique.

Les résultats de l'évolution des bactéries lactiques dans le temps : partant du caillé égoutté (30h après la démarche de fabrication) allant au dernier jour de la date limite de consommation, sont représentés dans la figure 6.20 pour le *Streptococcus thermophilus* et la figure 6.21 pour le *Lactobacillus bulgaricus*. La croissance est exprimée en Log UFC/ml.

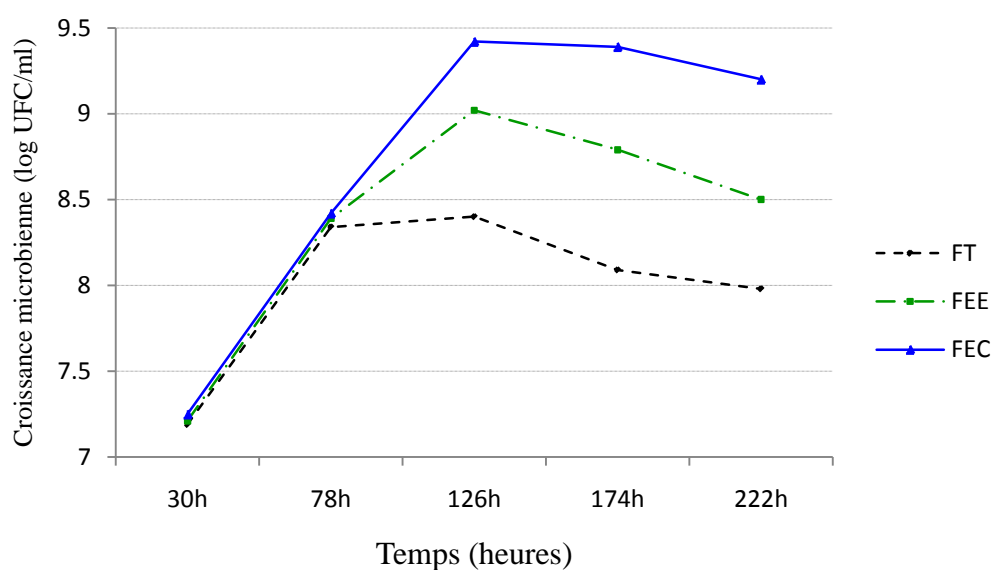


Figure 6.20 : Evolution de la croissance de *Streptococcus thermophilus* dans les différentes fabrications fromagère en fonction du temps. FT : fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l’empresurage ; FEC : Fabrication enrichie dans le caillé.

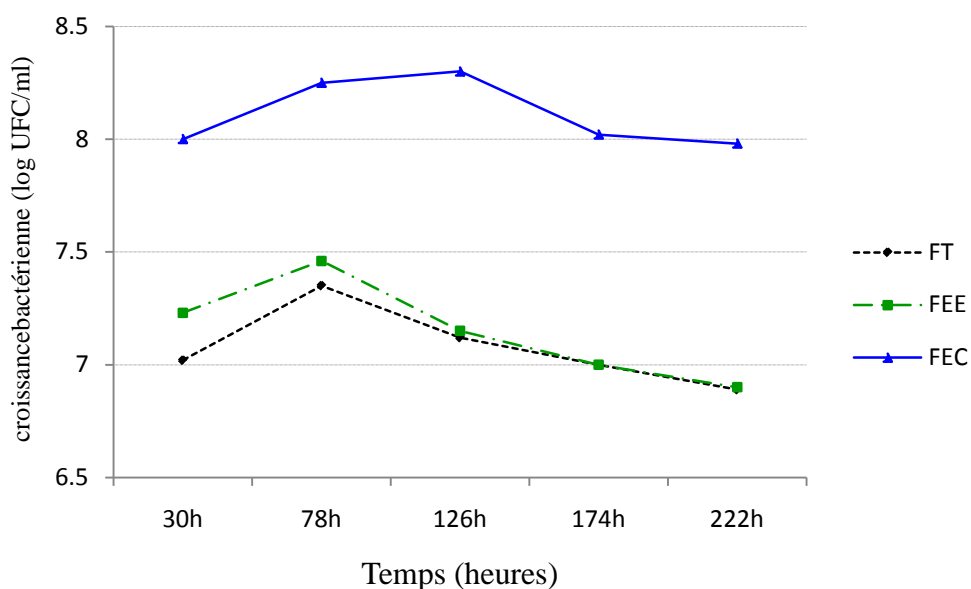


Figure 6.21 : Evolution de la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans les différentes fabrications fromagère en fonction du temps. FT : fabrication témoin ; FEE : Fabrication enrichie lors de l’empresurage ; FEC : Fabrication enrichie dans le caillé.

Il ressort de ces deux figures que le *Streptococcus thermophilus* est majoritaire que le *Lactobacillus bulgaricus*, un maximal de $2630 \cdot 10^6$ UFC/ml contre $190 \cdot 10^6$ UFC/ml enregistré pour les deux espèces respectivement, et cela tout au long du suivie. Il est à mentionner que le rapport, entre ces deux espèces bactériennes présentes, influe sur la cinétique de fabrication, ce qui est confirmé par nos essais.

La spiruline semble avoir un effet stimulant de la croissance de ces deux bactéries. En effet, le *S. thermophilus*, débute par des taux voisins : $15.5 \cdot 10^6$, $16.2 \cdot 10^6$ et $17.8 \cdot 10^6$ UFC/ml correspondent aux fabrications témoin, enrichie lors de l'emprésurage et dans le caillé respectivement; la différence devient significative à partir de 78h de la fabrication ; cette croissance atteint $251.1 \cdot 10^6$, $1040 \cdot 10^6$ et $2630 \cdot 10^6$ pour la fabrication témoin ; enrichie lors de l'emprésurage et enrichie dans le caillé respectivement. Une régression de la croissance s'observe après 174 heures.

Ainsi, le *L. bulgaricus*, dans le caillé égoutté (30h après la fabrication), est présent à $100 \cdot 10^6$ UFC/ml pour le caillé enrichie dans sa masse en spiruline alors que la fabrication enrichie lors de l'emprésurage et celle témoin, présentent respectivement $17.0 \cdot 10^6$ UFC/ml et $10.5 \cdot 10^6$ UFC/ml. Le seuil de sa croissance s'observe entre 72 et 126 heures, suivie du déclin de la croissance.

L'évolution des ferments lactiques présentent l'allure d'une courbe de Gauss. Après une éventuelle croissance, passant par une phase exponentielle ; un déclin net s'observe. Régression due à la température d'entreposage qui empêche la multiplication bactérienne.

L'effet de la spiruline sur la prolifération des bactéries lactiques explique le fait le caillé issue de la fabrication enrichie lors de l'emprésurage présente un caillé plus ferme ; les caillés des deux autres fabrications, sont issues par voie enzymatique plus que acidifiante, les liaisons de caséines causent donc des contractions du gel, ce qui entraine l'expulsion du lactosérum. Ce type de caillé se prête donc facilement au découpage et l'égouttage.

A l'issue des analyses microbiologiques réalisées sur les différentes fabrications de fromage frais, on constate :

- Une absence totale des germes indicateurs de contamination fécale (coliformes totaux et fécaux,) indiquant les conditions hygiéniques rigoureuses lors de la fabrication ;
- Une absence totale des germes pathogènes (*Clostridium* sulfito-réducteur, *Salmonelles*, *Staphylococcus aureus*) ce qui montre que le processus et les conditions de fabrications sont bien maîtrisés et que la matière première utilisée est de bonne qualité hygiénique, selon Bourgeois [401], à un tel pH bas (<4,5 U pH) ces germes ne peuvent pas se développer.

CONCLUSION

Les essais de culture de la *Spirulina htam* réalisés, sur quatre milieux de culture, ont montré une bonne adaptation de cette dernière aux milieux Hiri et Zarrouk.

En effet, nous avons obtenu au 21^{ème} jour de culture, une biomasse de $4.77 \cdot 10^6$ cellules/ml dans le milieu Hiri et $3.77 \cdot 10^6$ cellules/ml pour le milieu Zarrouk. Cela peut être due au fait que la souche initiale menée de Tamanrasset était cultivée sur milieu Hiri, donc il lui fallait un certain temps pour une meilleure adaptation sur le milieu Zarrouk.

Les conditions ambiantes de culture semblent un peu exceptionnelles. Du point de vue température de culture, il semblerait que *Spirulina htam* préfère des températures plus basses que celles préconisées par Fox [15] soit de l'ordre de 37°C. Nous avons quantifié une biomasse de 5.9g/l et 6g/l à 28 et 32°C respectivement.

A 36°C., la biomasse est de 4.5g/l au-delà la production de biomasse serait inversement proportionnelle à l'augmentation de la température.

L'optimum du potentiel d'hydrogène, paramètre très important pour la bonne conduite de la culture, varie entre 9 et 10 unités pH : donnant une biomasse respective de 7.5 et 8 g/l. La croissance bactérienne diminue lorsque le milieu devient moins alcalin selon nos résultats.

Une agitation en continu et à faible débit semble avoir un meilleur effet sur la croissance de la spiruline, qu'une agitation manuelle en discontinu.

La spiruline algérienne, possède les principales caractéristiques biochimiques des autres souches de spiruline. Il s'agit à la fois d'aliment énergétique grâce à sa teneur minimale en glucides $16.25\% \pm 0.3$ et en matières grasses $6.8\% \pm 1.02$; mais aussi constructeur grâce à sa teneur en protéines 55 à 61% et protecteur : 8.3 à 8.4 mg/g de matière sèche de caroténoïdes; 97.4 à 159.1mg/g en matière sèche de chlorophylle-a ; et une très importante activité antioxydante : pouvoir inhibiteur important qui semble être lié principalement à la grande teneur en vitamine E, le sélénium, la phycocyanine et les caroténoïdes.

La différence entre la *htam* cultivée sur le milieu de culture Hiri et celle cultivée sur le milieu Zarrouk est principalement liée au taux d'humidité. Pour les pytonutriments, la richesse du milieu Zarrouk semble être efficace sur certains métabolismes engendrant une accélération et augmentation des activités biologiques.

Du fait des diverses vertus nutritionnelles et thérapeutiques de la spiruline, un enrichissement du fromage frais a été réalisé du fait de la possibilité de son administration aux enfants algériens en bas âge ayant un problème de vision crépusculaire.

La richesse de la spiruline en précurseurs de la vitamine A ainsi que ses autres caractéristiques bromatologiques et thérapeutiques justifient l'application considérée.

La spiruline semble diminuer la capacité de rétention d'eau du caillé lorsqu'elle est ajoutée lors de l'emprésurage.

Aussi, si l'ensemencement en spiruline se fait dans le caillé directement, le rendement fromager augmente ainsi que la qualité nutritionnelle du produit fini. En outre, la spiruline semble aussi avoir un effet positif sur la croissance de la flore lactique du fromage.

Notre présent travail nous a permis de mieux connaître la *Spirulina htam*, de maîtriser ses conditions de culture : milieux de culture et conditions opérationnelles de culture ; d'optimiser le mode de séchage de la spiruline ; de faire une partie de sa caractérisation nutritionnelle mais aussi de l'appliquer en technologie fromagère et de signaler son effet sur la flore lactique du fromage frais.

Notre travail engendre d'autres investigations pourraient être engagées, entre autres :

- Une éventuelle amélioration du milieu proposé, voire d'autres milieux à base d'eau de mer ;
- Des études de la biodisponibilité des micronutriments de la spiruline ;
- Des essais d'introduction de la spiruline dans le régime alimentaire algérien.

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

AC : Azote caséinique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANC : Azote non caséinique

ANP : Azote non protéique

ARDA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARN : Acide ribonucléique

AT : Azote total

ATP : Adénosine triphosphate

BHT : Butyl hydroxytoluène

Ca⁺⁺ : Calcuim

Cl⁻ : Chlore

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

cm : Centimètre

CO₂ : Dioxyde de carbone

DPPH : DiPhényl Picryl-Hydrazyl

EDTA : Acide éthylène diamino tétracétique

EPR : Efficacité protéique

EPS : Exo-polysaccharides

ESD : Extrait sec dégraissé

EST : Extrait sec total

g : Gramme

GLA : Gamma-linoleic acid

h : Heure

HIV : Human immunity deficiency virus

ISO : International organisation for standardisation

K⁺ : Potassium

K₂HPO₄ : Phosphate dipotassique

Kg : Kilogramme

L : Litre

Log : Logarithme décimal

m² : Mètre carré

m³ : Mètre cube

MG : Matière grasse

Mg⁺ : Magnésium

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

mm : Millimètre

MS : Matière sèche

NA : Norme Algérienne

Na⁺ : Sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium

Na₃PO₄ : Phosphate trisodique

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NaHCO₃ : Bicarbonate de Sodium

NF : Norme Française

NH₄H₂PO₄ : Phosphate mono-ammonique

nm : Nanomètre

NNC : Azote non caséinique

NNP : Azote non protéique

NPU : Net proteic use

NT : Azote total

P : Phosphore

pH : Potentiel hydrique

PHB : Polyhydroxybutyrates

ppm : Partie par million

PS I : Photosystème I

PS II : Photosystème II

PS : Protéines soluble

SO₄ : Oxyde de soufre

SQDG : sulfoquinovosyl-diacyl-glycerol

TSE: tryptone-sel-eau

U.F.C. : Unité formant colonie

U.I : Unité internationale

UHT : Ultra haute température

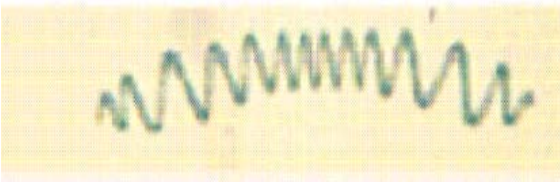
UV : Ultra-Violet

APPENDICE A

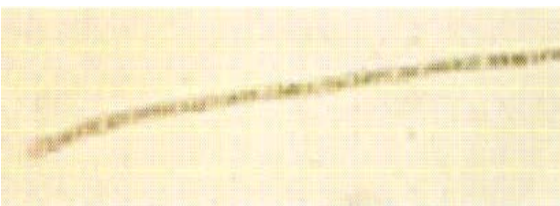
Photographies représentant différentes souches de spirulines



Forme ondulée



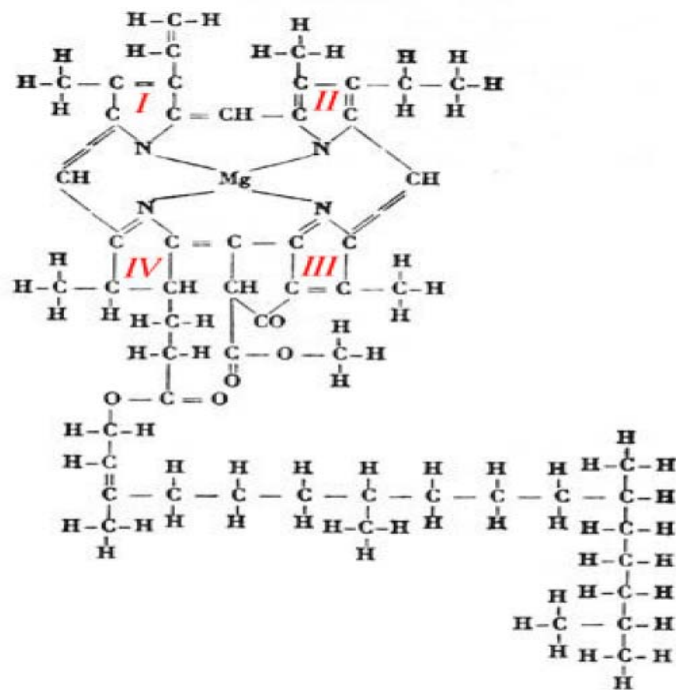
Forme spiralée type « Lonar »



Forme droite type « M2 »

APPENDICE B

Voici la formule développée de la chlorophylle :



<http://www.ordicole.com/biol/photosynthese.pdf>

<http://www.ordicole.com/biol/botanique.html>

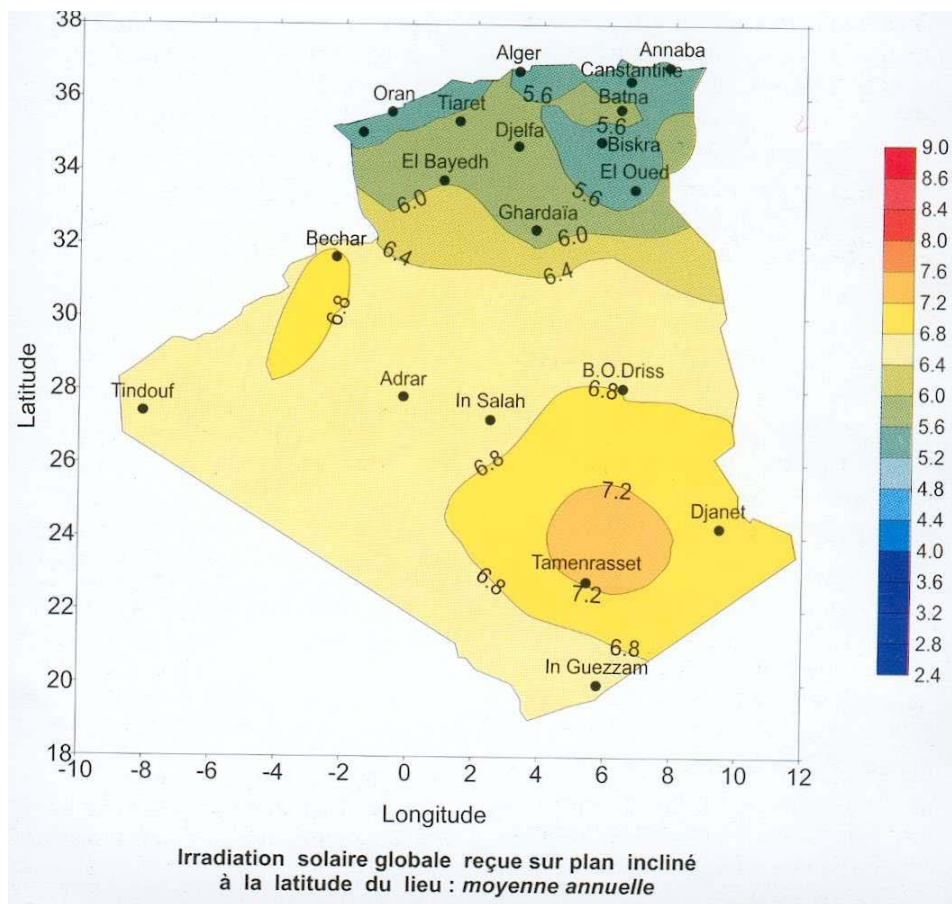
APPENDICE C

Tableau 01 : Sites géographiques où pousse naturellement la spiruline [15]

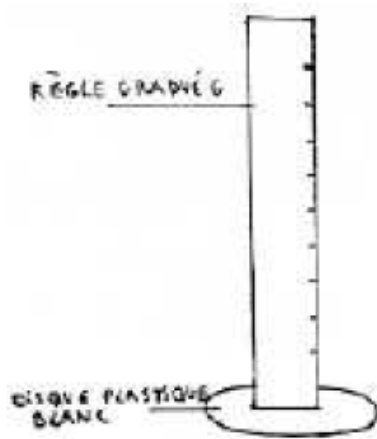
| Noms des pays | Localisations précises |
|---------------|---|
| | AFRIQUE |
| Algérie | Tamanrasset |
| Tchad | Région du Kanem : lacs Latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom, Ounianga kebir |
| Soudan | Cratère de Djebel Marra |
| Djibouti | Lac Abber |
| Ethiopie | Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe |
| Congo | Mougounga |
| Kenya | Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron |
| Tanzanie | Lac Natron |
| Tunisie | Lac Tunis; Chott el Jerid |
| Zambie | Lac Bangweoulou |
| Madagascar | Beaucoup de petits lacs près de Toliara |

| | |
|------------------------|---|
| | ASIE |
| Inde | Lacs Lonar et Nagpur, réservoir près de Madurai |
| Myanmar | Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank |
| Sri Lanka | Lac Beira |
| Pakistan | Mares près de Lahore |
| Thaïlande | Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de Radburi, 80 km au Sud-Ouest de Bangkok |
| Azerbaïdjan | |
| | AMERIQUE DU SUD |
| Pérou | Réservoir d'eau près de Paracas Près de l'île d'Amantani dans le lac Titicaca |
| Mexique | Lac Texcoco ; Lac Cratère |
| Uruguay | Montevideo |
| Equateur | Lac volcanique Quilotoa : cratère de 1km de diamètre |
| | AMERIQUE DU NORD |
| Californie | Oakland ; Del Mar Beach |
| Haïti | Lac Gonâve |
| République Dominicaine | Lac Enriquillo |
| | EUROPE |
| Hongrie | |
| France | Camargue |

APPENDICE D



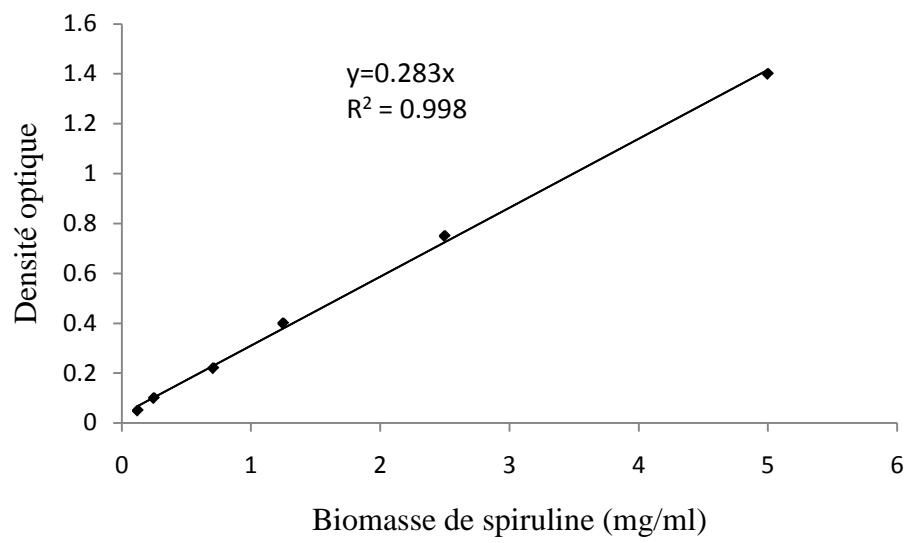
APPENDICE E



Le disque de Secchi est un instrument constitué d'une baguette mesurant 30 cm de long, graduée en centimètres. A son extrémité est fixé un disque blanc de diamètre compris entre 30 et 40 mm.

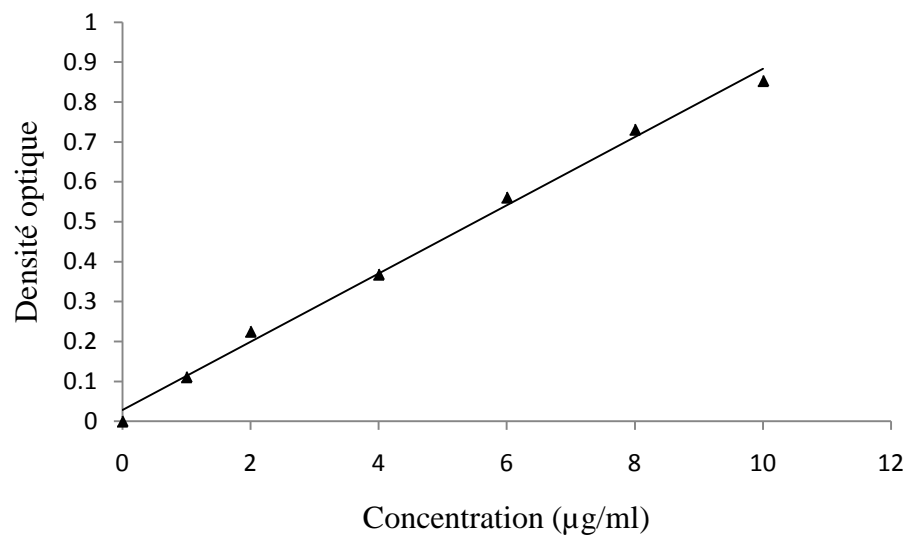
Représentation d'un disque de Secchi.

APPENDICE F



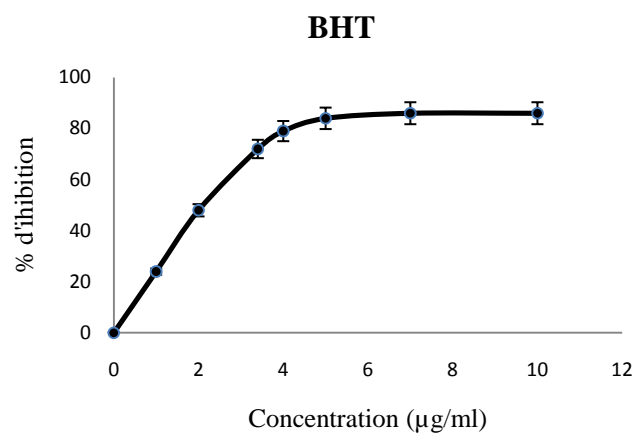
Courbe d'étalonnage de la concentration de spiruline en fonction de la densité optique.

APPENDICE G



Courbe d'étalonnage du glucose.

APPENDICE I



Courbe d'étalonnage du BHT.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Parikh, P., Mani, U. et Iyer, U., “Role of *Spirulina* in the control of *glycemia* and *lipidemia* in type 2 diabetes mellitus”, *Journal of Medicinal Food*, V. 4, n°4, (2001), 193-199.
- [2] Ramirez, D., Gonzalez, R., Merino, N., Rodriguez, S. et Ancheta, O., “Inhibitory effects of *Spirulina* in zymosan-induced arthritis in mice. Mediators of Inflammation”, n°11, (2002), 75-79.
- [3] Kalafati, M., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Sakellariou, G. K., Koutedakis, Y. et Kouretas, D., “Ergogenic and antioxidant effects of *spirulina* supplementation in humans”, *Med Sci Sports Exerc.*, V. 42, n°1, (January, 2010), 142-151.
- [4] Khan, M., Shobha, J-C., Mohan, I-K., Rao Naidu, M-U., Prayag, A. and Kutala, V-K., “*Spirulina* attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats”, *J. Appl. Toxicol.*, V. 26, n°5, (2006), 444–451.
- [5] Wu, L-c. and Ho, J-a A., “Antioxoydative and Hepatoprotective Effects of *Spirulina* Γ” Gershwin & Belay (ed.), *Spirulina in Human Nutrition and Health*, (2007), 119-151.
- [6] Schwartz, J., Shklar, G., Reid, S. and Trickler, D., “Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliela algae*”, *Nutr. Cancer*, V. 11, (1988), 127-134.
- [7] Andréani, G., “Spiruline: système sanguine, système immunitaire et cancer”, *Phytothérapie*, n° 4, (2005), 158-161.

- [8] Man, L., “Complementary and alternative medicine for allergic rhinitis”, *Curr Opin Otolaryngol Neck Surg.*, n°17, (2009), 226–231.
- [9] Mahesh, S., Babu, M., Gopaldaswamy, G. and Chandramohan, N., “Identification of an antiviral principle in *Spirulina platensis* against *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) *Indian Journal of Biotechnology*, V. 4, (July, 2005), 384-388.
- [10] Moorhead, K., Capelli, B. et Cysewski, G. R., “*Spirulina* nature’s superfood”, 2^{ème} edition: Cyanotech Corporation, (2006), 66 p.
- [11] Léonard, J. et Compère, P., “*Spirulina platensis* (Gom.) Geitler, algue bleue de grande valeur alimentaire par sa richesse en protéines”, *Bull. Jard. bot. Nat. Belg.*, V. 37, n°1, (1967), Suppl.23.
- [12] Marty, F. and Busson, F., “Données cytologiques et systématiques sur *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. et *Spirulina Geitleri* J.De Toni (Cyanophyceae-Oscillatoriaceae)”, *C.R. Acad. Sc. Paris*, (1970), 270- 786.
- [13] Clément, G., “Une nouvelle algue alimentaire: la *Spirulina*”, *Rev. Inst. Pasteur*, V. 4, (1971), 103 p.
- [14] C.R.B.M., “Étude d’opportunité des biotechnologies marines sur la production et l’utilisation des microalgues”, A. Guillou, (2006). 292 p.
- [15] Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Belay, A. et Wilmotte, A., “*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 Microbiol. Lett.*, V. 172, n°2, (1999), 213-222.
- [16] Fox, D., “Spiruline : technique pratique et promesse”, Aix en Provence: Edi. sud, (1999), 246 p.
- [17] Rich, F., “Notes on *Arthrospira platensis*”, *Rev. Algol.*, V. 6, (1931), 75 p.

- [18] Rich, F., "Scientific results of the Cambridge expedition to the East African Lakes (1930–1–7): the algae", *J. Limnol. Soc. Zool.*, V. 38, (1933), 249 p.
- [19] Jourdan, J-P., "Cultivez votre spiruline, Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline", (2006), 143 p.
- [20] Iltis, A., "Phytoplancton des eaux natronées du Kanem (Tchad), IV, Note sur les espèces du genre *Oscillatoria*, sous-genre *Spirulina* (Cyanophyta)", *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Hydrobiol.*, V. 4, (1970), 129 p.
- [21] Iltis, A., "Note sur *Oscillatoria* (sous-genre *Spirulina*) *platensis* (Nordst.) Bourrelly (Cyanophyta) au Tchad, *Cah. O.R.S.T.O.M.*", *sér. Hydrobiol.*, V. 5, (1971), 53 p.
- [22] Iltis, A., "Ecologie de *Spirulina platensis* dans les milieux natronés d'Afrique sahélienne", In Materassi, R. (Ed.) *Prospettive della Coltura di Spirulina in Italia*, Roma: CNR, (1980), 41 p.
- [23] Clément, G., "Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*", *Ann. Nutr. Aliment*, V. 29, (1975), 477-487.
- [24] Durand-Chastel, H., "Production and use of *Spirulina* in Mexico", In Shelef, G. et Soeder, C.J. (Eds), *Algae Biomass*, Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, (1980), 39 p.
- [25] Guérin-Dumartrait, E. et Moyse, A., "Caractéristiques biologiques des Spirulines", *Ann. Nutr. Alim.*, V. 30, (1976), 489 p.
- [26] Halidou Doudou, M., Degbey, H., Daouda, H., Leveque, A., Donnen, P. et Hennart, P., " Supplémentation en spiruline dans le cadre de la réhabilitation nutritionnelle : revue systématique", *Rev. Epidemiol. Sante Publ.*, V. 56, (2008), 425–31.
- [27] Charpy, L., Langlade, M-J., Vicente, N. et Riva, A., "International Symposium on cyanobacteria for Health", Science and Development, CICSSD, (2004), 192 p, Site web: <http://www.com.univ-mrs.fr/IRD/urcyano/activites/pdf/embiez abstracts.pdf>

- [28] Farrar, W.V., "Tecuitlatl, A Glimpse of Aztec Food Technology. Nature", n° 5047, (23 juillet, 1966).
- [29] Wittrock, et Nordstedt, "Algae aquae ducia exsicc, fascicule XIV", Descriptiones systematicae dispositae, n° 679, (1844), 59 p.
- [30] Zarrouk, C., "Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler, Thèse Doctorat Faculté des Sciences, Université de Paris, (1966).
- [31] Charpy, L., Langlade, M.J. et Alliod, R. " La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ?", Institut de Recherche pour le Développement, France, (2008), 49 p.
- [32] Lindblad, P., Oxelfelt, F., Tamagnini, P. et Troshina, O., "Cyanobacterial Biotechnology Nostoc PCC 73102 and H2: Knowledge, Research and Biotechnological Challenges Cyanobacterial biotechnology", proceedings of the International Symposium, Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD, (1998), 11-13.
- [33] Moreau, F., "Les cyanophytes", in : Botanique, Encyclopédie de la Pléiade, nrf, (1960), 27-47.
- [34] Yale Dawson, E., "Blue-green algae", In: Marine Botany-An introduction, Holt, Rinehart and Wilson, Inc, chap. 6, (1966), 55-62.
- [35] Margulis, L. and Schwartz, K-V., "Five kingdoms", 3^d Ed., W.H. Freeman and Co., (1998), 520 p.
- [36] De Reviers B., "Biologie et phylogénie des algues", Belin, Tome (2), (2003), 255 p.
- [37] Balloni, W., Tomasselli, S., Giovannetti M-C. and Margheri M-C., "Biologia fondamentale del genera *Spirulina*", in Materassi R. (ed) Prospective della coltura di *Spirulina* in Italia. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome, (1980), 49-85.

- [38] Geitler, L., "Cyanophyceae", In: Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Kolkwitz R. (Eds.) Leipzig Germany : Akademische Verlagsgesellschaft, (1932), 14 p.
- [39] Cruchot, H., "La spiruline bilan et perspectives", Thèse de doctorat, (2008), 332 p.
- [40] Richmond, A., "Handbook of microalgal mass culture", CRC Press, (1986), 212-213.
- [41] Mühling, M., Harris, N., Belay, A., Whitton, B-A., "Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*". *Journal of Phycology*, V. 39, (2003), 360-367.
- [42] Van Eykelenburg, C., "The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity", *A.Leeuwenhoek*, V. 45, (1979), 369 p.
- [43] Jeeji Bai, N. et Seshadri, C-V. "On coiling and uncoiling of trichomes in the genus *Spirulina*, *Arch. Hydrobiol.*", Suppl. 60, *Algol. Stud.*, V. 26, (1980), 32 p.
- [44] Jeeji Bai, N., "Competitive exclusion or morphological transformation? A case study with *Spirulina fusiformis*", *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 71, *Algol. Stud.*, n° 38/39, (1985), 191 p.
- [45] Anonyme, "Antenna Technologies. Malnutrition. Spiruline : quelques bases scientifiques", (2007), Site web : <http://www.antenna.ch/documents/biologie.pdf>.
- [46] Elyah, A., "Quel avenir pour la spiruline ?", Desta promotion, (2003), Site web : http://elyah-partenariat.iquebec.com/autres/26_biblio_spiruline.pdf.
- [47] Jourdan, J.P., "Planche pour comparer les spirulines à d'autres algues", Antenna Technologies, (2007), Site web : <http://www.antenna.ch/malnutrition/annexes.html>.
- [48] Merceron, M., "Cyanobactéries", (2006), Site web : <http://www.ecosociosystemes.fr/cyanophycees.html>.

- [49] Doumenge, F., Durand-Chastel, H., Toulemont A. Spiruline, algue de vie/ Spirulina, algae of life. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, numéro spécial 12. Monaco : Musée Océanographique, (1993).
- [50] König, C., Les algues : première lignée végétale [en ligne]. C 06/10/2007. [consulté le : 12/01/2010]. Disponible sur : <http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/lesalgues-premiere-ligee-vegetale-523/c3/221/p2/>
- [51] Van Eykelenburg, C., On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*, *A.Leeuwenhoek*, (1977), 43, 89.
- [52] Tomaselli Feroci, L., Margheri, M.C. et Pelosi, E., Die Ultrastruktur von *Spirulina* im Vergleich zu *Oscillatoria*, *Zbl. Bakt. Abt.*, V. 2, (1976), 131, 592.
- [53] Tomaselli, L., Palandri, M.R. et Tani, G., Advances in preparative techniques for observation of the fine structure of *Arthrospira maxima* Setch. et Gardner (syn. *Spirulina maxima* Geitler), *Arch. Hydrobiol., Suppl.* 100, *Algol. Stud.*, V. 71, n °43, (1993).
- [54] Merceron M. Les bactéries photosynthétiques productrices d'oxygène [en ligne]. c2006. [consulté le : 15/2/2010]. Disponible sur : [http://membres.lyco.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes Bacteriens/Bacteries photosynthetiques productrices d oxygene.htm](http://membres.lyco.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes_Bacteriens/Bacteries_photosynthetiques_productrices_d_oxygene.htm).
- [55] Moreau F., Prat R. La Photosynthèse : Localisation de la photosynthèse [en ligne]. c05/04/2005. [consulté le : 4/01/2010]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/02-localisation.htm>.
- [56] Moreau F., Prat R. Qu'est-ce qu'un photosystème ? [en ligne]. c05/04/2005. [consulté le : 4/01/2010]. Disponible sur : http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/08_photosystemes.htm.

- [57] La plus importante réaction de la terre : la photosynthèse ; Disponible sur : <http://www.ordiecole.com/biol/photosynthese.pdf> ou sur: <http://www.ordiecole.com/biol/botanique.html>.
- [58] Castenholz, R.W., Rippka, R., Herdman M. et Wilmotte, A., Form-genus I. *Arthrospira* Stizenberger 1852. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D. R. Boone & R.W. Castenholz, eds.), V. 1, (2001), 542-543.
- [59] Burkholder, P. R., movement in the cyanophyceae, *quart. Rev. Biol.*, V. 9, (1934), 439-459.
- [60] Fritsch, F. E., *The structure and reproduction of the algae*, V. 2., Cambridge university press, (1945).
- [61] Halfen, L. N. et Castenholz, R. W., Gliding motility in the blue-green algae, *Oscillatoria princeps*, *5 Phycol.*, V. 7, (1971), 133-145.
- [62] Castenholz, R. W., Motility and taxes, In: *The biology of cyanobacteria*, N. G. Carr et B. A. Whitton, Eds. *Botanical Monographs*, Blackwell Scientific Publication, Oxford, Vol. 19, (1982),
- [63] Guglielmi, G. et Cohen-Bazire, G., Structure et distribution des pores et des perforations de l'enveloppe du peptidoglycane chez quelques cyanobactéries. *Protistologica*, V. 18, (1982), 151-165 ;
- [64] Guglielmi, G., Rippka, R. et Tandeau de Marsac, N., Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina spp.* And *Arthrospira spp.* Among cyanobacteria. In : *Spiruline, algue de vie*, bulletin de l'institut océanographique, Monaco, (1993).
- [65] Smith, R.V. et Peat, A., Comparative structure of the gas vacuoles of blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, V. 57, (1967), 111-122.

- [66] Walsby, A. E., Gas vacuoles. *In* The biology of blue-green algae; N. G. Carr et B. A. Whitton, Eds., Botanical Monographs, Blackwell Scientific Publication, Oxford, Vol. 9, (1973),
- [67] Lehmann, H. et Jost, M., Kinetics of the assembly of gas vacuoles in the blue-green alga *Mycrocystis aeruginosa*. Koetz emend. Elenkin, Arch. Mikrobiol. V. 79, (1971), 59-68.
- [68] Jaouen, P., Vandanjon, L. et Quemeneur, F. "The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps." *Bioresource Technology*, V. 68, n°2, (1999), 149-154.
- [69] Vandanjon, L., Rossignol, N., Jaouen, P., Robert, J. M. et Quemeneur, F., "Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems." *Biotechnology and Bioengineering*, V. 63, n°1, (1999), 1-9.
- [70] Darcas C. La spiruline, une algue pour la santé- Livret guide de production. Agitation des bassins [en ligne]. cTechnap/Credesa 2000. [consulté le : 10/03/2010]. Disponible sur : <http://credesa.online.fr/fich3.htm#2ens>.
- [71] Markl, H., Modelling of algal production systems. In G. Shelef et C.J. Soeder (Eds) *Algae biomass*. Elsevier-North, Amsterdam, (1980).
- [72] Weller, S. et Fanck, J., Photosynthesis in flashing light . *J. Phys. Chem.*, V.45, (1941), 1359-1373.
- [73] Darcas C. La spiruline, une algue pour la santé- Livret guide de production. Le site [en ligne]. cTechnap/Credesa 2000. [consulté le : 10/03/2010]. Disponible sur : <http://credesa.online.fr/fich2.htm#1-Site>.
- [74] ENSM Saint Etienne. Nombre et emplacement des bassins [en ligne]. [consulté le : 26/06/2010]. Disponible sur <http://webelevés.emse.fr/~shilaire/spiruline/nombrebassin.html>.

- [75] Darcas C. La spiruline, une algue pour la santé- Livret guide de production. Ensemencement [en ligne]. cTechnap/Credeca 2000. [consulté le : 10/03/2010]. Disponible sur : <http://credeca.online.fr/fich3.htm#2ens>.
- [76] Tredici, M. R., "Bioreactors, photo." *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Flickinger, M. C. and Drew, S. W. New York, USA, John Wiley & Sons, (1999), 395-419.
- [77] Richmond, A. and Cheng Wu, Z. "Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* outdoors." *Journal of Biotechnology*, V. 85, n°3, (2001), 259-269.
- [78] Ogbonna, J. C., "Photobioreactors." *Recent Advances in Marine Biotechnology*, V. 9, (2003), 315-348.
- [79] Watanabe, Y., de la Noüe, J. and Hall, D. O., "Photosynthetic performance of an helical tubular photobioreactor incorporating the Cyanobacterium *Spirulina platensis*." *Biotechnology and Bioengineering*, V. 47, n°2, (1995), 261-269.
- [80] Sahle Demessie, E., Bekele, S. F. and Pillai, U. R., "Residence time distribution of fluids in stirred annular photoreactor." *Catalysis Today*, V.88, n°1-2, (2003), 61-72.
- [81] García Camacho, F., Gomez, A. C., Sobczuk, T. M. and Molina Grima, E., "Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*." *Process Biochemistry*, V. 35, n°9, (2000), 1045-1050.
- [82] Sanchez Miron, A., Camacho, F. G., Gomez, A. C., Molina Grima, E. and Chisti, Y., "Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture." *AIChE Journal*, V. 46, n°9, (2000), 1872-1887.
- [83] Tsygankov, A. A., "Laboratory Scale Photobioreactors." *Applied Biochemistry and Microbiology*, V. 37, n°4, (2001), 333-341.

- [84] Erell Olivo, Conception et étude d'un photobioacteur pour la production en continu de microalgues en ecloseries aquacoles. Université de Nantes, n° 0367-292, (2007), 263 p.
- [85] Acien Fernandez, F. G., Sevilla, J. M. F., Perez, J. A. S., Grima, E. M. and Chisti, Y., "Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance." *Chemical Engineering Science*, V. 56, n°8, (2001), 2721-2732.
- [86] Tredici, M. R. and Zittelli, G. C, "Efficiency of sunlight utilization: Tubular *versus* flat photobioreactors." *Biotechnology and Bioengineering*, V. 57, (1998), 187-197.
- [87] Pulz, O., "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 57, n°3, (2001), 287-293.
- [88] Applied Photosynthetics Ltd. www.campusventure.co.uk/apl.
- [89] Olaizola, V. M., "Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace." *Biomolecular Engineering* 20 Special Iss. n° 4-6, (2003),459-466.
- [90] Cell Pharm Bioactive Product <http://home.btwebworld.com/cellpharm/>.
- [91] Grobbelaar, J. U. and Kurano, N., "Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation." *Journal of Applied Phycology*, V. 15, n° 2-3, (2003), 121-126.
- [92] Ogonna, Y., J. C., Soejima, T. and Tanaka, H., "An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors." *Journal of Biotechnology* V. 70, n° 1-3, (1999), 289-297.
- [93] Suh Z., I. S. and Lee, S. B., "A light distribution model for an internally radiating photobioreactor." *Biotechnology and Bioengineering*, V. 82, n°2, (2003), 180-189.

- [94] Borowitzka, M. A., "Closed algal photobioreactors: Design considerations for large-scale systems." *Journal of Marine Biotechnology*, V. 4, (1996), 185-191.
- [95] Chisti, Y. and Moo-Young, M., "Bioreactors Encyclopedia of Physical Science and Technology" Meyers, R. A. New York, USA, Academic Press, (2001), 247-271.
- [96] Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmid Staiger, U. and Trösch, W., "A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect." *Journal of Biotechnology*, V. 92, n°2, (2001), 89-94.
- [97] Bosma, R. and Wijffels, R. H., "Marine biotechnology in education: a competitive approach." *Biomolecular Engineering*, V. 20, n°4-6, (2003), 125-131.
- [98] Tredici, M. R., "Mass production of microalgae: Photobioreactors". *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A., Blackwell., (2004), 178-214.
- [99] Zittelli, G. C., Pastorelli, R. and Tredici, M. R., "A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis sp* under artificial illumination." *Journal of Applied Phycology*, V. 12, n°3-5, (2000), 521-526.
- [100] Iltis A., *Le phytoplancton des eaux natronées du Kanem (Tchad). Influence de la teneur en sels dissous sur le peuplement algal*. Thèse, Université de Paris VI, (1974).
- [101] Darcas C. *La spiruline, une algue pour la santé- Livret guide de production*. Première formulation [en ligne]. cTechnap/Credeva 2000. [consulté le : 10/03/2010]. Disponible sur : <http://credeva.online.fr/fich3.htm#1formul>.
- [102] ENSM Saint Etienne. *Constitution du milieu de départ*[en ligne]. [consulté le : 26/06/2010]. Disponible sur : <http://webelevs.emse.fr/~shilaire/spiruline/milieuinit.html>.

- [103] ENSM Saint Etienne. Constitution du milieu nourricier pour l'entretien[en ligne]. [consulté le : 02/09/2010]. Disponible sur : <http://webelevs.emse.fr/~shilaire/spiruline/entretienbassin.html>.
- [104] Jourdan J.P. « Le mystère des droites »[en ligne] c2002. [consulté le : 19/11/2009]. Disponible sur : <http://www.com.univ-mrs.fr/IRD/urcyano/activites/pdf/spirulin.pdf>.
- [105] Manen J.F. and Falquet, J., 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*, V. 52, (2002), 861- 867.
- [106] Baghchi, S.N., Cyanobacterial toxins, *J. Scientific et industrial Research (India)*, V. 55, (Aout-Sep., 1996), 715-727.
- [107] Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Anderson, R.A, Matsunaga, S., Moore R.E. et Skulberg, R., Investigation of a neurotoxic oscillatoriacean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of nomoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.*, V. 11, (1992), 321-329.
- [108] Anagnostidis, K. et Komarek, J., Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3, Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol.*, (suppl. 80), n° 50-53, 327-472.
- [109] Mynderse, J.-S. et Moore, R.E., Kashiwaga, M. et Norton, T.R., Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae : isolation of debromoaplysia toxin from *lyngbya*, *Science*, n° 196, (1977), 538-540.
- [110] Jourdan, J.P. Compte-rendu du « Mini-colloque » de Mialet sur la production de la spiruline artisanale [en ligne]. Mialet (France) ; 26-28 /06/2002. p.1-7. <http://www.com.univ-mrs.fr/IRD/urcyano/activites/pdf/spirulin.pdf>.
- [111] Anonyme, Darcas, C., La spiruline, une algue pour la santé- Livret guide de production. Réponses à quelques problèmes [en ligne]. cTechnap/Credesa 2000. [consulté le : 10/03/2010]. Disponible sur : <http://credesa.online.fr/tablintr.htm>.

- [112] Cornet, J.F., Etude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur. Thèse, docteur en sciences, Université de Paris-sud, Centre d'Orsay, (27 février, 1992).
- [113] Anonyme, Darcas, C., La spiruline, une algue pour la santé- Livret guide de production. Problème des exopolysaccharides [en ligne]. cTechnap/Credesa 2000. [consulté le : 11/03/2010]. Disponible sur : <http://credesa.online.fr/fich6.htm>.
- [114] Schwimmer, D. et Schwimmer, M., Algae and Medicine, Dans Algae and man. D.F. Jackson, Editor, Plenum Press, New York, (1964).
- [115] Kuenen, W.A. et Swellengrebel, N.H., Die Entamoeben des Menschen und ihre praktisvhe bedeutung, Centralbl. Bakt. I. Orig., V. 71, (1913),, 378 p.
- [116] Dobell, C. et O'connor, F.W., Notes on the classification of the amoeba, Am.J.Trop. Med. Hyg. V. 33, (1921), 258 p.
- [117] Wenyon, C.M., Protozoology, vol.1, Baillièere, Tindall et Cox, London, (1926).
- [118] Jourdan, J.P., Présentation Microsoft PowerPoint : Qualité [en ligne]. c12/2006. [consulté le : 15/12/2009]. Disponible sur : <http://pagesperso-orange.fr/petites-nouvelles/presentation-powerpoint-qualite.ppt>.
- [119] Sall, M.G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehua, E. et Kuakuwi, N. , La spiruline : une source alimentaire à promouvoir. Médecine d'Afrique Noire : 1999, 46 (3) : 140-142.
- [120] Reuters Finbarr O'reilly, L'Afrique mise sur l'algue verte pour mieux se nourrir, Le Monde du 05.03.06, (2006).
- [121] Clément, G., Spirulina, a protein-rich food alga, conférence du Caire avril 1975. Institut français du Pétrole, division Applications, (1975), 1-18.
- [122] Henrikson, R., Microalga Spirulina, superalimento del futuro. Barcelona:Ediciones S. A. Urano ISBN 84-7953-047-2, (1994).

- [123] Delpuech, F., Joseph, A. et Cavelier, C., Consommation alimentaire et apport nutritionnel des algues bleues (*Oscillatoria platensis*) chez quelques populations du Kanem (Tchad) Ann. Nutr. Aliment, V. 29, (1975), 497-515.
- [124] Bujard, E. U., Braco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., Wuhrmann, J.J. and Clément, G., Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations 3rd international Congress of Food Science and Technology, Washington, (1970).
- [125] Jacquet, J., Utilisations biologiques des Spirulines . Bull. Acad. Vét. XLVII, (1974).
- [126] Borowitzka, M.A., Borowitzka. L.J., Micro-Algal biotechnology. New York: Cambridge University Press, (1988), 477 pp.
- [127] AFAA, Association française pour l'algologie appliquée Actes du premier symposium sur la spiruline *Spirulina Platensis* (Gom.) Geitler de l'AFAA, (1982).
- [128] Clément, G., Giddey, C. and Menzi, R., Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. Journal of the Science of Food and Agriculture, V. 18, (1967), 497-501.
- [129] PAG: Protein Advisory Group of U.N., Recent Developments in *Spirulina* PAG Bulletin, V. 3, n°4, (1974), 4-7.
- [130] Falquet, J., Hurni, J.P., Spiruline, Aspects Nutritionnels, Antenna Technologies, (2006), 41 p.
- [131] WHO, Energy and Protein Requirement. World Health Organization. Techn. Rep. Ser., n° 522, Geneva, (1973).
- [132] Challem, J.J. et Passwater, R.A., Mindell-EM. *Spirulina*. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut, (1981).

- [133] Furst P. T., *Spirulina Human Nature*, V. 1, n°3, (1978), 60-65.
- [134] Dillon, J.C. et Phan, P.A., *Spirulina as a source of proteins in human nutrition Bull. Inst. Océano, Monaco, n°spécial, V. 12, (1993), 103-107.*
- [135] Santillan, C., *Cultivation of the Spirulina for Human Consumption and for Animal Feed. International Congress of Food Science and Technology Madrid (Spain) September (1974).*
- [136] Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, P., Kabke, K. et Weber, A., *Modelling of Spirulina platensis growth in fresh water using response surface methodology. World Journal of Microbiology and Biotechnology, V. 18, (2002), 603-607.*
- [137] Ciferri, O., *Spirulina, the edible microorganism. Microbiological Reviews V. 47, (1983), 551-578.*
- [138] Ciferri, O. et Tiboni, O., *The Biochemistry and Industrial Potential of Spirulina Ann. Rev. Microbiol., V. 39, (1985), 503-526.*
- [139] Sautier, C. et Trémolières, J., *Valeur alimentaire des algues spirulines chez l'homme Ann. Nutr. Aliment, V. 29, (1975), 517-533.*
- [140] Quillet, M., *Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les spirulines Ann. Nutr. Aliment, V. 29, (1975), 553-561.*
- [141] Vermorel, M., Toullec, G., Dumond, D. et Pion, R., *Valeur énergétique et protéique des algues bleues spirulines supplémentées en acides aminés: utilisation digestive et métabolique par le rat en croissance Ann. Nutr. Aliment., V. 29, (1975), 535-552.*
- [142] Anusuya, D. m. et Venkataraman, L. V., *Supplementary value of the proteins of the blue green algae Spirulina platensis to rice and wheat proteins Nutr. Rep. Internat., V. 28, (1983), 1029-1035.*

- [143] Proteus, Inc., Clinical Experimentation with Spirulina National Institut of Nutrition, Mexico City, (1975). (transl. by Proteus, Inc. 1975).
- [144] Earthrise Farms Spirulina Product Typical Analysis Earthrise Farms Spirulina, San Rafael, USA, (1986).
- [145] Hudson, B.J.F. et Karis, I.G., The Lipids of the Alga Spirulina J. Sci. Fd. Agric., V. 25, (1974), 759-763.
- [146] Cohen, Z., in "Spirulina platensis : Physiology, cell-biology and biotechnology" Ed. A. Vonshak, Taylor & Francis Ltd, (1997).
- [147] Xue, C., Hu, Y., Saito, H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H. et Imbs, A.B., Molecular species composition of glycolipids from Spirulina platensis Food Chemistry, V. 77, (2002), 9–13.
- [148] Pascaud, M., Doumenge, F., Durand-Chastel, H. et Toulemont, A., The essential polyunsaturated fatty acids of Spirulina and our immune response. Bull. Inst. océanogr. SNS12, (1993),49-57.
- [149] Cohen, Z., Reungjitchachawali, M., Siangdung, W. and Tanticharoen, M., Production and partial purification of gamma-linolenic acid and some pigments from Spirulina platensis. Journal of Applied Phycology, V. 5, (1993), 109-115.
- [150] Otles, S. and Pire, R., Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species. J AOAC Int., V. 84, n°6, (2001), 1708-1714.
- [151] Manuel Merck, Manuel de Diagnostic et Thérapeutique 2e ed. française, éditions d'Après, Paris, (1994).
- [152] Hwang, D., Essential fatty acids and immune response Faseb J., V. 3 (1989), 2052-2061.

- [153] Mühling, M., Belay, A. et Whitton, B., Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains *Journal of Applied Phycology*, V. 17, n° 2, (2005), 137-146(10).
- [154] Quasney, M.E., Carter, L.C., Oxford, C., Watkins, S.M., Gershwin, M.E. and German, J.B., Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells by the plant sulfolipid, sulfoquinovosyldiacylglycerol. *J Nutr Biochem.*, V. 12, n°5, (2001), 310-315.
- [155] Gustafson, K. et al., AIDS- Antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae) *Journal of the National Cancer Institute*, V. 81, n°16, (August 16, 1989), 1254-1258.
- [156] Kiet, P.Q. and Durand-Chastel, H., *Spirulina* rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids. In Charpy et al. (ed.) *International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development*, (2006), 111-117.
- [157] Paoletti, C., Vincenzini, M., Bocci, F. et Materassi, R., Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *S. maxima* In "Estratto da Atti del Convegno Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia", p. 11, Firenze: Tipographia Coppini, (1981).
- [158] Martinez Nadal, N.G., Sterols of *Spirulina maxima* *Phytochem*, V. 10, (1971), 25-37.
- [159] Santillan, C., *Mass Production of Spirulina Experientia*, V. 38, (1982), 40 p.
- [160] Tulliez, J., Bories, G., Février, C. et Boudène, C., Les hydrocarbures des algues spirulines: nature, étude du devenir de l'heptadécane chez le rat et le porc *Ann. Nutr. Aliment.* V. 29, (1975), 563-571.
- [161] Shekharam K.M., Venkataraman, L.V. and Salimath, P.V., Carbohydrate Composition and Characterization of Two Unusual Sugars from the Blue Green Alga *Spirulina-Platensis*. *Phytochemistry*, V. 26, (1987), 2267-2270.

- [162] Nippon Ink et Chemicals, "Spirulina". Bull Tech Dye Nippon, (1977).
- [163] Lee J.-B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U., Maeda M., Nemoto T., Nakanishi H., Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis* Journal of natural products V. 61, n°9, (1998), 1101-1104.
- [164] Lee, J.B., Hayashi, T., Hayashi, K. et Sankawa, U., Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry J. Nat. Prod., V. 63, n° 1, (2000), 136 -138.
- [165] Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M. et Kojima, I., Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. Journal of Natural Products, V. 59, (1996), 83-87.
- [166] Lee, J.B., Srisomporn, P., Hayashi, K., Tanaka, T., Sankawa, U. et Hayashi, T., Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. chemical and pharmaceutical Bulletin, V. 49, (2001), 108-110.
- [167] Rechter, S., Konig, T., Auerochs, S., Thulke, S., Walter, H., Dornenburg, H., Walter, C. et Marschall, M., Antiviral activity of Arthrospira-derived spirulan-like substances Antiviral Res. In press, (June, 2006).
- [168] Campbell, J. 3rd, Stevens, S. E. Jr., Balkwill, D.L., Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. J Bacteriol., V. 149, n°1, (1982), 361-363.
- [169] Vincenzini, M., Sili, C., Philippis, R., Ena, A. and Materassi, R., Occurrence of poly-beta-hydroxybutyrate in *Spirulina* species J Bacteriol., V. 172, n°5, (1990), 2791-2792.
- [170] Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, H.N., ElSohly, M.A. et Pasco, D.S., Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. Planta Medica, V. 67, (2001), 737-742.

- [171] Lobner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K. et Nielsen, C.H., Enhancement of Human Adaptive Immune Responses by Administration of a High-Molecular-Weight Polysaccharide Extract from the Cyanobacterium *Arthrospira platensis* Journal of Medicinal Food, V. 11, n° 2, (2008), 313-322.
- [172] Boudène, C., Collas, E. et Jenkins, C., Recherche et dosage de divers toxiques minéraux dans les algues spirulines de différentes origines, et évaluation de la toxicité a long terme chez le rat d'un lot d'algues spirulines de provenance mexicaine Ann. Nutr. Aliment., V. 29, (1975), 577-587.
- [173] Blum, J.C, Calet, C., Food value of spiruline alga for growth of the broiter type chicken. Ann.Nutr Aliment, 29, (1975), 651-674.
- [174] Seshadri, C.V., Umesh, B.V. et Manoharan, R., Beta-carotene studies in Spirulina Society of Applied Algology. International conference n°5, V. 38, n° 2-3, (1991), 111-113.
- [175] Palla, J.C. and Busson, F., Etude des caroténoïdes de *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler (Cyanophycées) C.R. Acad. Sc. Paris, T.269, (1969), 1704-1707.
- [176] Pierlovisi, C., L'Homme et la Spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques. Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, (2007), 162 p.
- [177] Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A. et Von Holst, C., Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach, J. Chromatography A 912, (2001), 61–71.
- [178] Henrikson, R., Microalga Spirulina, superalimento del futuro. Barcelona:Ediciones S. A. Urano ISBN 84-7953-047-2, (1994).
- [179] Evets, L., et al., Means to normalize the levels of immunoglobulin E, using the food supplement Spirulina Grodenski State Medical Univ. Russian Federation Committee of Patents and Trade. Patent (19)RU (11)2005486. (January 15, 1994).

- [180] Tang, G., Qin, J., Dolnikowski, G.G. and Russell, R.M., Vitamin A equivalence of beta-carotene in a woman as determined by a stable isotope reference method. *Eur J Nutr.*, V. 39, n°1, (2000), 7-11.
- [181] Kapoor, R. et Mehta, U., Utilization of beta-carotene from *Spirulina platensis* by rats *Plant-Foods-Hum-Nutr.*, V. 43, n°1, (1993), 1-7.
- [182] Mitchell, G.V., Grundel, E., Jenkins, M. and Blakely, S.R., Effects of graded dietary levels of *Spirulina maxima* on vitamins A and E in male rats *J.Nutr.* V. 120, n°10, (October, 1990), 1235-1240.
- [183] Ross, E., Dominy, W., The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulina platensis*) for poultry *Poult.Sci.*, V. 69, n°5, (May, 1990), 794-800.
- [184] Gireesh, T., Nair, P.P., Sudhakaran, P.R., Studies on the bioavailability of the provitamin A carotenoid, beta-carotene, using human exfoliated colonic epithelial cells *British Journal of Nutrition*, V. 92, n° 2, (2004), 241-245(5).
- [185] Annapurna, V. et al. Bioavailability of spirulina carotenes in preschool children *J. Clin. Biochem Nutrition*, V. 10, (1991), 145-151.
- [186] Seshadri, C.V., Large scale nutritional supplementation with spirulina alga. All India Coordinated Project on Spirulina. Shri Amm Murugappa Chettiar Research Center (MCRC) Madras, Indi, (1993).
- [187] Semba, R.D., Miotti, P.G., Chiphangwi, J.D., Saah, A.J., Canner, J.K., Dallabetta, G.A., and Hoover, D.R., Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1 *Lancet*, V. 343, n°8913, (1994), 1593-1597.
- [188] Shey Wiysonge, C.U., Brocklehurst, P. and Sterne, J.A.C., Vitamin A supplementation for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection (Cochrane Review) *The Cochrane Library*, issue 1 (Oxford), (2003).

- [189] Wang, J., Wang, Y., Wang, Z., Li, L., Qin, J., Lai, W., Fu, Y., Suter, P.M., Russell, R.M., Grusak, M., Tang, G. and Yin S., *Vitamin A equivalence of spirulina beta-carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method.* American Journal of Clinical Nutrition V.87, n°6, (2008),1730-1737.
- [190] Gomez-Coronado, D.J.M., Ibanez, E., Ruperez, F.J. and Barbas, C., Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin, J. Chromatogr. A V. 1054, (2004), 227–233.
- [191] Vincenzini, M, Ferrari, F., Margheri, M.O. and Florenzano, G., Quinonoid and tocopherol levels in *Spirulina platensis*. Microbiologica V. 3, (1980), 131-136.
- [192] Guyton, A.C., Textbook of Medical Physiology. 7th. ed. W.B. Saunders Company, (1986).
- [193] Leitzmann, C., Vitamin B12 aktueller Stand der Forschung FIT fürs Leben, V. 6, (1993), 12-15.
- [194] Hau, R., Vitamin B12 in der Mikroalge *Spirulina platensis* FIT fürs Leben, V. 1, (1995), 29 p.
- [195] Messina, M.J. and Messina, V.L., The Dietitian's Guide to Vegetarian Diets: Issues and Applications. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, (1996).
- [196] Donaldson, M.S., Metabolic vitamin B12 status on a mostly raw vegan diet with follow-up using tablets, nutritional yeast, or probiotic supplements. Ann Nutr Metab., V. 44, (2000), 229-234.
- [197] Yates, A.A., National nutrition and public health policies: Issues related to bioavailability of nutrients when developing dietary reference intakes. Journal of Nutrition, V. 131, (2001), 1331-1334.
- [198] Watanabe, F., Vitamin B12 Sources and Bioavailability. Experimental Biology and Medicine, V. 232, (2007), 1266-1274.

- [199] Watanabe, F., Katsura, H., Takenaka, S., Fujita, T., Abe, K., Tamura, Y., Nakatsuka, T., Nakano, Y., Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets, *J. Agric. Food Chem.*, V. 47, n°11, (1999), 4736-4741.
- [200] Watanabe, F., Takenaka, S., Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., Miyamoto, E., Characterization and bioavailability of vitamin B₁₂-compounds from edible algae, *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, V. 48, n°5, (2002), 325-331.
- [201] Todd-Lorenz, R., *Spirulina Pacifica as a Source of Cobalamin Vitamin B-12 Spirulina Pacifica Technical Bulletin 052*, (1999).
- [202] Kondo, H., Kolhouse, J.F. et Allen, H., Presence of cobalamin analogues in animal tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V. 77, n°2, (1980), 817-821.
- [203] Herbert, V., Drivas, G. et Foscardi, R., Multivitamin/mineral food supplement containing vitamin B₁₂ may also contain analogues of B₁₂. *N. Engl. J. Med.*, V. 307, (1982), 255-256.
- [204] Kelly, R.J., Gruner, T.M., Furlong, J.M. and Sykes, A.R., Analysis of corrinoids in ovine tissues. *Biomed Chromatogr*, V. 20, n° 8 , (2005), 806 – 814.
- [205] Noguchi, Y., Ishii, A., Matsushima, A., Haishi, D., Yasumuro, K., Moriguchi, T., Wada, T., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H., Sekine, M., et Inada, Y., Isolation of Biopterin-alpha-glucoside from *Spirulina (Arthrospira) platensis* and Its Physiologic Function, *Mar. Biotechnol.*, V. 1, n°2, (1999), 207-210.
- [206] Hattori, Y., Diseases and Pathophysiology Arising from Biopterin Dysregulation, *J. Med. Sci.*, V. 22, n°3, (2002), 99-100.
- [207] NRC: National Research Council, *Recommended Dietary Allowances 9th ed.* Washington, DC: National Academy Press, (1980).
- [208] Campanella, L., Crescentini, G. and Avino, P., Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina* Analysis, V. 27, (1999), 533-540;

- [209] Johnson, P. et Shubert, E., Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green algae Nutrition Research, V.6, (1986), 85-94.
- [210] Kapoor, R. and Mehta, U., Iron status and growth of rats fed different dietary iron sources, Plant Foods Hum. Nutr., V. 44, (1993), 29-34.
- [211] Puyfoulhoux, G., Rouanet, J.M., Besançon, P., Baroux, B., Baccou, J.C. et Caporiccio, B., Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture mode, J. Agric. Food Chem., V. 49, (2001), 1625-1629.
- [212] Gibson, R.S., Zinc: the missing link in combatting micronutrient malnutrition in developing countries, Proc. Nut. Soc., V. 65, (2005), 51-60.
- [213] Melchior, J.C. et Goudet, O., Nutrition et infection par le VIH Ed. Masson, Paris, (1997).
- [214] Cogne, G., Lehmann, B., Dussap, C.G. et Gros, J.B., Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium Spirulina platensis under photoautotrophic conditions: Culture medium optimization Biotechnology and Bioengineering V. 81, n° 5, (2002), 588 – 593.
- [215] Biorigin, Documentation Biorigin pour "Azina" et "Ferrina", spiruline enrichie en zinc ou en fer <http://www.biospirulina.ch/>, (2006).
- [216] Briend, A., La malnutrition de l'enfant Institut Danone, rue du Duc 100, Bruxelles, (1998).
- [217] Planes, P., Rouanet, J.M., Laurent, C., Baccou, J.C., Besancon, P. and Caporiccio, B., Magnesium bioavailability from magnesium-fortified spirulina in cultured human intestinal Caco-2 cells Food Chemistry, V. 77, n° 2, (2002), 213-218.

- [218] Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.S., Yang, F. et Bai, Y., Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. *Bioresour Technol.*, V. 97, (2006), 2260-2265.
- [219] Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C. and Chu, X.M., Molecular immune mechanism of C phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology An Applied Biochemistry*, V. 43, n°3, (2006), 155-164.
- [220] Cases, J., Puig, M., Caporiccio, B., Baroux, B., Baccou, J.C., Besancon, P. and Rouanet, J.M., Glutathione-related enzymic activities in rats receiving high cholesterol or standard diets supplemented with two forms of selenium *Food Chemistry*, V. 65, n°2, (1999), 207-211.
- [221] Cases, J., Vacchina, V., Napolitano, A., Caporiccio, B., Besancon, P., Lobinski, R. and Rouanet, J.M., Selenium from selenium-rich *Spirulina* is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium-deficient rats, *J. Nutr.*, V. 131, n°9, (2001), 2343-2350.
- [222] Cases, J., Wysocka, I.A., Caporiccio, B., Jouy, N., Besancon, P., Szpunar, J. et Rouanet, J.M., Assessment of selenium bioavailability from high-selenium spirulina subfractions in seleniumdeficient rats, *J. Agric. Food. Chem.*, V. 19, n°13, (2002), 3867-3873.
- [223] Hetzel, B. et Pandav, C., *SOS pour un milliard* Presses de l'Université d'Oxford, Great Clarendon Street, Oxford, (1997).
- [224] Mazo, V.K., Microalgae spirulina in human nutrition, *Vopr Pitan*, V. 73, (2004), 45-53.
- [225] Singh, Y., Kumar, H.D., Adaptation of a strain of *Spirulina platensis* to grow in cobalt- and iodine-enriched media, *J-Appl-Bacteriol.*, V. 76, n°2, (1994), 149-154.

- [226] Lison, D., De Boeck, M., Verougstraete, V. et Kirsch-Volders, M., Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds, *Occup. Environ Med.*, V. 58, n°10, (2001), 619-625.
- [227] Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology Cell biology and biotechnology*. Taylor & Francis LTD, (1997).
- [228] Fedkovic, Y., Astre, C., Pinguet, F., Gerber, M., Ychou, M. and Pujol, H., *Spirulina and cancer*, *Bull. Inst. Oceano.*, Monaco NS, V. 12, (1993), 117-120.
- [229] Branger, J.L., Cadudal, M., Delobel, H., Ouoba, P., Yameogo, D., Ouedraogo, D., Guerin, A., Valea, les personnels des CREN, C., Zombre, P., Ancel, La spiruline comme complément alimentaire dans la malnutrition du nourrisson au Burkina-Faso
Spiruline as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso : mémoire originale, *Archives de pédiatrie*, V. 10, (2003), 424–431.
- [230] Hayashi, K. *et al.*, An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into cells, *Phytother Res.*, V. 7, (1993), 76-80.
- [231] Patterson, R.W., Antiviral activity of blue-green cultures, *J. Phycol.*, V. 29, (1993), 125-130.
- [232] Gorobets, O. B., Blinkova, L. P., and Baturo, A. P., Action of *Spirulina platensis* on bacterial viruses, *Zeitschrift für Immunitätsforschung- Immunobiology*, n°6, (2002), 18–21.
- [233] Hernandez-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G., and Barron, B. L., Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, V. 56, n°3, (2002), 279–285.
- [234] Shih, S. R., Tsai, K. N., Li, Y. S., Chueh, C. C., and Chan, E. C., Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*, *Journal of Medical Virology*, V. 70, n°1, (2003), 119–125.

- [235] Sharaf, M., Amara, A., Aboul-Enein, A., Helmi, S., Ballot, A., Astani A. and Schnitzler, P., Molecular authentication and characterization of the antiherpetic activity of the cyanobacterium *Arthrospira fusiformis*, Vol. 65, n° 2, (2010), 132-136.
- [236] Schaeffer, D.J. et Krylov, V.S., Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicol Environ Saf.*, V. 45, n°3, (2000), 208-227.
- [237] Ayehunie, S., Belay, A. *et al.*, Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, V. 18, n°1, (May, 1998), 7-12.
- [238] Simpure, J., Salvatore Pignatelli,1. and Salvatore Musumeci, The effects of Spiruline on the immune functions of HIV-infected undernourished children, *J. Infect Developing Countries*, V. 1, n°2, (2007), 112-117.
- [239] Ozdemir, G., Karabay, N.U., Dalay, M. and Pazarbasi, B., Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother, Res.*, V. 18, n°9, (2004), 754–757.
- [240] Becker, E-W., Jakover, B., Luft, D. and Schmuelling, R-M., “Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity: a double-blind cross-over study”, *Nutr. Rep. Int.*, V. 33, (1986), 565-574.
- [241] Nakaya, N., Homma, Y. et Goto, Y., Cholesterol lowering effect of spirulina, *Nutrit. Repor Internat.* V. 37, n°6, (1988), 1329-1337. Étude mentionnée dans: *Natural Standard* (Ed). *Herbs & Supplements - Spirulina*, Nature Medicine Quality Standard. [Consulté le 26 mai 2010]. www.naturalstandard.com.
- [242] Kato, T., Takemoto, K., Katayama, K. et Kuwahara, Y., Effect of *Spirulina platensis* to alimentary hypercholesterolemia in rat, *Jpn Nat. Food Assoc J.*, V. 37, (1988), 323 p.

- [243] Iwate, K., Inayama, T. et Kato, T., Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose induced hyperlipidemia in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, V. 36, (1990), 165-171.
- [244] Devi, M. A. and Venkataraman, L.V., Hypocholesterolemic effect of blue-green algae spirulina on albino rats, *Nutr. Rep. Int.*, V. 28, (1983), 519-530.
- [245] Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., Otsuka, A., Hirahashi, T. and Kato, T., A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J. Nutr.*, V. 135, n°10, (2005), 2425–2430.
- [246] Chen, L. C., Chen, J. S., and Tung, T. C., Effects of spirulina on serum lipoproteins and its hypocholesterolemic activities, *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi*, V. 80, n°9, (1981), 934–942.
- [247] Samuels, R., Mani, U. V., Iyer, U. M., and Nayak, U. S., Hypocholesterolemic effect of spirulina in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome, *Journal of Medical Food*, V. 5, n°2, (2002), 91–96.
- [248] Devi, M.A. and Venkatamaran, L.V., «Hypocholesterolemic effect of bluegreen algae *Spirulina platensis* in albino rats », *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, V. 40, (2002), 463-467.
- [249] Iwata, K., Inayama, T., Kato, T., « Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoproteinlipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats », *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, V. 36, (1990), 165-171.
- [250] Mani, U.V., Desai, S. and Iyer, U., Studies on the long-term effect of spirulina supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in NIDDM patients, *J. Nutraceut* . V. 2, n°3, (2000), 25-32.
- [251] Anuradha, V. et Vidhya, D., Impact of administration of spirulina on the blood glucose levels of selected diabetic patients, *Indian J. Nutr. Dietet.*, V. 38, (2001), 40-44.

- [252] Babu, D.Y., Hypoglycaemic effects of algae spirulina in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. MS thesis. Bharathiar University, Coimbatore, (1989), 1-70.
- [253] Iyer, U. and Pariskh S., Glycemic index of spirulina supplemented recipes in NIDDM subjects. MS thesis. Department of Foods and Nutrition, Faculty of Home Science, M.S. University of Baroda, Baroda, (1996).
- [254] Iyer, U. and Ahmedi, S., Glycemic index of spirulina supplemented recipes. MS thesis. Department of Foods and Nutrition, Faculty of Home Science, M.S. University of Baroda, Baroda, (1997).
- [255] Iyer, U. and Deshmukh, S., Glycemic index of spirulina supplemented meals. MS thesis. Department of Foods and Nutrition, Faculty of Home Science, M.S. University of Baroda, Baroda, (1998).
- [256] Layam, A., C. L. K. Reddy / Department of Food Science and Nutrition, SPMVV, Tirupati, India Preliminary Communication ANTIDIABETIC PROPERTY OF SPIRULINA. *Diabetologia Croatica*, V.35, n°2, (2006), 29-33.
- [257] Parikh, P., Mani, U. and Iyer, U., *Role of Spirulina in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus*, *Journal of Medicinal Food*, V. 4, n°4, (2001), 193-199.
- [258] Takai, Y., Hosoyamada, Y. and Kato, T., « Effect of water-soluble and water-insoluble fractions of Spirulina over serum lipids and glucose resistance of rats." *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, Vol. 44, (1991) 273-277.
- [259] Lyer Uma, M., Ahmedi, S. and Mani Uliyar, V., Glycemic and lipemic responses of selected Spirulina- supplemented rice-based recipes in normal subjects INT. J. DIAB. DEV. Countries, V. 19, (1999), 17-22.
- [260] Hirahashi, T., Matsumoto, M. *et al.*, Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by

oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol*, V. 2, n°4, (Mar., 2002), 423-434.

- [261] Iijima, N., Fujii, N., Shimamatsu, H., Brevet japonais # 58-65216 : « Antitumoral agents containing phycobillin. » Dainippon Ink and Chemicals (DIC), (18 avril, 1983).
- [262] Qureshi, M.A., Garlich, J.D. et Kidd, M.T., Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, V. 18, (1996), 465-476.
- [263] Rasool, M. and Sabina, E.P., Appraisal of immunomodulatory potential of *Spirulina fusiformis* : an in vivo and in vitro study, *J. Nat. Med.*, V. 63, (2009), 169–175.
- [264] Lisheng, L. et al., Inhibitive effect and mechanism of polysaccharide of *Spirulina platensis* on transplanted tumor cells in mice. *Marine Sciences, Qindao, China*, V. 5, (1991), 33–38.
- [265] Shklar, G. et Schwartz, J., Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with alphatocopherol, beta-carotene, canthaxanthin and algae extract, *Eur J. Cancer Clin. Oncol.*, V. 24, n°5, (May, 1988), 839-50.
- [266] Mishima, T., Murata, J., *et al.*, Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clin Exp Metastasis*, V. 16, n°6, (Aug., 1998), 541-50.
- [267] Babu, M. *et* Sankaranarayanan, R., Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr. Cancer*, V. 24, n°2, (1995), 197-202.
- [268] Qishen, P. *et al.*, Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis*. *Acta Genet Sinica (Chin J Genet)*, V. 15, (1988), 374-381.

- [269] Schwartz, J. *et al.* Inhibition of experimental oral carcinogenesis by tropical beta carotene. *Carcinogenesis*, V. 7, (1986), 711-715.
- [270] Mohan, I. K., Khan, M., Shobha, J. C., Naidu, M. U., Prayag, A., Kuppusamy, P., et al., Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by *Spirulina* in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, V. 58, n°6, (2006), 802–808.
- [271] Zhang, H., Q., Lin, A.P., Sun, Y., and Deng, Y. M., Chemo- and radioprotective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs. *Acta Pharmacologica Sinica*, V. 22, n°12, (2001), 1121–1124.
- [272] Roy, K. R., Arunasree, K. M., Reddy, N. P., Dheeraj, B., Reddy, G. V., and Reddanna, P. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycoocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, V. 47, n° 3, (2007), 159–167.
- [273] Schwartz, J.L. et Sklar, G., Regression of experimental hamster cancer by beta-carotene and algae extracts. » *J. Oral Maxillofac. Surg.* V. 45, (1987), 510-515.
- [274] Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M. et Mancini-Filho J., Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*; *Brazilian Journal of Medical and Biologiam Research*, V. 31, (1998), 1075-1079.
- [275] Chopra, K. and Bishnoi, M., Antioxydant Profile of *Spirulina* : A Blue-Green Microalga in *Spirulina* In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina in Human Nutrition and Health*, (2007), 101-118.
- [276] Ray, S., Roy, K. and Sengupta, C., *Évaluation in vitro* du potentiel antiperoxydative d'extrait d'eau de *Spirulina platensis* (algues bleu-vert) sur induites par le cyclophosphamide peroxydation lipidique, *Indian Journal of pharmaceutical Sciences*, V. 69, n°2, (2007) 190-196.

- [277] Tsuchihashi, N., Watanabe, T. et Takai, Y., "Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats.", *Bull. Chiba Hygiene College, Chiba, Japan*, V. 5, (1987), 27-30.
- [278] Sall, M.G., Dankoko, B., Badiane, M., Ehuae et Kuakiwi, N., Resultats d'un essai de rehabilitation nutritionnelle avec la spiruline à Dakar (a propos de 59 cas). *Médecine d'Afrique Noire*, V. 46, n°3, (1999), 143-146.
- [279] Kazys, M., Marija, P. and Ruta, D., Effect of *Spirulina* food supplement on blood morphological and biochemical composition in sportsmen, *ACTA medica lituanica*, V. 11, n° 1, (2004), 47-51.
- [280] Ribadeneira, M. et Garcia, P., Comparative analysis of the use of a 100% vegetable iron and iron sulfate as iron source for the treatment of ferriprive anemia A publier; cité dans *Phytonutrition et Environnement*, J.M. Robin, (2000).
- [281] Zhang Cheng-Wu, et al., Effects of polysaccharide and phycocyanin from spirulina on peripheral blood and hematopoietic system of bone marrow in mice *Proc. of Second Asia Pacific Conf. on Algal Biotech. Univ. of Malaysia*, (1994).
- [282] Mathew, B., Sankaranarayanan, R. *et al.* Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr Cancer*, V. 24, n°2, (1995), 197-202.
- [283] Sankaranarayanan, R., Mathew, B. *et al.* Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment. *Oral Oncol.*, V. 33, n°4, (Jul., 1997), 231-236.
- [284] Karim, M.A., et al., *Etude sur l'effet de la spiruline dans le traitement des maladies chroniques arsénicisme de la population du Bangladesh*. Abstracts: 1ère Conférence internationale des Monographie de la dermatologie, Dhaka, Bangladesh, Mai 8-10, Article n ° 13, (1999).
- [285] Saha, S.K., Misbahuddin, M., Khatu, R., Mammum, I.R., Effect of hexane extract of *Spirulina* in the removal of arsenic form isolated liver tissues of rat. *Mymensingh. Med. J.*, V. 14, n°2, (2005), 191-195.

- [286] Misbahuddin, M., Islam, A.Z. *et al.* Efficacy of spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: a randomized placebo-controlled study. *Clin Toxicol (Phila)*, V. 44, n°2, (2006), 135-41.
- [287] Jeyaprakash, K. et Chinnaswamy, P., Effect of Spirulina and Liv-52 on cadmium induced toxicity in albino rats. *Indian J. Exp. Biol.*, V. 43, (2005), 773–781.
- [288] Yamane, Y., L'effet de la spiruline sur la néphrotoxicité chez le rat, présenté à Symposium annuel de la Société pharmaceutique du Japon, Avril 15, Pharmaceutiques Dept Chiba Univ. Japon, (Avril 15, 1988).
- [289] Torres-Duran, P. V., Miranda-Zamora, R., Paredes-Carbajal, M. C., Mascher, D., Ble-Castillo, J., Diaz-Zagoya, J. C., et al., Studies on the preventive effect of Spirulina maxima on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, V. 64, n°2, (1999), 141–147.
- [290] Khan, M., Shobha, J.C., Mohan, I.K., Naidu, M.U., Sundaram, C., Singh, S., Kuppusamy, P. et Kutala, B.K., Effect of Spirulina against doxorubicin-reduced cardiotoxicity. *Phytother. Res.*, V. 19, n° 12, (2005), 1030–1037.
- [291] Khan, M., Varadhara, S., Gansesa, L.P., Shobha, J.C., Naidu, M.U., Parmandi, N.L., Tridadapani, S., Kutala, B.J. and Kuppusamy, P., C-phycoyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 and ERK signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, V. 290, n°5, (2005), H2136–H2145.
- [292] Mark, F., Potentiel de la spiruline clinique en tant que source de phycocyanobiline : *Journal of food medicament*, V. 10, n°4, (2007), 566-570.
- [293] Wang, Y., Chang, C., Chou, J., Chen, H.L., Deng, X., Harvey, B.K., Caded, J.L. et Bickford, P.C., Dietary supplementation with blueberries, spinach, or Spirulina reduces ischemic brain damage. *Exp. Neurol.*, V. 193, (2005), 75–84.

- [294] Uglitskikh AK, Tsokova NB, *et al.* [Experience with a selenium-containing biological active supplement used in children with pneumonias in an intensive care unit]. [Article en russe, résumé en anglais]. *Anesteziol Reanimatol.*, n°1, (2006), 45-58.
- [295] Mascher, D., Paredes-Carvajal, M.C., Torres-Dura'n, P.V., Zamora- Gonza'lez, J., Di'az-Zagoya, J.C. et Jua'rez-Oropeza, M.A., Ethanolic extract of *Spirulina maxima* alters the vasomotor reactivity of aortic rings from obese rats. *Arch. Med. Res.*, V. 37, n° 1, (2005), 50–57.
- [296] Hsiao, G., Chou, P.H., Shen, M.Y., Chou, D.S., Lin, Ch. et Cheu, J.R., C-Phycocyanin, a very potent and novel platelet aggregation inhibitor from *Spirulina platensis*, *J. Agric. Food Chem.*, V. 53, n° 20, (2005), 7734– 7740.
- [297] Haque, S.E., Gilani, K.M., Effect of ambroxol, *Spirulina* and vitamin-E in naphthalene induced cataract in female rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, V. 49, n°1, (2005), 57–64.
- [298] Mao, K., Van de Water, J. and Gershwin, M.E., Effects of *Spirulina* based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *J. Med. Food*, V. 8, n°1, (2005), 27–30;
- [299] Cingi C, Conk-Dalay M, Cakli H, Bal C. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, V. 265, (2008), 1219–1223.
- [300] Chamorro, G., Pe'rez-Albiter, M., Serrano-Garci'a, N., Mares-Sa'mano, J.J. et Rojas, P., *Spirulina maxima* partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Nutr. Neurosci.*, V. 9, n°5–6, (2006), 207–212.
- [301] Ho M.W., 2006 : Green Algae for Carbon Capture & Biodiesel: Communiqué de presse de l'Institut ISIS en date du 25/05/2006. Consulté le 15/1/2009 ; Disponible sur le site internet : www.i-sis.org.uk/GAFCCAB.php.
- [302] Voltarelli, F-A. et De Mello, M-A-R., “*Spirulina* enhanced the skeletal muscle protein in growing rats”, *Eur J. Nut.*, V. 47, (2008), 939-400.

- [303] Lu, H-K., Hsieh, C-C., Hsu, J-J., Yang, Y-K. et Chou, H-N., “ Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress”, *Eur. J. Appl. Physiol.*, V. 98, n°2, (Septembre, 2006), 220-226.
- [304] Delpuech, F., Consumption as food and nutritional composition of blue-green algae among populations in the Kanem region of Chad. *Ann.Nutr.Aliment.*, V. 29, (1976), 497-516.
- [305] Kim, H.M., Lee, E.H., Cho, H.H. and Moon, Y.H., Inhibitory effect of mast cellmediate immediate-type allergic reactions in rats by spirulina. *Biochem. Pharmacol.*, V. 55, (1998), 1071–1076.
- [306] Pétrus, M., Assih, L., B. Horen, P., Lapebie, A., Trigatti, R., Culerrier, A., Barre, P., Rouge et Dutau, G., Premier cas d’allergie à la spiruline chez un enfant de treize ans ; *Revue française d’allergologie*, V. 50, (2010), 470–472.
- [307] Pétrus, M., Culerrier, R., Campistron, M., Barre, A. and Rougé, P., First case report of anaphylaxis to spirulin: identification of phycocyanin as responsible allergen. *Allergy*, (Nov. 4, 2009).
- [308] Borowitzka, M.A., « Evolution of closed photobioreactors.» 8th International Conference on Applied Algology (8th ICAA), Abstracts. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy, (26 september – 1 october 1999), 148 p.
- [309] François Doré-Deschênes, Utilisation des microalgues comme source d’énergie durable. Mémoire de maitrise, Universite de Sherbrooke, Canada, (2009) 101 p.
- [310] Harrigan, G.G. and Goetz, G., Symbiotic and dietary marine microalgae as a source of bioactive molecules-experience from natural products research, *Journal of Applied Phycology*, V. 14, (2002), 103-108.
- [311] Harrigan, G.G., Luesch, H., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., Nagle, D.G., Paul, V.J., Symplostatin 2: a dolastatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydnoides*. *J. Nat. Prod.*, V. 62, (1999), 655-658.

- [312] Jaki, B., Orjala, J. et Sticher, O., A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. J. Nat. Prod. 62, (1999), 502-503.
- [313] Mundt, S., Kreitlow, S., Nowotny, A. and Effmert, U., Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria, International Journal of Hygiene and Environmental Health, V. 203, (2001), 327-334.
- [314] Belay, A., Toshimitsu, K. et Yoshimichi, O., *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement, Ed. Dainippon Ink and Chemicals, Tokyo Japan (1996), Journal of applied Phycology, V. 8, (1996) 303-311.
- [315] Henrikson, R., Earth Food Spirulina [en ligne]. Laguna Beach, Californie : Ronore Enterprises, Inc. ISBN 0-9623111-0-3, 180 pages. c2000. [consulté le 13/12/2009]. Disponible sur : <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch5c.html>.
- [316] James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R. and Vasudevan, I., Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. Israeli Journal Of Aquaculture Bamidgah, V. 58, (2006), 97-104.
- [317] Kim, C.J., Yoon, S.K., Kim, H.I., Park, Y.H. and Oh, H.M., Effect of *Spirulina platensis* and probiotics as feed additives on growth of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, Journal of Microbiology and Biotechnology, V. 16, (2006), 1248-1254.
- [318] Razafindrajaona, Colloque international « Spiruline et Développement », 28-30 avril 2008, Tuléar, Madagascar, (2008).
- [319] Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, Acmar, Kato, T, Sakai, M., Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, V. 258, (2006), 157-163.
- [320] Henrikson, R., Healthy food for cats and dogs [en ligne]. Laguna Beach, Californie : Ronore Enterprises, Inc. ISBN 0-9623111-0-3, 180 pages. c2000. [consulté le 16/12/2009]. Disponible sur : <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch5c.html>.

- [321] La Wicca., Quand conseiller la spiruline aux animaux ? [en ligne]. c2007. [consulté le : 15/01/2010]. Disponible sur : <http://www.lawicca.com/ecologis/animaux/spiruline.php>.
- [322] La Wicca., Quel dosage pour les animaux ? [en ligne].c2007. [consulté le : 15/12/2009]. Disponible sur : <http://www.lawicca.com/ecologis/animaux/spiruline.php>.
- [323] Henrikson, R., Spirulina - Benefits for pets and animals [en ligne]. Laguna Beach, Californie : Ronore Enterprises, Inc. ISBN 0-9623111-0-3, 180 pages. c2000. [consulté le 15/12/2009]. Disponible sur : <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch5c.html>.
- [324] Henrikson R. Health, beauty and color for ornamental birds [en ligne]. Laguna Beach, Californie : Ronore Enterprises, Inc. ISBN 0-9623111-0-3, 180 pages. c2000. [consulté le 15/12/2009]. Disponible sur : <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch5c.html>.
- [325] Regunathan, C. et Wesley, S.G., Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using Spirulina as a carotenoid source, *Aquaculture Nutrition* , V.12, (2006), 425-432.
- [326] Toyomizu, M., Sato, K., Taroda, H., Kato, T. et Akiba, Y., Effects of dietary Spirulina on meat colour in muscle of broiler chickens, *British Poultry Science*, V. 42, (2001), 197-202.
- [327] Henrikson, R., Tonic for horses, cows and breeding bulls [en ligne]. Laguna Beach, Californie : Ronore Enterprises, Inc. ISBN 0-9623111-0-3, 180 pages. c2000. [consulté le 15/12/2009]. Disponible sur : <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch5c.html>.
- [328] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A., Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, V. 101, (2006), 87-96.

- [329] Henrikson, R., Natural colors for foods and cosmetics [en ligne]. Laguna Beach, Californie : Ronore Enterprises, Inc. ISBN 0-9623111-0-3, 180 pages. c2000. [consulté le 15/12/2009]. Disponible sur : <http://www.spirulinasource.com/earthfoodch5c.html>.
- [330] Algosopette La peau, les cheveux et les ongles avec la spiruline [en ligne]. c2007. [consulté le : 15/12/2009]. Disponible sur : <http://www.algosopette.com/association/spiruline-redactionnel-30.html>.
- [331] Algosopette. Spiruline et poids [en ligne]. c2007. [consulté le : 22/01/2010]. Disponible sur : <http://www.algosopette.com/association/spiruline-redactionnel-30.html>.
- [332] Ballinger, A.B. and Clark, M.L., L-phenylalanine releases cholecystokinin (CCK) and is associated with reduced food intake in humans: evidence for a physiological role of CCK in control of eating. *Metabolism*, V. 43, n°6, (Jun, 1994), 735-738.
- [333] Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C., Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, V. 79, (2002), 3-16.
- [334] Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H., Cheese: An Overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, pp. 1-18. Edited by P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee. London: Elsevier, (2004).
- [335] Ramet, J. P., Technologie comparée des différents types de caillés. In *Le fromage*, pp. 333-364. Edited by A. Eck & J. C. Gillis. Paris: Technique & Documentation, Lavoisier, (1997).
- [336] Cholet, C., Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire, thèse de doctorat, Institut national agronomique paris-grignon, (2006), 192 p.
- [337] Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. and Cogan, T. M., Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, V. 11, (2001), 259-274.

- [338] Gerrior, S. and Bente, L., Nutrient content of the U.S. food supply, 1909-1994. In *Home Economics Research*, report 53. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion, (1997).
- [339] Dana, E.S., A textbook of mineralogy, 4ème édition revue par Ford W.E., John Wiley et Sons, New York et Chapman et Hall, London, (1932).
- [340] Office nation de météorologie, station régional de Tamanrasset, (2009).
- [341] Le meste, M., Simatos, D. et Lorient, D., L'eau dans les aliments. Edition Technique et Documentation, Paris, (2002), 674 p.
- [342] Boussiba, S. et Richmond, A., Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*, *Arch. Microbiol.*, V. 120, (1979), 155-159.
- [343] Mansouri, A., Emberek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P., Phenolic profile and antioxydant activity of the Algerian ripe date fruit (*Phoenix dactylifera*), *Food chem.*, V. 48, (2005), 411- 426
- [344] Benamara, S., Gougam, H., Amellal, H., Djaouab, A., Benammed, A. et Noui, Y., Some technologic proprieties of common date (*Pheonix dactylifera* L.)*Am. J. Food technol.*, V. 3, n°2, (2008), 79-88.
- [345] Sanchez-Moreno, C., Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *International Journal of Food Science and Technologie*, V. 8, (2002), 121-37.
- [346] Maamri, S. et Djireb, F., Effets des extraits phénoliques de quelques plantes médicinales locales sur la carboxylesterase, *Mémoire Ing., Génie Biol.*, (2005).
- [347] Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P., Relationship between antioxydant proprieties and chemical composition of some Thai plants. *J. Food Composition and Analysis*, V. 21, 229-240.
- [348] Serres, L. et Amarigios, PETRANSEXIEM : Analyses physiques et chimiques. *In* : Contrôle de la qualité des produits laitiers, Direction des services vétérinaires, Ministère de l'Agriculture, France, (1973).

- [349] AOAC : Official methods of analysis. 3rd ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, US, (1990).
- [350] Cerbulis, J., Farrel, H.M., Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.*, V. 58, (1975), 817-827.
- [351] Rowland, S.J., The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res.*, V. 9, (1938), 42-46.
- [352] AOAC: Official methods of analysis. 15th ed., 2nd Suppl. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, US, (1991).
- [353] Mietton, B., La préparation des laits de fromagerie en technologie de pâtes molles. *Ind. Alim. Agric.*, V. 103, (1986), 951-963.
- [354] Mietton, B., Les rendements en fromagerie, Eléments de méthodologie pour une meilleure détermination et utilisation des données, Rev. ENIL., V. 104, (1986), 6-16.
- [355] Vandeweghe, J., Le rendement en fromage, prédétermination et mesure. *In* : A. ECK (éd.) : Le fromage, Technique & Documentation - Lavoisier, 2ème édition, Paris, (1987), 467-475.
- [356] Elalaoui A. C., Fertilisation minérale des cultures : les oligo-éléments secondaires et les oligo-éléments. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA N° 156. Transfert de technologie en agriculture. Maroc, (2007), 4p.
- [357] Guiraud J.-P., Microbiologie alimentaire. 2^{ème} édition Dumond, Paris, (2003), 651p.
- [358] Abu G. A., Ogbonda K. H. et Amingo R., Optimization studies of biomass production and protein biosynthesis in a *Spirulina Sp* isolated from an oil. Polluted flame pitin the Niger Delta. *African Journal of Biotechnology*. V. 22, (2007), 2250-2554.

- [359] Desmorieux H. et Hernandez F., Biochemical and physical criteria of spirulina after different drying processes : Proceeding of the 14th international drying symposium: Sao paulo; Brazil; V. B., 900-907.
- [360] Cheftel J.-C., Cheftel H., Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, V. 2. Edition Apria, Paris, (1979), 238p.
- [361] Espirad E., Introduction à la transformation industrielle des fruits. Edition Technique et Documentation, Paris, (2002), 360p.
- [362] Oliveira E.G. ; Rosa G. S.; Moraes M. A., L. A. A. Pinto, Moisture sorption characteristics of microalgae *Spirulina platensis*. Braz. J. Chem. Eng. V. 26, n°.1 São Paulo, (2009).
- [363] Razafindra J.M., Rakotozandriny J. D. N., Rakotozandrindrainy R., Randria J. N. et Ramam piherika K/ D., Etude la valeur nutritionnelle de la spiruline de Madagascar (*Spirulina platensis* Var. *Toliara*), (19--), 161-188.
- [364] Van Rijn J. and Shilo M., Nitrogen Limitation in Natural Populations of Cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and Its Effect on Macromolecular Synthesis Appl Environ Microbiol. V. 52 n° 2, (1986), 340-344.
- [365] Abd el baky H. H., El baz F. K., El baroty G. S., Production of antioxydant by the green alga *Dunaliella salina*. Int. J. Agri. Biol. V.1037, (2004), 49-57.
- [366] Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS, Over-production of lipid rich in linolenic acid by blue green alga *Spirulina maxima* and its inhibitory effect on Carcinoma cells. Ad Food Sci., V.4, (2006), 206-212.
- [367] Athukorala Y, Nam K, Jeon Y., Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. Food Chem. Toxicol., V. 44, (2006), 1065-1074.

- [368] Colla L.M., Furlong E.B. et Costa J. A. V., Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperature and nitrogen regimes. *Brazilian archives of biology and technology*; V. 50, n° 1, (2007), 161-167.
- [369] Fogg G.E., *Metabolic pattern and growth in alga cultures and phytoplankton ecology*. 2nd ed, Univ. Wisconsin Press, (1975), 52-61.
- [370] El-Baz F.K., Aboul-Enein A.M., El-Baroty G.S., Youssef A.M., Abd El-Baky H., Anticarcinogenic activity of algal extracts. *J. Med. Sci.*, V.2, (2002), 243-251.
- [371] Abd El-Baky, H.H. Blue green alga *Spirulina Sp.* and its inhibitory effect on growth. Ehrlich ascites carcinoma cells. *J. Med. Sci.* V.3, (2003), 314-324.
- [372] Abi azar R., *Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus* (2007).
- [373] Luquet F.M., 1985. *Lait et produits laitiers. Vache, brebis, chevre. Les laits. De la mamelle à la laiterie.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- [374] Mahaut M., Jeantet R., Brule G., *Initiation à la technologie fromagère.* Tec & Doc, Paris, France, (2000), 1-21.
- [375] Bocquier F., Caja G., *Production et composition du lait de brebis : effets de l'alimentation*, *INRA Prod. Anim.* V.14, (2001), 129- 140.
- [376] Swaisgood H.E., *Association of casein aggregates.* In: *Developments in Dairy Chemistry. Proteins.* Fox P.F. ed., Applied Science Publishers, London, (1982), 41-59.
- [377] Remeuf F. : *Relations entre caractéristiques physico-chimiques et aptitudes fromagères des laits. Spéciale qualité du lait.* *Rec. l Méd. Vét.*, Juin-Juillet (1994), 359-365.
- [378] Veisseyre R., *Technologie du lait.* 3e édition. La Maison Rustique, Paris, France, (1975), 713p.

- [379] Grappin R.: Bases and experiences of expressing the protein content of milk - France. *J. Dairy Sci.*, V. 75, (1992), 3221-3227.
- [380] Ribadeau-Dumas B., Actualites dans le domaine de la connaissance de la structure et des proprietes biochimiques des proteines laitieres. *Rev. Lait. Fr.*, V.400, 17-32.
- [381] Walstra P., Jenness R., In: *Dairy Chemistry and Physics*, Publication John Wiley & sons Inc, New York, USA, (1984), 467p.
- [382] Sraïri M.T., I. Hasni A., Hamama A. et Faye B., Relations entre pratiques d'élevage et qualité globale du lait de vache en étables suburbaines au Maroc. *Revue Méd. Vét.*, V. 156, n°. 3, (2005), 155-162.
- [383] Brule G., Lenoir J., Remeuf F., La micelle de caséine et la coagulation du lait. In: *Le Fromage*, 3e edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, (1997), 7-41.
- [384] Belitz H.D., Grosch W., *Food Chemistry* ed. Springer Verlag, Berlin, (1987), 992 p.
- [385] Alais C., *Science du lait. Principes des Techniques Laitières*. 4^e edition, Sepaic, Paris, (1984), 814p.
- [386] Plusquellec A. : *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-Alimentaires : le contrôle microbiologique*. In Luquet F.M. (éd.) *Laits et produits laitiers*. Edition technique et documentation, Lavoisier, Paris, (1991), 334-353.
- [387] Marshall RJ., An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *J Dairy Res*. V. 49, (1982), 329-336.
- [388] Storry JE, Grandison AS, Millard D, Owen AJ, Ford GD., Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminants. *J Dairy Res* V. 50, (1983), 215-229.
- [389] Weber F., L'égouttage du coagulum. In: *Le fromage* (Eck A, ed) Lavoisier-Tech et Doc, Paris, (1984), 22-36.

- [390] Grandison AS, Ford GD, Millard D, Owen AJ., Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from cows during early lactation. *J Dairy Res* V.51, (1984), 407- 416.
- [391] Grandison AS, Ford GD, Millard D, Anderson M., Interrelationships of chemical composition and coagulation properties of renneted milks from dairy cows grazing ryegrass or white clover. *J Dairy Res* V. 52, (1985), 41-46.
- [392] Rahali V., Menard J.L., Influence des variants génétiques de la α -lactoglobuline et de la k-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Le lait*, V. 71, (1991), 275-299.
- [393] Fox P.F., Factors that affect the quality of cheese. *Cheese Art*, Ragusa, (2002), 123-158.
- [394] Guerzoni M.E., Vannini L., Chavez-lopez C., Lanciotti R., Suzzi G., Gianotti A., Effect of high Pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheese. *J. Dairy Sci.*, V. 82, (1999), 851-862.
- [395] Portmann A., Pierre A., Vedrenne P., Relation entre teneurs en matière grasse et azotée du lait de chèvre et rendement en fromage. *Rev. Laitière Fr.*, V. 251, (1968), 97-101.
- [396] Ricordeau G., Mocquot G., Influence des variations saisonnières de la composition du lait de chèvre sur le rendement en fromage. Conséquences pratiques pour la sélection. *Ann. Zootech.*, V. 16, (1967), 165-181.
- [397] Maubois J.L., Mocquot G., L'appréciation des rendements en fromagerie. *Le lait*, V. 507, (1971), 416-420.
- [398] Gilles J., Lawrence R.C., The yield of cheese. *New Zeal. J. Dairy Sci.*, V. 20, (1985), 205p.
- [399] Colin O., Laurent F., Vignon B., Variations du rendement fromager en pâte molle. Relations avec la composition du lait et les paramètres de la coagulation. *Le lait*, V. 72, (1992), 307-319.

- [400] Anonyme, Enrichissement du yaourt par la spiruline : Projet de fin d'étude d'ingénieur : Faculté des sciences agro-vétérinaires, Université de Blida, (2009).
- [401] Bourgeois C.M. et Larpent J.P., Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaire, tome 2, Ed. Technologie et Documentation Lavoisier, Paris, (1996), 523p.