

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département d'Agroalimentaire



THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences agronomiques

ETUDE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE L'INFLUENCE DE *SPIRULINA PLATENSIS* ET
CHLORELLA PYRENOIDOSA SEULE ET EN ASSOCIATION SUR LA FLORE
INTESTINALE

Présentée par

Imane HAMOUDA HAMOUDA ALI

Devant le jury composé de :

A. Hadj Ziane	Professeur	U. de Blida1	Présidente
H. Aggad	Professeur	U. de Tiaret	Examineur
A. Dilmi Bouras	Professeur	U. de Chlef	Examineur
A. Riba	Professeur	U. de Boumerdes	Examineur
S. Megateli	Maitre de conférence (A)	U. de Blida 1	Examineur
A. Doumandji	Professeur	U. de Blida 1	Directrice de Thèse

Blida, 13 Avril 2019

RESUME

L'émergence de problème de la multi-résistance de bactéries pathogènes et le déséquilibre de l'écosystème intestinal due à l'utilisation accrue des antibiotiques et qui nécessite la recherche de nouveaux traitements naturels comme alternative aux produits synthétiques, dont les microalgues représentent une bonne source de molécules bioactives doués des activités biologiques. Cette thèse est consacrée principalement à la valorisation biologique de cette biomasse naturelle comme aliment fonctionnel nourrissant le microbiote intestinal.

Ce travail a consisté, dans un premier temps à une caractérisation phytochimique d'une cyanobactérie appartient à l'espèce *Spirulina platensis* et une chlorophyte appartient à l'espèce *Chlorella pyrenoidosa* ainsi qu'une contribution à l'isolement et la caractérisation des extraits organiques. L'étude antimicrobienne comparative des extraits issus des deux microalgues a montrée que les extraits de *Chlorella pyrenoidosa* ont un effet promoteur contre les bactéries à Gram négatif et les champignons. Le spectre antimicrobien le plus important a été observé avec l'extrait méthanolique à l'égard d'*Escherichia coli* ($48 \pm 7,07$ mm) avec une CMI de $> 198 \pm 2,12$ µg/ml. Ce potentiel antimicrobien de l'extrait est du probablement à sa richesse en acide gras, avec douze composants dont trois dominants : l'acide α -linoléique (ALA) (C 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) avec 13,91 % suivi par l'acide linoléique (C 18:2 $\Delta^{9,12}$) (ALA) avec 13 % et l'acide palmitique (C16:0) avec 11,83 %, en composés phénoliques et caroténoïdes.

Dans un deuxième temps, une étude a été menée pour évaluer l'effet *in vitro* de la supplémentation des deux microalgues sur la survie et l'antagoniste de la souche bifide autochtone BHI 07 qui a été retenue après un criblage comme étant la meilleure souche à propriétés technologiques et probiotiques, avec les espèces isolées de la flore intestinale résidente. Une concentration de 10 % de supplémentation en chlorelle a montré un effet antibactérien très intéressant à l'égard des deux souches *Escherichia coli* et *Bacteroides* sp. avec un diamètre d'inhibition de $33,5 \pm 1,3$ mm et $25,34 \pm 0,48$ mm, respectivement. Mais en contre temps une légère inhibition a été constatée sur les deux souches lactique

Lactobacillus sp. et *Bifidobacterium bifidum* BHI7 avec un diamètre d'inhibition de $6,35 \pm 0,5$ mm et $6 \pm 0,82$ mm.

Dans un troisième temps, une étude *in vivo* sur des lapereaux a été menée pour évaluer l'influence de la supplémentation avec une concentration de 5 % de la spiruline et de la chlorelle ainsi que la combinaison des deux (2,5 % de chaque algue) sur les paramètres suivants : l'implantation et la diversification de la flore intestinale, après provocation d'une entérite par la souche pathogène *E. coli*, le contrôlant des paramètres zootechniques et l'état de santé des lapins expérimentaux.

Une légère influence de régime supplémente a été constatée dans les trois lots 01, 02 et 03 sur le gain du poids (54,5 g, 66,67 g et 60 g, respectivement) et la prise alimentaire (55,43 g, 66 g et 58,24 g, respectivement). Nous pouvons constater que le type d'alimentation (challenge d'aliment) a influencé significativement sur la gravité de l'infection entérocolite toute en diminuant la charge des deux bactéries *E. coli* et *Clostridium* sp. avec un taux de survie de 32,29 %, 24,82 % et 27,32 % dans les trois lots 2, 3 et 4, respectivement, ainsi que sur l'implantation de la souche probiotique BHI7 dont nous avons enregistré un taux de survie de 33,29 %, 35,10 % et 33,57 %, respectivement.

D'après l'analyse de la structure histologique, nous avons constaté que le type d'alimentation a influencé significativement sur la reconstruction de la structure de la muqueuse après sa déformation après provocation de l'entérite. Une supplémentation de 5 % de la poudre algale dans le régime alimentaire du lapin peut être une alternative à une antibiothérapie dans le cas d'une infection bactérienne due à *Escherichia. coli*.

Finalement, ce travail confirme le potentiel de ces deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* comme source de molécules bioactives et qui pourraient conduire à l'élaboration de nouveaux produits fonctionnels et une alternative à l'antibiothérapie.

Mots clés : *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., microbiote, *Bifidobacterium* sp., application antimicrobienne, infection.

ABSTRACT

The emergence of multiresistance-pathogenic-bacteria problem and the imbalance of the microbiota due to the increased use of antibiotics in the treatment of the infectious diseases and which involve the urgent need for the development of alternative therapies to the synthetic drugs from various natural sources, which microalgae represent a source of bioactive compounds, that show to exhibit biological activities. This thesis is dedicated in most cases to the biological promotion of this natural biomass as functional food nourishing the intestinal microbiote.

At the first time, a phytochemical characterization of a Cyanobacteria *Spirulina platensis* and a green algae *Chlorella pyrenoidosa* was consecrated as well as a contribution in isolation and characterization of organic extracts. The comparative antimicrobial study of the two microalgae-extracts has shown that the green alga *Chlorella pyrenoidosa* extracts have a promoter effect against Gram negative bacteria and fungi. The most important antimicrobial spectrum was observed with methanolic extract against *Escherichia coli* (48 ± 7.07 mm) with a MIC of $> 198 \pm 2.12$ $\mu\text{g/ml}$. The antimicrobial potential of the extract is probably due to its wealth in fatty acids, with twelve components among which three predominates : α -linolenic acid (ALA) (C 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) with 13,91 % followed by linoleic acid (C 18:2 $\Delta^{9,12}$) (AL) avec 13 % et palmitic acid (C16:0) with 11.83 % and phenolic compounds and pigments.

In the second time, a study was conducted to evaluate *in vitro* the effect of the microalgae-supplementation on the survival and antagonist of the Bifidobacteria strain BHI 07, with species isolated from the resident gut flora, and which was kept after screening as being the best strain according to technological and probiotic property, with the other strains. A concentration of 10 % of chlorella-supplementation showed a very interesting antibacterial effect with exhibited spectrum (33.5 ± 1.3 mm and 25.34 ± 0.48 mm) against *Escherichia coli* and *Bacteroides* sp, respectively. However, the *Bifidobacterium bifidum* BHI 7 and

Lactobacillus sp. strain were appeared a slight inhibition with 6.35 ± 0.5 mm and 6 ± 0.82 mm, respectively.

Thirdly, the influence of *Spirulina* and *Chlorella*-supplementation at 5 % alone and in combination was evaluated in rabbit's *in vivo* study. The implantation and diversification of intestinal flora were determinate, after provocation of enteritis by the *E. coli* pathogenic strain. Also, the growth performance and the sanitary risk or rabbits were controlled.

In the three experimental batches 1, 2 and 3, a slight influence of supplementary regime was determined on the body weight (54.5 g, 66.67 g and 60 g, respectively) and the feed intake (55.43 g, 66 g et 58.24 g, respectively). We can notes that the challenge food was influenced significantly to one the seriousness of the enterocolitis while decreasing the load of both-infection-microbes *E. coli* and *Clostridium* sp. with a survival rate of 32.29 %, 24.82 % and 27.32 % in batches 2, 3 and 4, respectively and on the establishment of the probiotic strain BHI 7 with an survival rate of 33.29 %, 35.10 % and 33.57 %, respectively.

According to the histological structure analysis, we noted that the feeding-type influenced significantly on the reconstruction of the mucous-membrane structure after its distortion after provocation of the enteritis. A supplementation with 5 % of the algal-powder in the diet-rabbit can be an alternative in an antibiotherapy in the case of a bacterial infection owed to *Escherichia. coli*.

Finally, this work confirms the potential of microalgae as a source of bioactive molecules that could lead to the development of new functional products.

Key words: *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., microbiota, *Bifidobacterium* sp., antimicrobial application, infection.

ملخص

ظهور مشكلة المقاومة المتعددة للبكتيريا المسببة للأمراض وعدم التوازن في النظام الوظيفي المعوي بسبب كثرة استخدام المضادات الحيوية مما يتطلب البحث عن علاجات طبيعية جديدة كبديل للمنتجات الصناعية المركبة، حيث ان الطحالب المجهرية تمثل مصدر فعال للجزيئات النشطة حيويًا والتي تتمتع بالأنشطة البيولوجية. هذه الأطروحة مخصصة بشكل أساسي للتقييم البيولوجي لهذه الكتلة الحيوية الطبيعية كغذاء وظيفي يغذي الكائنات الحية الدقيقة المعوية.

في مرحلة أولى، خصص توصيف نباتي كيميائي لطحلتي *Spirulina platensis* و *Chlorella pyrenoidosa* بالإضافة إلى عزل وتوصيف المستخلصات العضوية. حيث انه أظهرت دراسة مقارنة المستخلصات العضوية للمضادات الميكروبات، انه مستخلص الطحلبة الخضراء *Chlorella pyrenoidosa* كان له تأثير معزز ضد البكتيريا جرام إيجابي والفطريات. لوحظ أهم طيف مضاد للميكروبات مع مستخلص الميثانول ضد البكتيريا *Escherichia coli* (م) مع $2.12 \pm 198 < \text{MIC}$ ميكروغرام / مل. هذه الإمكانيات المضادة للميكروبات في الخلاصة ترجع على الأرجح إلى محتواها الدهني العالي، حيث ان تحليل هذه المركبات بالكروماتوغرافيا غاز أظهرت على احتوائه لاثنا عشر مركب من بينهم ثلاث سائدة : حمض α -لينولينيك ($\Delta^{9,12,15}$ C 18:3) بنسبة 13,91%، حمض لينوليك ($\Delta^{9,12}$ C 18:2) بنسبة 13%، حمض البالميتيك بنسبة 11,83%، ايضا احتوائه على المركبات الفينولية و لكاروتينات.

في مرحلة ثانية، قد أجريت دراسة في المختبر لتقييم أثر التغذية التكميلية للطحلوتين المجهريتين وذلك على البقاء على قيد الحياة للبكتيريا BHI 07 التي تم اختيارها بعد الفحص الخصائص التكنولوجية والبروبيوتيك، على أنها السلالة الأفضل والخصم بينها وبين السلالات البكتيريا المعوية الأخرى. حيث انه، تركيز 10% من مكملات *Chlorella* أظهرت تأثير مضاد للبكتيريا مثيرة جداً ضد البكتيريا المعوية *Escherichia coli et Bacteroides sp.* وقد أظهرت منطقة تأثير $1,3 \pm 33,5$ مم، $0,48 \pm 25,34$ مم، على التوالي. ولكنه في نفس الوقت، قد اظهر تأثير طفيف على البكتيريتين اللبنيتين: *Lactobacillus sp.* و *Bifidobacterium bifidum* BHI7 وقد سجلت مناطق تأثير كالآتي: $0,82 \pm 6,35$ مم، $0,5 \pm 6$ مم، على التوالي.

ثالثاً، قد أجريت دراسة حية على ارناب لتقييم تأثير المكملات بتركيز 5% سيبرولينا و 5% الكلورلا والجمع بين الاثنين (2,5% لكل واحدة) في إنشاء وتنوع البكتيريا المعوية وذلك بعد استفزاز الأمعاء بواسطة سلالة الإشيرشيا المسببة للأمراض القولونية مع مراقبة تقنيات العناية بالحيوان والحالة الصحية للأرناب التجريبية. وقد عثر انه المدخول الغذائي له تأثير طفيف على زيادة الوزن في الدفعات التجريبية 1، 2 و 3 ($54,5$ غ، $66,67$ غ، 60 غ، على التوالي) و تناول الطعام ($55,43$ غ، 66 غ و $58,24$ غ، على التوالي). وقد تمكنا من ملاحظة تأثيره إلى حد كبير لنوع الغذاء على مدى خطورة الإصابة، وذلك بتناقص حمولة البكتيريتين المسببتين للإسهال الإشيرشيا، وكلوستردييوم، وقد سجلت نسبة البقاء على قيد الحياة في الدفعات التجريبية 2، 3 و 4 ($32,29$ %، $24,82$ % و $27,32$ %، على التوالي). والذي ساهم ايضا في زرع سلالة BHI7، وذلك بتسجيل نسبة البقاء على قيد الحياة $33,29$ %، $35,10$ % و $33,57$ %، على التوالي.

وفقا لتحليل الهيكل النسيجي، وجدنا أن نوع الغذاء التي أثرت إلى حد كبير على إعادة بناء هيكل البطانة بعد تشوه بعد استفزاز التهاب الأمعاء. تركيز 5% من مسحوق الطحالب في النظام الغذائي للأرناب يمكن استعماله كبديل للمضادات الحيوية في حالة عدوى بكتيرية تسببها الإشيرشيا القولونية.

الكلمات المفتاحية : *Spirulina sp.*، *Chlorella sp.*، البكتيريا المعوية، *Bifidobacterium sp.*، تطبيق مضاد للميكروبات، العدوى.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes remerciements les plus sincères à : Dieu, tout Puissant de m'avoir ouvert les portes du savoir et de m'avoir donné le courage et la volonté pour mener à terme mon travail.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques et le Centre Algérien de Contrôle de qualité et d'emballage.

Je tiens à remercier Pr. BECHARI Khaldoun (Directeur de Centre de recherche et Technique en Analyses physicochimiques) et Dr. BOUDRICHE Lyliya (Directrice de la Division Produit Naturel et Science Alimentaire) ainsi que Mr. le Directeur du Centre Algérien de Contrôle de qualité et d'emballage pour ces contributions à la réalisation du travail.

Je remercie chaleureusement Professeur DOUMANDJI Amel (Université de Blida 1), ma directrice de thèse, et lui exprime toute mon amicale et immense reconnaissance. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée. Je lui suis reconnaissant pour la liberté qu'elle m'a laissée quant à l'orientation et la conduite de cette thèse et de m'avoir laissé me débrouiller et que pour ses qualités pédagogiques et enthousiasme communicatif dont elle sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Je tiens à remercier chacun des membres du jury, de me faire bénéficier de leur expertise en acceptant de juger ce travail et de consacrer du temps à l'examen de ce manuscrit. Pr. HADJ ZIANE Amel (Université de Blida 1) de m'avoir accordé l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur le Pr. AGGAD Hebib (Université de Tiaret) d'avoir accepté sans hésitation d'examiner ce travail et avec immense reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire (Nutrition et Pathologie Animale, Université IBN KHALDOUN, Tiaret) avec gentillesse et bienveillance.

Je tiens à remercier Monsieur le Pr. DILMI BOURAS Abdelkader (Université de Chlef) d'avoir accepté sans hésitation de faire partie des jurys d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Pr. RIBA A. (Université de Boumerdes) d'avoir accepté sans hésitation de faire partie des jurys d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Dr. MEGATLI Smain (Université de Blida 1) d'avoir accepté sans hésitation de faire partie des jurys d'examiner ce travail, malgré leurs nombreuses préoccupations.

Je tiens à remercier aussi tous les membres du laboratoire de Chromatographie, les membres du laboratoire de spectrophotométrie d'absorption atomique, pour leurs conseils, leurs soutiens, leurs suivis et les passionnantes discussions.

Je tiens également remercier tous les membres de l'atelier de Lyophilisation, microscope électronique à balayage et analyse thermographique.

Je veux également remercier Dr. GUEMOUR Djellali (Laboratoire de Nutrition et Pathologie Animale, Université de Tiaret) pour tout ce qu'il m'a appris, pour sa disponibilité, ses réponses rapides et pour ses conseils avisés et Je remercie vivement son équipe de recherche pour essentiellement Mr. ABDALI Mustapha et Mr. Redouane pour leur sympathie, leur aide efficace et sans faille de la réalisation de l'étude *in vivo*.

Je tiens à remercier ma famille et mes proches pour leur soutien pendant ces six ans, et à toutes celles et ceux que j'ai malencontreusement oubliés, j'adresse mes plus plates excuses et vous remercie également.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	2
TABLE DE MATIERE	3
LISTE DES ILLUSTRATION GRAPHIQUES ET TABLEAUX	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1 : MICROALGUES : UNE BIOMASSE DIVERSIFIEE ET SOURCE POTENTIELLE DE MOLECULES BIOACTIVES	10
1.1 Généralités sur les microalgues	10
1.2 Utilisation des algues	12
1.3 Critères de classification des algues	12
1.3.1 Diversité et classification	12
1.3.2 Description des différentes classes d'algues	14
1.4 Les différentes classes de pigments	17
1.4.1 Chlorophylles	17
1.4.2 Phéopigments	19
1.4.3 Caroténoïdes	20
1.4.4 Phycobiliprotéines	21
1.5 Activité antibactérienne des micro-algues des eaux douces	23
1.5.1 Composés antibactériens des microalgues d'eau douce	26
1.5.2 Mécanisme d'action des agents antibactériens	30
1.6 <i>Spirulina</i> sp.	32
1.6.1 Historique	32
1.6.2 Systématique	33
1.6.3 Morphologie et caractères généraux	37
1.6.4 Ultrastructure	39

1.6.5	Cycle biologique	39
1.6.6	Composition nutritionnelle	40
1.7	<i>Chlorella</i> sp.	41
1.7.1	Historique et taxonomie	41
1.7.2	Morphologie	43
1.7.3	Reproduction	45
1.7.4	Production	46
1.7.5	Composition nutritionnelle	47
CHAPITRE 2 : MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN		50
2.1	Caractéristiques du microbiote intestinal	50
2.2	Fonctions du microbiote intestinal	51
2.3	Interactions entre microbiote et alimentation	53
2.4	Probiotiques	53
2.5	Classification des probiotiques	55
2.6	Bifidobactéries	57
2.6.1	Taxonomie et habitat	57
2.6.2	Morphologie et propriétés physiologiques	58
2.6.3	Besoins nutritionnels des bifidobactéries et facteurs bifidogènes	59
2.7	Probiotiques et renforcement de la barrière intestinale	61
2.8	Prébiotiques	64
2.8.1	Définition	64
2.8.2	Différentes classes des prébiotiques	64
2.8.3	Mode d'action des prébiotiques	65
2.9	Epithélium intestinal	65
2.9.1	Structure de la muqueuse intestinale	65
2.9.2	Rôle immunitaire de l'intestin grêle	69
CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES		72
3.1	Contexte et démarche	72
3.2	Lieux de travail	74
3.3	Matériel	74
3.3.1	Matériel biologique	74
3.3.2	Disques d'antibiotiques	76

3.3.3 Milieux de cultures	76
3.4 Méthodologies	76
3.4.1 Analyse nutritionnelle et phytochimique des poudres algales des espèces : <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	76
3.4.1.1 pH	77
3.4.1.2 Acidité titrable	77
3.4.1.3 Détermination de la teneur en humidité	77
3.4.1.4 Détermination de la teneur en protéines : Méthode de Kjeldahl	78
3.4.1.5 Détermination du taux de la matière grasse	79
3.4.1.6 Analyse de profile des esters méthyliques des acide gras	80
3.4.1.7 Détermination du taux de sucres totaux	80
3.4.1.8 Détermination du taux des cendres	81
3.4.1.9 Dosage des minéraux	82
3.4.1.10 Calcul de la valeur énergétique	83
3.4.1.11 Analyse élémentaire par fluorescence des rayons X	83
3.4.1.12 Analyse par analyse thermogravimétrique	84
3.4.1.13 Analyse de la microstructure par microscope électronique à balayage	85
3.4.2 Extraction des molécules bioactives et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques	85
3.4.2.1 Préparation des extraits à partir des poudres de <i>Spirulina platensis</i> et de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	85
3.4.2.2 Calcul du rendement d'extraction	88
3.4.2.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques	
3.4.2.4 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits organiques	90
3.4.2.5 Analyse phytochimique des extraits organiques	91
3.4.2.6 Analyse des polyphénols par chromatographie liquide à haute performance des extraits bruts hydro-méthanoliques	93
3.4.2.7 Analyse spectrale des extraits hydro-méthanoliques	94
3.4.3 Caractérisation et criblage des souches probiotiques de bactéries lactiques et pseudolactiques isolées de différents biotopes	95
3.4.3.1 Isolement et cultures des bactéries lactiques et pseudolactiques autochtones isolées	95

3.4.3.2	Purification et conservation des isolats	96
3.4.3.3	Identification des souches isolées	96
3.4.3.4	Etude du potentiel probiotique des souches lactiques et pseudolactiques	101
3.4.3.5	Etude des propriétés technologiques des souches d'intérêt	102
3.4.3.6	Etude de la résistance des souches d'intérêt aux antibiotiques ...	103
3.4.3.7	Activité antimicrobienne des souches d'intérêt	104
3.4.4	Etude, <i>in vitro</i> de l'activité antagoniste de la spiruline et de la chlorelle à l'égard des espèces du microbiote intestinal	105
3.4.4.1	Isolement et identification des souches	106
3.4.4.2	Repiquage et revivification des souches	106
3.4.4.3	Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sur le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance de la souche <i>Bf. bifidum</i>	107
3.4.4.4	Etude de l'antagonisme de la souche probiotique <i>Bf. bifidum</i> à l'égard des trois souches du microbiote intestinal	108
3.4.4.5	Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sur l'interaction des espèces isolées du microbiote intestinal	109
3.4.5	Etude <i>in vivo</i> de l'influence de la spiruline et de la chlorelle seule et en association sur la prolifération et la diversification du microbiote intestinal des lapereaux	110
3.4.5.1	Condition d'élevage des lapins	110
3.4.5.2	Régimes alimentaires expérimentaux	110
3.4.5.3	Lots expérimentaux	112
3.4.5.4	Analyses chimiques des régimes expérimentaux	112
3.4.5.5	Inoculation des lapins avec la souche test <i>Bf. bifidum</i> et provocation de l'infection expérimentale par <i>Escherichia coli</i>	113
3.4.5.6	Suivi des paramètres zootechniques et sanitaires	113
3.3.5.6.1	Performance de croissance	113
3.3.5.6.2	Suivi de la santé	114
3.3.5.6.3	Mesure de l'ingestion et de la digestibilité	115
3.4.5.7	Etude des paramètres du système digestif	116

3.3.5.7.1	Prélèvement des échantillons	117
3.3.5.7.2	Méthodes d'analyses chimiques et microbiologiques	117
3.4.5.8	Etude histologique	118
3.4.5.9	Risque sanitaire	119
3.4.6	Analyses statistique	119

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION **120**

4.1	Résultats de l'analyse nutritionnelle de la spiruline et de la chlorelle	120
4.1.1	pH	120
4.1.2	Acidité titrable	120
4.1.3	Teneur en eau	120
4.1.4	Taux de protéine	122
4.1.5	Taux de la matière grasse	122
4.1.6	Taux de cendre	122
4.1.7	Taux des glucides	122
4.1.8	Valeur calorique	123
4.1.9	Teneur en éléments minérales par spectrométrie d'absorption atomique	
4.1.10	Résultats du profil des acides gras des deux poudres de microalgue	
4.1.11	Résultats de l'analyse élémentaire par fluorescence des rayons X	130
4.1.12	Résultats de l'analyse de l'analyse thermogravimétrique	132
4.2	Résultats des observations microscopiques des microalgues	135
4.3	Extraction et identification des différentes fractions organiques à partir de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	136
4.3.1	Rendement et couleurs	136
4.3.2	Résultats d'analyse phytochimique des extraits organiques	137
4.4	Résultats d'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits organiques	139
4.5	Identification des composés polyphénoliques par l'analyse de HPLC.	145
4.6	Analyse spectrale des extraits sélectionnés de <i>S. platensis</i> et <i>C. pyrenoidosa</i>	147
4.6.1	Spectroscopie UV	148
4.6.2	Spectroscopie IR	148

4.7 Résultats de la caractérisation et du criblage des souches lactiques et pseudolactique à potentiel probiotique isolées de différents biotopes	149
4.7.1 Résultats de l'identification des bactéries lactiques et pseudolactiques.	149
4.7.2 Résultats d'évaluation des propriétés probiotiques des souches lactiques et pseudolactiques	158
4.7.2.1 Résultats de la tolérance aux faibles pH	158
4.7.2.2 Résultats de la tolérance aux sels biliaires	159
4.7.3 Résultats des propriétés technologiques	166
4.7.4 Résultats de la résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques	168
4.7.5 Activité antimicrobienne des souches d'intérêt	171
4.8 Etude, <i>in vitro</i> de l'activité antagoniste de la spiruline et de la chlorelle à l'égard des espèces du microbiote intestinal	173
4.8.1 Résultats d'isolement et identification des espèces du microbiote intestinal	173
4.8.2 Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sur le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance de la souche <i>Bf. bifidum</i>	176
4.8.3 Etude de l'antagoniste de la souche probiotique <i>Bf. bifidum</i> à l'égard des trois souches du microbiote intestinal	180
4.8.4 Etude de l'activité inhibitrice de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i> vis-à-vis les souches du microbiote intestinal	181
4.8.5 Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i> sur l'interaction des espèces isolées du microbiote intestinal	182
4.9 Etude <i>in vivo</i> de l'influence de la spiruline et de la chlorelle seule et en association sur la prolifération et la diversification du microbiote intestinal des lapereaux	184
4.9.1 Résultats d'évaluation de l'efficacité nutritionnelle des différents régimes sur les paramètres zootechniques	185
4.9.2 Résultats des autopsies et diagnostic des causes de morbidité et de Mortalité	186
4.9.3 Résultats d'anatomie descriptive des compartiments digestifs	188

4.9.4	Résultats de l'étude des paramètres physicochimiques du tube digestif des lapereaux	189
4.9.5	Résultats de de l'analyse bactériologique de la flore fécale et caecale des lapins	191
4.9.6	Résultats de l'influence du régime alimentaire sur l'infection et la structure histologique de l'intestin grêle des lapereaux	196
	CONCLUSION GENERALES	202
	APPENDICES	205
	REFERENCES	232

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUE ET TABLEAUX

Figure 1.1	Les différentes formes de microalgues	11
Figure 1.2	Structure des différentes chlorophylles	19
Figure 1.3	Structure chimique du phéophorbide a	20
Figure 1.4	Structure chimique de caroténoïdes	20
Figure 1.5	Cycle des xanthophylles chez les Chlorobiontes	21
Figure 1.6	Cycle des xanthophylles chez les ochrophytes	21
Figure 1.7	Structure de la phycocyanobiline	22
Figure 1.8	Disposition des phycobilines dans un phycobilisome	22
Figure 1.9	Structure chimique du chromophore biline phycocyanine (a) et bilirubine (b).	23
Figure 1.10	Structure de a, b- dimer de la phycocyanine de <i>Spirulina platensis</i>	23
Figure 1. 11	Microphotographie de la spiruline A. <i>Arthrospira maxima</i> . B. <i>Arthrospira platensis</i> . Barre représente 20 µm	38
Figure 1.12	Morphologie de la Spiruline. (A) microscope optique (×400) de <i>S. platensis</i> , (B) micrographie de microscope électrique à balayage du trichome de <i>S. platensis</i> .	38
Figure 1.13	Cycle biologique de la spiruline	40
Figure 1.14	Schéma de l'ultrastructure de <i>Chlorella</i> sp. des différents organes	44
Figure 1.15	Les différentes phases de formation des cellules filles de <i>Chlorella</i> sp	45
Figure 1.16	Les cellules nouvellement formées émergeant à l'extérieur de la paroi cellulaire de la cellule mère après l'éclosion	46
Figure 2.1	Arbre phylogénétique des principaux phyla du tractus intestinal humain et leur présence relative (en%) chez des européens adultes en bonne santé	51
Figure 2. 2	Les principales fonctions des bactéries commensales qui composent le microbiote intestinal	52
Figure 2.3	Les principaux bienfaits des probiotiques	55
Figure 2.4	Observation au microscope électronique des cellules de : (1) <i>Bifidobacterium</i> sp., (2) <i>Bifidobacterium breve</i> .	58
Figure 2.5	Illustration schématique des principaux mécanismes d'action des probiotiques	62
Figure 2.6	Tube digestif de souri et détail de la structure du jéjunum de souris en coloration Hématoxyline et éosine (HES)	66

Figure 2.7	Structure schématique de la muqueuse de l'intestin grêle	66
Figure 2.8	Cryptes, composition et structure. Au niveau des cryptes il est retrouvé les entérocytes, les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de paneth	68
Figure 2.9	Plaques de Peyer chez la souris (X100). Les plaques de Peyer se situent sous la muqueuse, elles sont composées de lymphocytes T et B	70
Figure 2.10	Organisation du système immunitaire intestinal	70
Figure 3.1	Protocole d'extraction à partir de la poudre algale sèche	87
Figure 4.1	Profil des acides gras de l'extrait hexanique de <i>Spirulina platensis</i>	126
Figure 4.2	Profil des acides gras de l'extrait hexanique de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	127
Figure 4.3	Analyse thermogravimétrique de la poudre de la microalgue <i>Spirulina platensis</i>	134
Figure 4.4	Analyse thermogravimétrique de la poudre de la microalgue <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	134
Figure 4.5	Observation microscopique des cellules de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (1) et de <i>Spirulina platensis</i> (2)	135
Figure 4.6	Observation par microscope électronique à balayage (MEB) des cellules des deux microalgues séchées <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (1) et <i>Spirulina platensis</i> (2)	135
Figure 4.7	Analyse quantitative des composés chimiques des extraits organiques de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	138
Figure 4.8	Chromatogramme de l'extrait brut hydro-méthanolique de <i>Spirulina platensis</i>	146
Figure 4.9	Chromatogramme de l'extrait hydro-méthanolique de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	146
Figure 4.10	Spectres IR des extraits méthanoliques de <i>S. platensis</i> (A) et <i>C. pyrenoidosa</i> (B).	149
Figure 4.11	Observation macroscopique des colonies des isolats de bactéries lactiques (A) et souches purifiées (B) sur agar.	150
Figure 4.12	Observation microscopique des souches lactiques et pseudolactiques isolées à partir de lait de vache, de chamelle et des fèces de nourrisson.	150
Figure 4.13	Taux de survie des <i>Bf. longum</i>à pH 2 (A); pH 3 (B) ; pH 5 (C) après 4 h d'incubation à 37 °C.	161
Figure 4.14	Taux de survie des souches lactiques sous les conditions acides à pH 2 (A); pH 3 (B); pH 5 (C) après 4 h d'incubation à 37 °C.	161
Figure 4.15	Taux de survie de <i>Bf. longum</i> à 0,3 % (A), 0,5 % (B), 01 % (C) de sels biliaires (n = 3).	163
Figure 4.16	Taux de survie des souches lactiques à 0,3 % (A), 0,5 % (B), 01 % (C) de sels biliaires	164
Figure 4.17	Pouvoir acidifiant des souches lactiques et bifidobactéries.	167
Figure 4.18	Cinétique de croissance des bactéries lactiques et bifidobactéries.	168

Figure 4.19	Photos des observations macroscopiques des colonies d' <i>Escherichia coli</i> (1), <i>Lactobacillus</i> (2) et bactéroïdes (3) sur gélose	174
Figure 4.20	Observation microscopique après coloration de Gram (1) <i>E. coli</i> , (2) <i>Lactobacillus</i> sp., (3) <i>Bacteroïde</i> sp (1000 x)	174
Figure 4.21	Suivi de l'effet de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (5 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale	184
Figure 4.22	Suivi de l'effet de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (10 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale	184
Figure 4.23	Suivi de l'effet de <i>Spirulina platensis</i> (5 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale	184
Figure 4.24	Suivi de l'effet de <i>Spirulina platensis</i> (10 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale	184
Figure 4.25	Gain du poids corporel des lapins	185
Figure 4.26	Consommation alimentaire	185
Figure 4.27	Photos des autopsies d'un lapin mort	187
Figure 4.28	Photo d'une vue du tube digestif d'un lapin en croissance (61 jours)	188
Figure 4.29	Evolution de la population microbienne fécale (log nombre des UFC/g) dans les six lots expérimentaux des lapins durant les 28 jours	192
Figure 4.30	Photos de l'autopsie des lapins cadavres	196
Figure 4.31	Coupe histologique des fragments de l'intestin grêle d'un lapin du lot 05	197
Figure 4.32	Coupe histologique des fragments de l'intestin grêle d'un lapin du lot 02	198
Figure 4.33	Photo du tube digestif d'un lapin du lot 2 (Régime supplémenté en spiruline) après 21 jours d'expérimentation	198
Figure 4.34	Coupe histologique des fragments de l'intestin grêle.	199
Figure 4.35	Photos d'autopsie d'un lapin sacrifié du lot 5 (infecté non traité) au J21	200
Figure 4.36	Coupe histologique des fragments de l'intestin grêle d'un lapin du lot 05	200
Tableau 1.1	Caractéristiques principales des différentes classes d'algues	13
Tableau 1.2	Composés antibactériens de différentes algues et les bactéries pathogènes cibles	27
Tableau 1.3	Mécanisme d'action de certains agents antimicrobiens	31
Tableau 2.1	Micro-organismes considérés comme des probiotiques	56
Tableau 3.1	Gradient de solvants utilisé pour le dosage des polyphénols totaux des deux extraits méthanoliques bruts de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	94
Tableau 3.2	Formulations des régimes expérimentaux	111
Tableau 3.3	Répartition des lapereaux dans les lots expérimentaux	112

Tableau 4.1	Caractérisation nutritionnelle des deux poudres algales <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	121
Tableau 4.2	Teneur en minéraux des deux poudres algales <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	123
Tableau 4.3	Teneur en métaux lourds des deux poudres algales <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	123
Tableau 4.4	Composition des ester méthylique des acides gras de l'extrait hexanique de <i>Spirulina platensis</i>	128
Tableau 4.5	Composition des ester méthylique des acides gras de l'extrait hexanique de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	129
Tableau 4.6	Résultats de l'analyse par fluorescence des rayons X (FRX) de la poudre de la spiruline	130
Tableau 4.7	Résultats de l'analyse par fluorescence des rayons X (FRX) de la poudre de la chlorelle	131
Tableau 4.8	Couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir de la spiruline et de la chlorelle en pourcentage par rapport au poids total de la poudre de la spiruline et à l'extrait brut.	136
Tableau 4.9	Analyse phytochimique préliminaire de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	137
Tableau 4.10	Activité antimicrobienne et antifongique des extraits organiques extraient à partir de <i>Spirulina platensis</i> et <i>Chlorella pyrenoidosa</i> à l'égard des bactéries pathogènes	141
Tableau 4.11	Concentrations minimales inhibitrices (CMI µg/ mL) des extraits de <i>Chlorella pyrenoidosa</i> à l'égard des souches pathogènes	144
Tableau 4.12	Concentrations minimales inhibitrices (CMI µg/ mL) des extraits de <i>Spirulina platensis</i> à l'égard des souches pathogènes	144
Tableau 4.13	Caractérisation biochimique et physiologique des souches lactiques isolées à partir du lait de vache et de chamelle	152
Tableau 4.14	Caractérisation biochimique et physiologique des souches bifides isolées à partir des fèces de nourrisson.	153
Tableau 4.15	Fermentation des carbohydrates des souches bifides isolées à partir des selles de nourrisson	156
Tableau 4.16	Résistance des bactéries lactiques et bifides aux antibiotiques	169
Tableau 4.17	Effet antagoniste de la souche pseudolactique <i>Bf. bifidum</i> et des souches lactiques en culture seule et en co-culture à l'égard des souches pathogènes	173
Tableau 4.18	Résultats d'identification biochimique des souches isolées sur gélose Mac conkey, MRS et BBE par API 20 E	175
Tableau 4.19	Résultat du suivi du pouvoir acidifiant de <i>Bf. bifidum</i> BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en spiruline	177
Tableau 4.20	Résultat du suivi du pouvoir acidifiant de <i>Bf. bifidum</i> BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en chlorelle	177

Tableau 4.21	Résultats du suivi du pH et d'acidité titrable du lait écrémé seul et enrichi en combinaison de la spiruline et la chlorelle durant la fermentation avec <i>Bf. bifidum</i> BHI 07	178
Tableau 4.22	Résultat du suivi de la croissance de <i>Bf. bifidum</i> BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en spiruline	179
Tableau 4.23	Résultat du suivi de la croissance de <i>Bf. bifidum</i> BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en chlorelle	179
Tableau 4.24	Résultat du suivi de la croissance de <i>Bf. bifidum</i> BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en combinaison en spiruline et chlorelle	179
Tableau 4.25	Activité antagoniste de la souche <i>Bf. bifidum</i> BHI 7 à l'égard des trois souches <i>E. coli</i> , <i>Bacterioide</i> sp. et <i>Lactobacillus</i> sp.	180
Tableau 4.26	Effet antagoniste de <i>spiruline platensis</i> et <i>chlorella pyrenoidosa</i> à l'égard de <i>E. coli</i> , <i>Bacterioide</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp. et <i>Bf. bifidum</i> BHI 7	182
Tableau 4.27	Mortalité observée pour les 6 lots expérimentaux	188
Tableau 4.28	Etude de l'influence du traitement sur les paramètres physico-chimiques des compartiments digestifs	190

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AGCC	Acides gras à courte chaîne
AJR	Apport journalier recommandé
AL	Acide linoléique
ALA	Acide alpha linoléique
CA	Conversion alimentaire
CI50	Concentration Inhibant 50 % de la croissance cellulaire
CMQ	Consommation moyenne quotidienne
D.O	Densité optique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EMAG	Acide gras des esters méthyliques
EPA	Acide eicosanoïque
FAME	Acide des esters méthyliques
FRX	Fluorescence des rayons X
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse
GP	Gain du poids
HES	Hématoxyline et éosine
IC	Indice de consommation
MEB	Microscopie électronique à balayage
MS	Matière sèche
PBS	Solution saline de phosphate
RDA	Apport nutritionnel recommandé
Subsp	Sous espèce
TGI	Tractus gastro-intestinal
UFC/ml	Unité formant des colonies par millilitre
Zi	Diamètre des zones d'inhibition

INTRODUCTION

Au cours des 50 dernières années, les infections microbiennes ont été les principales causes de décès et des sérieux problèmes de santé publique notamment les diarrhées et les gastroentérites et qui touchent les personnes de toutes tranches d'âges. L'incidence alarmante de la multi-résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes est devenue un problème majeur [1] et qui conduisant à l'inefficacité du traitement dans le cas d'infection polymicrobiennes [2]. Vue l'utilisation accrue de l'antibiothérapie lors des infections microbiennes, donc il est impérativement important de chercher des méthodes alternatives, en utilisant des molécules naturelles, tel que les microalgues [3-5].

Les microalgues sont des sources des nouvelles structures et des métabolites biologiquement actives. Des études récentes ont montrées la présence de certains composés bioactifs dans les algues bleu-vertes qui sont doués des activités anticancéreuses, antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires et d'autres activités pharmacologiques [6-8].

Spirulina nommée Tecuitlatl par les aztèques, qui signifie « des excréments de pierre » au cours du 16^{ème} siècle. Plus tard, en raison de l'augmentation accrue des maladies contagieuses, des nouveaux produits ont été adoptés à des raisons religieuses, politiques et sociales et le thème de « Tecuitlatl » s'est terminé. Il n'était pas connu jusqu'au moment où l'homme a commencé à utiliser des microalgues, mais à l'heure actuelle, cette ressource peut être ainsi appelé, "tendance verte" [9].

Chlorella a été sur la terre depuis la période Pré-cambrienne depuis plus de 2.5 milliards d'ans. Grâce à sa haute teneur en protéines et la richesse en caroténoïdes, vitamines et minéraux, *Chlorella* a aussi longtemps été proposée comme un substitut alimentaire pour les humains. Elle est maintenant largement produite comme aliment de santé en Allemagne, en Chine, au Japon et dans plusieurs autres pays d'Asie [10].

Plusieurs travaux de recherche réalisés depuis les dernières années laissent entrevoir des perspectives prometteuses quant aux effets préventifs de la modulation du microbiote intestinal à travers l'alimentation. En effet, de nombreuses études ont démontrées que certains constituants alimentaires sont capables de modifier qualitativement le microbiote intestinal en ciblant spécifiquement certaines bactéries dites « bonne » et qui sont logeait dans notre intestin et qui pourrait induire des effets bénéfiques à l'hôte, d'où la notion de « probiotique » [11-15].

Deux souches algales ont fait l'objet de notre étude : une cyanobactérie *Spirulina platensis* et une chlorophyte *Chlorella pyrenoidosa*. Cette biomasse est une excellente source de micronutriments. La question qui se pose est à ce qu'elle peut être utilisée comme substrat nourrissant les probiotiques pour un bon équilibre du microbiote intestinal ?. Cette biomasse est-elle une source de nouvelles structures et des métabolites biologiquement actives à l'égard des pathogènes ?. Pour cela nous avons émet l'hypothèse de recherche suivante :

Les microalgues sont capables de modifier qualitativement le microbiote intestinal en ciblant spécifiquement les bifidobactéries à fort potentiel probiotique et qui peuvent supplanter la prolifération et le développement des pathogènes responsables d'infections entériques au niveau intestinal. Pour vérifier l'hypothèse de recherche, un objectif principal a été fixé : une évaluation par des modèles *in vitro* et *in vivo* l'influence de cette biomasse, sur le potentiel de la souche bifide d'origine humaine à caractère probiotique, dans la prévention et la résistance aux infections entériques bactériennes dues à *Escherichia coli*, infection à incidence très élevée chez l'humain.

La première partie de cette thèse concerne une synthèse bibliographique qui s'articule autour de deux chapitres, le premier chapitre concerne des généralités sur les microalgues ainsi que des études antérieures sur les effets antibactériens et les principaux agents antimicrobiens. Le deuxième chapitre traite le microbiote intestinal humain, en détaillant les probiotiques et spécifiquement les bifidobactéries, ainsi que les prébiotiques.

La deuxième partie de cette thèse est ciblée sur trois axes majeurs. Le premier axe est consacré à une caractérisation phytochimique et nutritionnelle des deux souches algales d'intérêt.

Le deuxième axe est orienté vers une étude *in vitro* de l'effet de cette biomasse sur l'accroissement de la souche *Bifidobacterium bifidum* BHI 7, l'activité antibactérienne à l'égard des souches du microbiote intestinal et leur interaction.

Le troisième axe est mené à valider l'effet de ces deux microalgues sur le pouvoir anti- *E. coli* de la souche *Bifidobacterium bifidum* BHI 7 à l'aide d'un modèle *in vivo* d'infection entérique

CHAPITRE 1

MICROALGUES : UNE BIOMASSE DIVERSIFIÉE ET SOURCE POTENTIELLE DE MOLECULES BIOACTIVES

1.1 Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des microorganismes aquatiques qui présentent une biodiversité très remarquable, elles se trouvent dans tous les habitats aquatiques, marins ou d'eaux douces et terrestres. Elles représentent 18 % du règne végétal [2] dont 127 000 espèces d'algues ont été identifiées. Ce qui en fait des organismes adaptés à un grand nombre de conditions environnementales. Ils peuvent s'adapter à tous les climats, des plus froids au plus chauds. Elles sont aptes à coloniser tous types de milieux, notamment eaux salées, douces, saumâtres et même dans des eaux usées grâce à leurs capacités d'adaptation et de survie. Elles peuvent également se développer sur des surfaces rigides, telles que les troncs d'arbre, les structures immergées ou les murs [16, 17].

Cette grande diversité des espèces de microalgues ouvre les portes sur de nombreuses possibilités d'utilisation [17]. Ils sont des unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés qui ont une taille de l'ordre du micromètre. Elles sont souvent connues sous la dénomination de « phytoplancton » [18]. Les microalgues sont d'excellents convertisseurs d'énergie solaire et de l'eau pour la production de biomasse et d'oxygène, par le biais de la photosynthèse. Ces microorganismes autotrophes classés parmi les producteurs primaires ont un rôle majeur dans la mise à disposition du carbone sous forme organique ainsi que de dioxygène vers les organismes hétérotrophes des maillons trophiques supérieurs : 45 % de la production primaire nette annuelle leur serait imputé à l'échelle du globe [19]. En effet, ces microorganismes sont à l'origine de l'équilibre de la composition atmosphérique dont la fixation de dioxyde de carbone et le rejet d'oxygène et contribuent ainsi à la continuité de la vie animale et végétale.

A l'échelle microscopique, elles peuvent se présenter séparées ou en amas et sous différentes formes : souvent sphériques (*Porphyridium*), de gouttelette (*Chlamydomonas*), de filament (*Spirulina*), de spirale (*Arthrospira*), et même sous forme d'étoile (*Staurostrum*) (Figure 1.1) [17, 18].

Selon leur type, les conditions environnementales et grâce à la photosynthèse, les microalgues peuvent produire des quantités importantes de lipides, de sucres et de protéines [17].

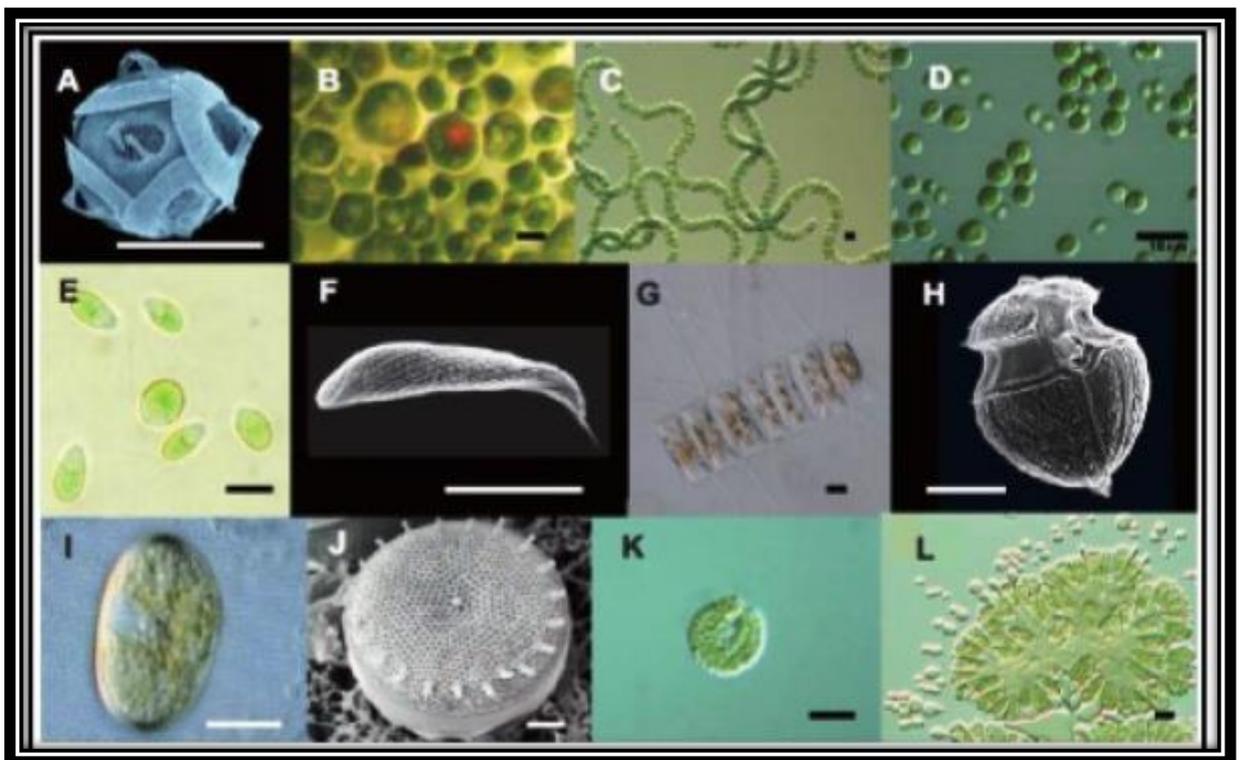


Figure 1.1 : Les différentes formes de microalgues. A : *Gephyrocapsa*, B : *haematococcus lacustris*, C : *Spirulina platensis*, D : *Chlorella vulgaris*, E : *Dunaliella tertiolecta*, F : *Chaetoceros calcitrans*, H : *Dinophysis acuminata*, I : *Alexandrium*, J : *Bacillariophyceae*, K : *Raphidopheceae*, L : *Botrycoccus*, échelle : 10 μm . [18]

1.2 Utilisation des algues

Les algues ont été utilisées depuis longtemps : au début dans l'alimentation des populations des rivages asiatiques, ou comme engrais en Europe ou encore pour le bétail. Depuis le XVIII^{ème} siècle l'iode est extrait industriellement des algues au Japon [20].

Au XX^{ème} siècle la production industrielle de phycocolloïdes est en plein essor eu égard à la diversification de leur utilisation. Le besoin de récoltes de plus en plus importantes a développé la culture d'espèces plus productives. A cause des propriétés de plusieurs de leurs éléments, les algues ont été et sont encore utilisées à de nombreuses fins [20].

1.3 Critères de classification des algues

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat, la nature et la localisation des pigments et des glucanes de réserve. Malgré une extrême diversité, les algues peuvent être classées en une dizaine d'embranchements selon des critères basés sur leurs compositions pigmentaires, leurs polysaccharides de réserve et des caractéristiques structurales, comme le nombre de membranes plastidiales, la disposition des thylacoïdes, la forme des crêtes mitochondriales et la nature de l'appareil flagellaire [21].

1.3.1 Diversité et classification

Les micro-algues constituent un groupe extrêmement hétérogène rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique [22]. Cette famille rassemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces selon les estimations, parmi lesquelles 47000 espèces sont décrites [22, 23]. Par comparaison, la diversité des plantes supérieures est de l'ordre de 400 000 espèces. La classification (Tableau 1.1) de cette diversité est complexe et la taxonomie est sujette à de fréquents bouleversements du fait notamment de l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire.

Tableau 1.1 : Caractéristiques principales des différentes classes d'algues. Avec α 1-4: amidons ; β 1-3 : laminarane, PE : Phycoérythrine, PC : Phycocyanine, APC : Allophycocyanine, Chl. : Chlorophylle [21]

Embranchement	Pigments	Glucanes de réserve	Nombre de membranes. plastidiales	Thylakoïdes
Cyanophyta sauf «Prochlorophytes»	PE, PC, APC, Chl. <i>a</i>	α 1-4 Cytoplasmique	Sans objet	Non regroupés, épars, Phycobilisomes
«Prochlorophytes »	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Cytoplasmique	Sans objet	Par 2 ou plus
Glaucophyta	PC, APC, Chl. <i>a</i>	α 1-4 Cytoplasmique	2+ peptidoglycane	Non regroupés, concentriques, Phycobilisomes
Rhodophyta	PE, PC, APC, Chl. <i>a</i> (Chl. <i>d</i>)	α 1-4 Cytoplasmique	2	Non regroupés, Phycobilisomes
Chlorophyta	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Intraplastidiale	2	Par 2 à 6
Streptophyta «Streptophycophytes»	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Intraplastidiale	2	Par 2 à 6
Streptophyta « Embryophyta »	Chl. <i>a + b</i>	α 1-4 Intraplastidiale	2	Empilés
Chryptophyta	PE Chl. <i>a + c</i>	α 1-4 Dans le compartiment périplastidial	4	Par 2, Phycobiline dans la lumière des thylacoïdes
Euglénophyta	Chl. <i>a + b</i>	β 1-3 Cytoplasmique	3	Par 3
Haptophyta (Prymnesiophyceae)	Chl. <i>a + c</i>	β 1-3 Cytoplasmique	4	Par 3, sans lamelle périphérique
Haptophyta (Pavlovophyceae)	Chl. <i>a + c</i>	β 1-3 vacuolaire	4	Par 3, avec lamelle périphérique
Dinophyta	Chl. <i>a + c</i>	α 1-4 Cytoplasmique	3	Par 3, espacés, sans lamelle périphérique

1.3.2 Description des différentes classes d'algues

Selon les différents critères de classification, il existe onze groupes d'algues, un de nature procaryotique (les cyanobactéries) et dix de nature eucaryotique. La composition pigmentaire et celle des glucanes de réserve, le nombre de membranes plastidiales, ainsi que le nombre et la disposition des thylacoïdes selon les différents embranchements d'algues sont décrit dans le tableau 1.1 [21].

Les pigments ont dès le début du XIX^{ème} siècle constitués un critère important dans la classification des algues. Le rôle physiologique de ces molécules est de capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle *a*, les chloroplastes sont verts (chlorobiontes), ou bruns (Ochrophyta), ou bleus (Cyanophyta) ou rouges (Rhodophyta) [24].

1.3.2.1 Procaryotes photosynthétiques

1.3.2.1.1 Embranchement des Cyanophyta (lignée bleue)

Les algues procaryotes appartiennent au groupe des eubactéries photosynthétiques (cyanobactéries et prochlorophytes). Elles sont essentiellement représentées par les cyanobactéries (règne des eubactéries). Plusieurs structures communes sont retrouvées au niveau de la cellule, notamment la présence d'une capsule mucilagineuse. Du point de vue de la structure et de la composition, leur paroi est proche de celle des bactéries à Gram négatif. La cellule est dépourvue d'organite. Les thylacoïdes sont diffus dans le cytoplasme [25]. Les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle *a* et les photosystèmes I et II. Elles possèdent des phycobilisomes composés de PE, PC et APC [21, 26].

1.3.2.2 Eucaryotes photosynthétiques

1.3.2.1.2 Embranchement des Glaucophyta

Cet embranchement comprend trois genres et quatorze espèces. Les glaucophytes forment un petit groupe d'algues unicellulaires, autotrophes, libres, parfois coloniales. Elles appartiennent à la même lignée que les algues rouges et vertes. Les thylacoïdes sont pourvus de phycobilisomes constitués de PC et APC. La chlorophylle *a* est également retrouvée [21, 26].

1.3.2.1.3 Embranchement des Rhodophyta (lignée rouge)

Cet embranchement comprend 70 genres et plus de 4 000 espèces décrites. Les algues rouges forment un groupe homogène bien défini. Elles sont rarement unicellulaires. Les algues rouges possèdent de la chlorophylle *a*, et des pigments surnuméraires : PE, PC et APC, disposés dans le phycobilisome. Le β,ϵ -carotène et le β,β -carotène sont présents. Les principales xanthophylles sont la lutéine et la zéaxanthine. La paroi cellulaire est constituée de cellulose ou de xylanes pour la partie fibrillaire et de galactanes sulfatés ou mannanes pour la partie mucilagineuse [21].

1.3.2.1.4 Sous-règne de Chlorobionta (lignée verte)

Les algues vertes constituent un groupe comprenant entre 550 et 570 genres et de 16 000 à 17 000 espèces. Le chloroplaste contient de la chlorophylle *a* et *b*. En majorité, les algues vertes sont microscopiques et dulçaquicoles, elles sont cependant rencontrées dans tous les types de milieu. Leur chloroplaste contient de la chlorophylle *a* et *b* [21]. Les Chlorobionta sont constituées de deux infra-règnes les Chlorophyta et les Streptophyta [21].

1.3.2.1.4.1 Classe des Euglénophyceae (lignée verte)

Dans la classe des Euglénophyceae, de 40 à 50 genres et 650 à 1 050 espèces sont dénombrés. Ces algues sont unicellulaires, flagellées, rarement coloniales. Un grand nombre d'euglénophycées sont incolores, certaines ont perdu leurs chloroplastes au cours de l'évolution. Lorsqu'ils sont présents, les chloroplastes des euglènes contiennent les chlorophylles *a* et *b* comme celui des algues vertes dont ils dérivent. Les euglènes contiennent du β,β -carotène et divers caroténoïdes dont les plus importants sont la néoxanthine et la diadinoxanthine [21].

1.3.2.1.4.2 Classes des Chlorarachniophyceae (lignée verte)

Les algues de la classe de Chlorarachniophyceae sont des organismes unicellulaires, coccoïdes, amiboïdes à pseudopodes filamenteux ou monaoïdes¹. Cette classe compte cinq genres et six espèces. Les chloroplastes des chlorarachniophycées contiennent de la chlorophylle *a* et *b* [21].

1.3.2.1.5 Embranchement des Cryptophyta (lignée brune)

Chez les Cryptophyta le nombre d'espèces décrites est de l'ordre de 100 à 200. Les cryptophytes sont des organismes unicellulaires flagellés. Ils contiennent les chlorophylles *a* et *c*. Les algues appartenant à cet embranchement possèdent également de la PE ou de la PC.

1.3.2.2.5 Embranchement des Haptophyta (lignée brune)

Ce sont des algues à chloroplastes colorés en brun-doré par des caroténoïdes. Elles forment une lignée propre caractérisée par un organe particulier : l'haptophème. L'embranchement compte environ 80 genres et 300 espèces. Les haptophytes sont des organismes unicellulaires monadoïdes. Ce sont essentiellement des organismes planctoniques et marins. Les pigments retrouvés sont la chlorophylle *a* et *c* [21].

1.3.2.2.6 Embranchement des Dinophyta (lignée brune)

Cet embranchement compte environ 4 000 espèces réparties dans 550 genres. Ces algues n'ont aucune parenté directe avec les autres algues mais sont affiliées aux Sporozoa et aux ciliés. Les dinophytes sont majoritairement unicellulaires. Il existe quelques rares formes filamenteuses. Elles sont caractérisées par une mitose particulière avec un fuseau externe. Un dynocarion est présent chez la majorité de ces organismes. Chez les espèces photosynthétiques, il existe plusieurs types de chloroplastes. Les dinophytes peuvent contenir divers eucaryotes endosymbiotiques. Les chloroplastes contiennent de la chlorophylle *a* et *c*, comme les haptophytes, les ochrophytes et les cryptophytes. Le chloroplaste typique à péridinine contient de la chlorophylle *a*, *c*₂ comme chez les cryptophytes, les pigments surnuméraires sont principalement le β,β -carotène et la péridinine [21].

1.3.2.2.7 Embranchement des Ochrophyta (lignée brune)

Les ochrophytes appartiennent au sous-règne des Hétérokonta. Ce vaste ensemble regroupe des organismes dont la caractéristique commune est soit d'être des monades pourvues d'un appareil flagellaire dit « Hétéroconté », soit d'avoir des cellules flagellées (spores ou gamètes) avec ce même type d'appareil locomoteur. L'appareil flagellaire a donné son nom à l'ensemble « Hétérokonta ». Les ochrophytes sont placés dans un vaste ensemble contenant également une dizaine de lignées d'algues microscopiques, comme les diatomées, les chrysophycées et les xanthophycées. Le chloroplaste contient de la chlorophylle *a* et *c*. La nature des pigments surnuméraires varie selon les différentes classes d'algues [21, 26].

1.4 Les différentes classes de pigments

Trois principales classes de pigments photosynthétiques se produisent chez les microalgues : Chlorophylles et dérivés, Caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) et phycobilines, dans l'ensemble, ils représentent des centaines de molécules purifiées [27]. Vu leur grande diversité structurale et le potentiel pharmacologique de ces molécules ce qui leur confère un grand intérêt thérapeutique.

Plusieurs auteurs ont étudiés la purification et l'identification des molécules bioactives à partir des microalgues et qui ont conduit à l'isolement des pigments. Ces pigments purifiés ont généralement une forte activité pharmacologique à de très faibles concentrations [28].

1.4.1 Chlorophylles

Les chlorophylles sont des molécules solubles dans les solvants organiques et conférant la couleur verte aux chloroplastes. Ce sont des macrocycles tétrapyroliques métallés par du magnésium et substitués par une chaîne phytyle (Figure 1.2). Ces molécules impliquées dans les processus d'oxydoréduction photochimique des milieux biologiques assurent d'une part la collecte énergétique des photons, et d'autre part le transfert d'énergie permettant ainsi la transformation du dioxyde de carbone et de l'eau en molécules organiques [21, 24]. Cependant, l'exposition de cette molécule aux acides faibles et l'oxygène

accélère son oxydation et abouti à la formation de nombreux produits de dégradation [29].

La figure 1.2 montre la structure de la molécule de chlorophylle. Le squelette de la molécule de chlorophylle est un macrocycle porphyrine (figure 1.5.a), qui se compose de quatre pyrrole [30, 31]. L'attachement d'un seul anneau isocyclique à l'un des pyrroles donne lieu à la structure phorbine (figure 1.2.b) [30]. Chaque cycle pyrrole contient quatre atomes de carbone et un atome d'azote. Tous les atomes d'azote sont orientés vers l'intérieur ont créant un trou central dont un ion métallique Mg^{+2} qui se fixe facilement [31]. Dans la chlorophylle b, le groupe méthyle du 2^{ème} anneau de la chlorophylle a est remplacé par un groupe formyle (Figure 1.2) [29, 31].

Cette différence de structure de la chlorophylle a dans les résultats étant un pigment bleu/vert avec une absorbance maximale de 660 à 665 nm et de la chlorophylle b étant un pigment vert/jaune avec une absorbance maximale de 642 à 652 nm [30].

A l'origine de la photosynthèse, toutes les algues possèdent de la chlorophylle *a* [32]. Malgré cette caractéristique commune, certains phylums se distinguent par la présence de chlorophylles *b* ou *d*. Les algues vertes renferment, comme les plantes supérieures et contrairement aux autres algues, de la chlorophylle *b* tandis que les algues rouges possèdent en faible quantité de la chlorophylle *d* [21, 24].

Dans le cas de la chlorophylle *c*, il y a absence de la chaîne phytyle. L'absence de cette chaîne lipophile ne lui permet pas de se fixer dans la membrane du thylacoïde, comme les chlorophylles *a*, *b*, *d*. La fixation se fait donc par l'intermédiaire de protéines membranaires [21, 24, 26].

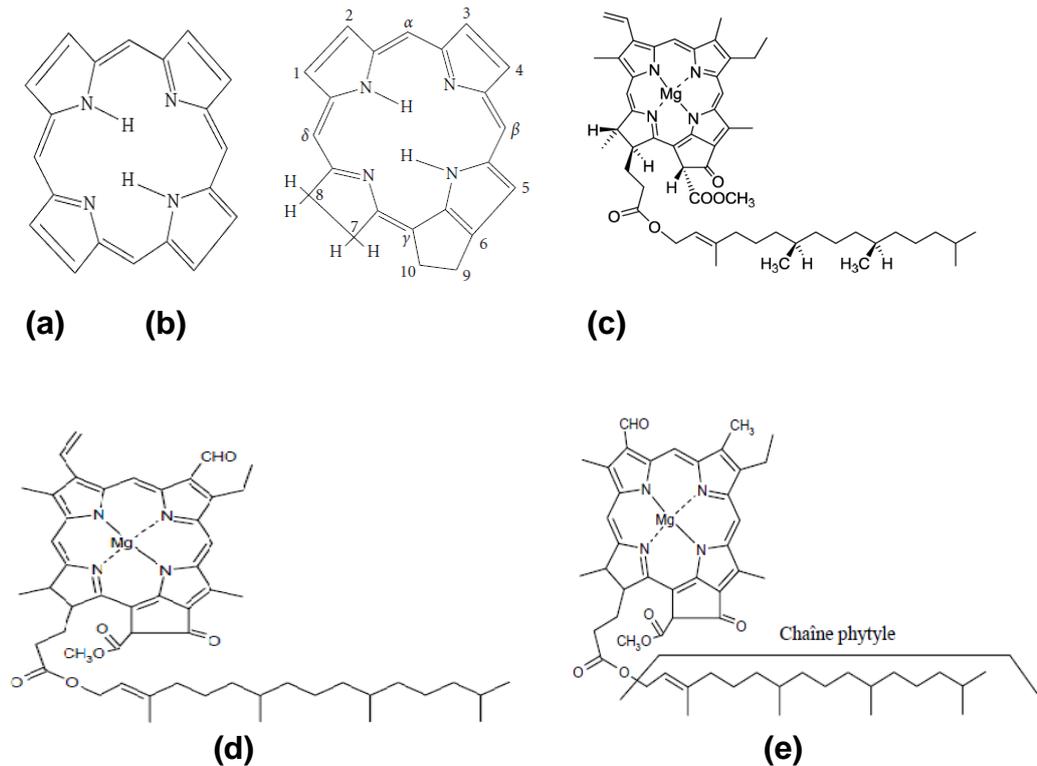


Figure 1.2 : Structure des différentes chlorophylles. (a) Macrocycle porphyrine, (b) Phorbine, (c) Chlorophylle a, (d) Chlorophylle b, (e) Chlorophylle d [33].

1.4.2 Les phéopigments

Les phéopigments sont issus de la dégradation des chlorophylles. Dans de nombreux produits de dégradation de la chlorophylle, le cycle tétrapyrolique reste intact. Les enzymes impliquées dans ce processus de dégradation sont responsables de phéophytination, de déphytylation, de décarboxyméthylation et d'allomérisation des chlorophylles [34].

Les phéophytines, analogues des chlorophylles mais sans atome de magnésium (Figure 1.3), ainsi que les phéophorbides correspondant à de la chlorophylle mais sans atome de magnésium et sans chaîne phytyle, sont classés parmi les phéopigments. La figure 1.3 représente la structure chimique du phéophorbide a [26].

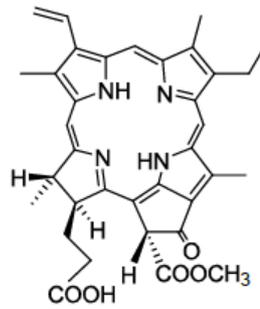


Figure 1.3 : Structure chimique du phéophorbide a [34].

1.4.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont constitués de deux classes de composés : les carotènes et les xanthophylles. Les premiers sont des molécules terpéniques pouvant être assimilées à la condensation de chaînes de 20 carbones. Les seconds découlent de l'oxydation progressive des carotènes (figure 1.4) [21, 24, 34].

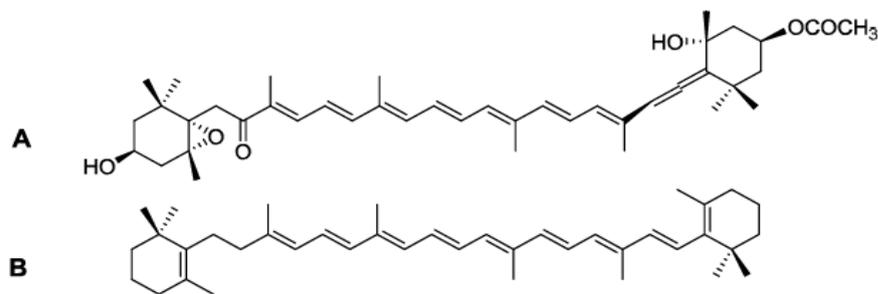


Figure 1.4 : Structure chimique de caroténoïdes : fucoxanthine (A), β,β -carotène (B) [34].

Le rôle des caroténoïdes consiste en la protection de l'appareil photosynthétique contre la photo-oxydation (figure 1.5). Chez les Chlorophyceae, lors de fortes intensités lumineuses, la violaxanthine est réduite (déépoxydée) en zéaxanthine. L'excès d'énergie non utilisée par l'antenne collectrice est alors éliminé évitant, par la suite, la production d'oxygène singulet nuisible à la cellule. Sous une intensité lumineuse réduite, la zéaxanthine est de nouveau oxydée en violaxanthine [21, 24, 26].

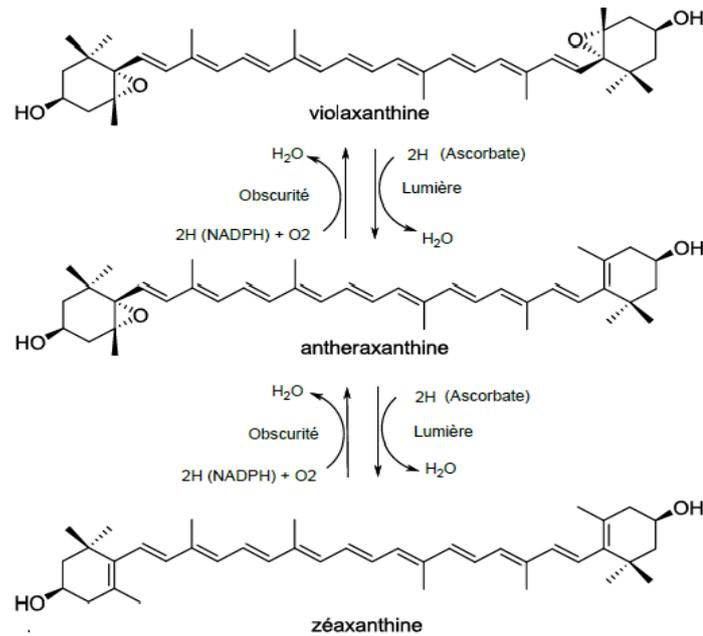


Figure 1.5 : Cycle des xanthophylles chez les Chlorobiontes [34].

Chez certains ochrophytes, le cycle des xanthophylles est effectué par la diatoxanthine et la diadinoxanthine. Lors de fortes intensités lumineuses, la diadinoxanthine est réduite (déépoxydée) en diatoxanthine. Sous une intensité lumineuse réduite, la diatoxanthine est de nouveau oxydée en diadinoxanthine (figure 1.6) [34].

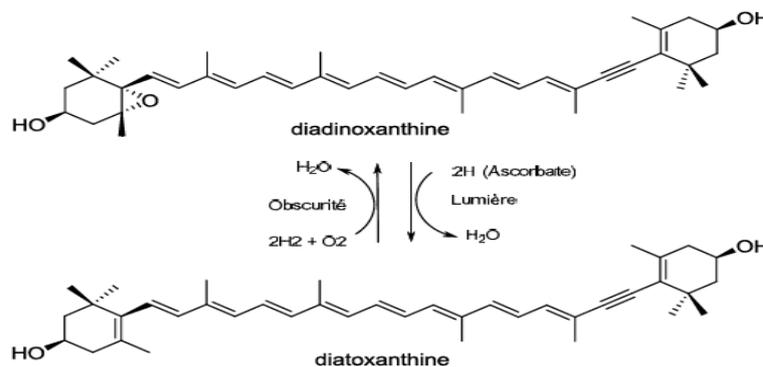


Figure 1.6 : Cycle des xanthophylles chez les ochrophytes [34].

1.4.4 Phycobiliprotéines

Les phycobiliprotéines, contrairement aux chlorophylles, sont solubles dans l'eau. Elles sont un petit groupe des chromoprotéines qui comportent une partie protéique et des chromophores (ou bilines) liés de façon covalente à la protéine. Les chromophores sont responsables de la capture de l'énergie lumineuse et de la

couleur du pigment des cyanobactéries et des groupes des eucaryotes [35] (Ce sont des groupes tétrapyrroliques, mais au contraire des chlorophylles, ils ne sont pas cyclisés et qu'ils diffèrent par l'arrangement de leurs doubles liaisons [26].

Les phycobiliprotéines sont subdivisées en trois groupes principaux : phycoerythrine (rouge), phycocyanine (bleue), et allophycocyanine (bleu turquoise). Les chromophores sont les phycocyanobilines, les phycoérythrobilines et les phycourobilines (figure 1.7).

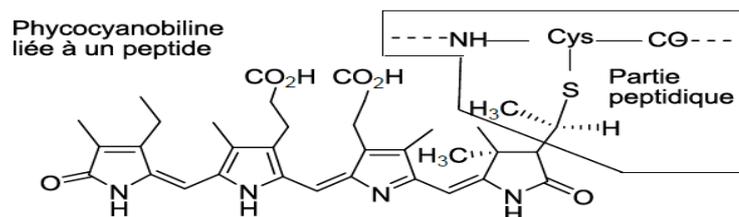


Figure 1.7 : Structure de la phycocyanobiline [21, 26]

Les biliprotéines diffèrent par le nombre et la nature des chromophores disposés sur les sous-unités protéiques α et β . Chez les algues bleues et rouges, ces pigments sont localisés dans des structures situées à la surface des thylacoïdes : les phycobilisomes. Le rôle physiologique des phycobiliprotéines est de capter des photons de longueurs d'onde différentes de ceux captés par les chlorophylles et de transmettre cette énergie lumineuse au centre réactionnel. (figure 1.8) [21, 36].

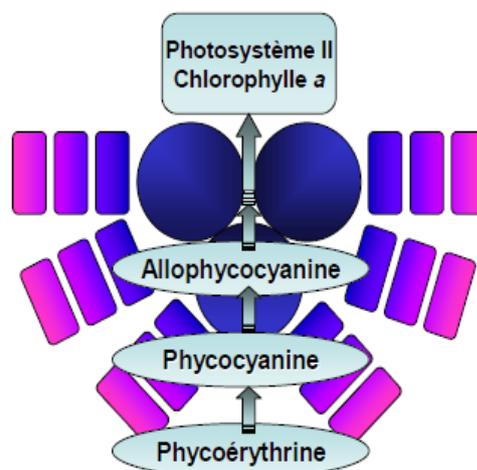


Figure 1.8 : Disposition des phycobilines dans un phycobilisome [21, 26]

La C-phycoyanine (C-PC) est constituée d'une structure protéique reliée à un chromophore. C'est un pigment assez rare dans la nature qui absorbe la lumière dans une longueur de 61 à 650 nanomètres. Elle est représentée à environ à hauteur de 10 à 11 % en moyenne dans la spiruline. Elle est appréciée comme colorant bleu naturel dans l'industrie agroalimentaire[37], de nombreuses recherches sont en cours pour connaître toutes ses propriétés. Sa structure particulière lui confère des propriétés antioxydantes, anti-radicalaires et détoxifiantes. La phycoyanine stimulerait également la production des globules rouges et des globules blancs [38].

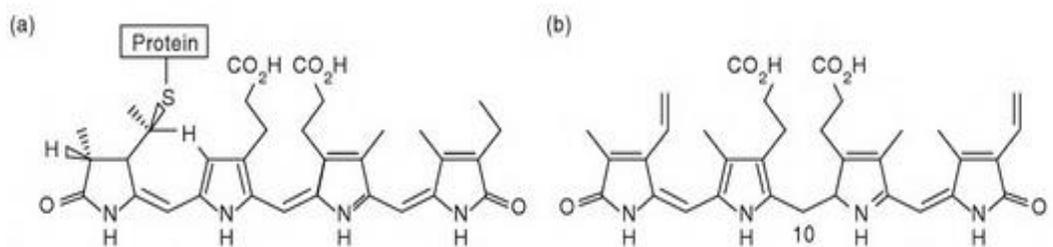


Figure 1.9 : Structure chimique du chromophore biline phycoyanine (a) et bilirubine (b) [34].

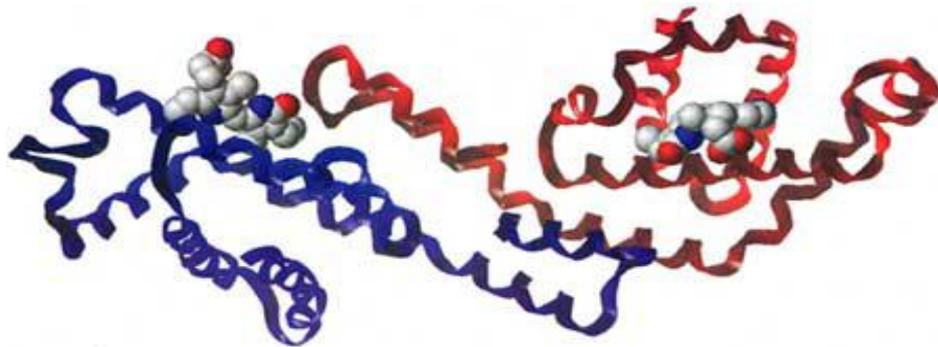


Figure 1.10 : Structure de a, b- dimer de la phycoyanine de *Spirulina platensis* [39].

1.5 Activité antibactérienne des micro-algues des eaux douces

Les infections microbiennes sont une des principales causes des problèmes de santé, des handicaps physiques et des mortalités dans le monde entier. Il y a une croyance largement répandue que la médecine verte est une bonne alternative aux composés synthétiques vue leurs effets secondaires limités. Les algues sont désormais d'un plus grand intérêt, suite à l'augmentation accrue des traitements thérapeutiques à la base de produit naturel [40].

Parmi les 30 000 espèces de microalgues distinctes habitent sur la terre, plus de 15 000 nouveaux composés chimiques ont été obtenus à partir de celles-ci [41, 42]. En outre, son importance comme source de nouvelles molécules a augmenté rapidement et plusieurs recherches ont rapportés que ces molécules sont douées de diverses activités biologiques [43].

Le problème de la résistance microbienne a accru et l'utilisation des médicaments antimicrobiens reste toujours incertaine. La majorité des médicaments antimicrobiens utilisés en clinique ont des inconvénients comme la toxicité, l'absence d'efficacité, le coût et l'inhibition de leur utilisation fréquente conduisant à l'émergence de souches résistantes. Ce qui est très important, de développer d'autres agents antimicrobiens biodégradables et qui devraient avoir des effets secondaires minimales. Il est généralement considéré que les composés naturels sont biodégradables et donc plus acceptables sur le plan environnemental. Les applications commerciales des composés extraites à partir des microalgues ont encore connues peu d'attention dans le domaine pharmaceutique, d'antibiotique et les molécules biologiquement actives [40].

Certains chercheurs ont envisagés énormément de possibilité que les algues et les microalgues sont des sources potentielles de molécules bioactives, en particulier, certaines algues ont été étudiées en tant qu'une éventuelle source naturelle de différents composés fonctionnels [44, 45] produites dans le milieu de culture et ce qui est très difficile à être produit par la synthèse chimique [46]. Ils sont en mesure de produire une vaste gamme de substances biologiquement actives avec des activités antibactériennes, antivirales, antifongiques, inhibition enzymatique, immunostimulant, cytotoxiques [47-50].

Les microalgues ont été utilisées depuis longtemps à des fins thérapeutiques, leur criblage systématique des principaux actifs date depuis les années 50. Les premiers travaux sur l'activité antibiotique des algues ont été rapportés par PRATT et al. [51]. Cependant, ces dernières décennies, les microalgues ont devenus l'objet d'intenses efforts de recherche, visant à trouver de nouveaux composés qui pourraient conduire à des agents utiles sur le plan thérapeutique [52, 53].

PRATT et al. [51] ont isolés le premier composé antibactérien à partir d'une algue microscopique, *Chlorella* sp., un mélange d'acides gras, à savoir chlorelline, qui a été jugée responsable de l'activité inhibitrice contre les bactéries à Gram (+) et Gram (-). L'extrait méthanolique de la cyanobactérie a été étudiée *in vitro* pour son activité antimicrobienne contre *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus niger* et *A. flavus* en utilisant la méthode de diffusion en agar [54].

Plusieurs études ont été menées pour la recherche des potentiels agents antimicrobiens qui peuvent être synthétisés par les microalgues. PRAKASH et al., [5] ont criblés le potentiel antimicrobien des microalgues des eaux douces à savoir : *Oscillatoria sancta* (*O. sancta*) (Kuetz), *Lyngbya birgei*, *Oedogonium echinospermum*, *Spirogyra decimina* (Muller), *Spirogyra grantiana*, *Spirogyra crassa*, *Spirogyra biformis* and *Spirogyra condensata* (Vaucher) à l'égard des bactériens pathogènes suivantes : *E. coli* (ATCC 35218), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. typhi* (MTCC 733), *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* et *Streptococcus pyogenes*, selon la méthode de diffusion de disque. Les activités antimicrobiennes des trois extraits organiques : méthanolique, chloroformique et diéthyle-éthérique ont été testés à l'égard de cinq souches pathogènes : *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. et *Candida albicans* selon la méthode de diffusion sur agar [55]. MUTHULAKSHMI et al. [56] ont évalués l'activité antimicrobienne de la phycocyanine extraite et purifiée à partir de *Spirulina platensis* à l'égard de cinq souches pathogènes : *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp et *Escherichia coli*.

Les antibiotiques sont généralement moins efficaces contre les bactéries à Gram-négatives en raison de leur paroi cellulaire multicouches et complexes, ce qui rend plus difficile pour le composé actif de pénétrer [57]; ce qui explique le fort potentiel antibactérien des surnageants (et des extraits méthanoliques) contre les Gram positifs que les Gram négatifs [3, 47]. L'acide hexadecatrienoïque isolés de *P. tricornutum* présente une activité contre la bactérie pathogène à Gram (+) *S. aureus*. L'extrait éthanolique extrait sous pression à partir de *Haematococcus pluvialis* dans sa phase rouge possèdent une activité antimicrobienne à l'égard de la bactérie à Gram (-) *E. coli* et la bactérie à Gram (+) *S. aureus*, Cela a été

associé à la présence d'acides gras à courte chaîne, à savoir l'acide butanoïque et l'acide lactique méthyle [58].

1.5.1 Composés antibactériens des microalgues des eaux douces

Les micro-algues constituent l'un des plus importants produits commercialisés et des ressources renouvelables. Ils contiennent plus de 60 oligo-éléments, y compris les minéraux, protéines, l'iode, du brome et de nombreuses substances bioactives. À ce jour, de nombreux composés chimiques ont été isolés à partir des organismes originaires des eaux douces et qui sont doués de diverses activités biologiques, et certains d'entre eux sont sous enquête et certaines sont utilisées pour développer de nouveaux produits pharmaceutiques [40].

Ces organismes sont exposés à des conditions extrêmes dans leurs niches et par conséquent, ils doivent s'adapter rapidement et efficacement pour pouvoir produire une grande variété de métabolites secondaires biologiquement actifs qui participent à des mécanismes de défense naturelle [50]. Ces stratégies de défense sont induites à un niveau élevé à la diversité structurale et chimique des composés résultant de différentes voies métaboliques. Les micro-algues peuvent biosynthétiser, métaboliser, accumuler et sécréter divers métabolites primaires et secondaires, dont beaucoup sont de précieuses substances ayant des potentielles applications en industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique [59].

Plusieurs études ont prouvés l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits algales [48, 60-67]. La majorité de ces agents antimicrobiens sont des acides gras, lipides, glucides, polyphénols, pigments, hydrocarbures simples et d'autres dérivés (tableau 1.2).

Depuis plusieurs années, les scientifiques se penchent à la recherche et le développement des microalgues comme source d'innocuité et de composés biologiquement actifs tels que : la phycobiline, les phénols, les glucosides phénoliques, les saponines et les phytoalexines terpénoïdes, les stéroïdes et les polyosidique [68]. Les plus importants composés qui ont été identifiés comme des agents antimicrobiens sont : les acides gras, l'acide acrylique, les composés

aliphatiques halogénés, les terpènes, le soufre contenant des composés hétérocycliques, les glucides et les phénols [69]. De nombreuses structures chimiques ont été identifiées comme les acides gras et les acides gras insaturés d'hydroxyle, les glycolipides, les stéroïdes, les phénoliques et les terpénoïdes. MAC MILLAN et al.; SHANAB et al.; TAN et al. [70-72] ont prouvés le potentiel antibiotique de l'acide laurique, l'acide palmitique, l'acide linoléique, l'acide oléique ainsi que l'acide stéarique.

Tableau 1.2 : Composés antibactériens de différentes algues et les bactéries pathogènes cibles [40]

Composés antibactériens	Microalgues	Bactéries pathogènes cibles	Références
Pigments	<i>Anabaena cylindrical</i> <i>Chlorococcum humicola</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Nostoc</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Enterobacteria aerogens</i>	[56, 73-75]
Acides gras et lipides	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Chaetoceros muelleri</i> , <i>Spirulina platensis</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA, <i>Listonella anguillarum</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Vibrio</i> spp	[44, 58, 76]
Carbohydrates	<i>Anabaena sphaerica</i> , <i>Chroococcus turgidus</i> , <i>Oscillatoria limnetica</i> , <i>S.platensis</i> , <i>Porphyridium cruentum</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. faecalis</i>	[77, 78]
Polyphénols	<i>Anabaena sphaerica</i> , <i>Chroococcus turgidus</i> , <i>Oscillatoria limnetica</i> , <i>Spirulina platensis</i>	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	[78-81]

Les lipides algales sont composés principalement de glycérol, des bases estérifiées des acides gras saturés ou insaturés (C_{12} au C_{22}). Parmi tous les acides gras des microalgues, certains de la famille des $\omega 3$ et $\omega 6$ ont un intérêt particulier [82]. De nombreux auteurs ont constatés que les activités antibactériennes des microalgues sont dues à des acides gras [83]. L'activité antibactérienne des acides gras insaturés et saturés à longue chaîne qui ont plus de 10 atomes de carbone induit la lyse des protoplastes bactérienne. Les lipides de la spiruline a été étudiées comme une source naturelle de substance bioactive fonctionnelle vue son effet bénéfique pour la santé humaine [84]. Plus précisément, l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques de *S. platensis* a été expliquée par la présence de γ -linoléinique [85], qui a un pouvoir antibiotique très actif et qui présent à une forte concentration dans cette algue [76]. Un peptide modifié bioactif qui est l'aeruginosamide, qui a été isolée de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* [86].

Les glucides dans les microalgues peuvent être trouvés sous la forme d'amidon, de glucose, de sucre et d'autres polysaccharides. La plupart des microalgues produisent des polysaccharides et certains d'entre eux pourraient avoir des applications industrielles et commerciales, vu leurs croissance rapide ainsi que la possibilité de contrôler les conditions environnementales qui régissant sa croissance. Les extraits aqueux de cinq espèces des algues des eaux douces, *Anabaena sphaerica*, *Chroococcus turgidus*, *Oscillatoria limnetica*, *Spirulina platensis* et *Cosmarium leave* contiennent des polysaccharides qui ont montrés une activité antibactérienne à l'égard d'*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Streptococcus faecalis* [78].

Depuis longtemps, l'activité antibactérienne des dérivés de la chlorophylle soluble a été évaluée [87]. SMITH *et al.* [88] a rapporté que la chlorophylle n'a pas un effet strictement bactéricide mais plus tôt bactériostatique, par contre dans des bonnes conditions environnementales, elle peut exercer un effet bactéricide. NEVIN ET BIBBY [89] ont montré que la chlorophylle a inhibé la croissance des staphylocoques, des streptocoques et des lactobacilles.

Selon SAEKI et al. [90], la chlorophylle a inhibé la croissance des bactéries testées, en particulier *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum*. Tandis que JAYA et al. [73] ont évalué l'activité antibactérienne de la chlorophylle a et b à partir de certaines micro-algues de l'eau douce de la Godavari sriver (Inde).

Les principaux caroténoïdes produits par les microalgues sont le β -carotène de *Dunaliella salina* et l'astaxanthine de *Haematococcus pluvialis*. Les activités antibactériennes des caroténoïdes ont été très documentées [91]. L'effet protecteur de la β -carotène provenant d'algues vertes *Chlorococcum humicol* a également été rapportée [92].

Les principales ressources naturelles de la phycobiliprotéine sont la cyanobactérie *Spirulina (Arthrospira)* pour la phycocyanine (bleu) et la Rhodophyte *Porphyridium* pour la phycoérythrine (rouge) des groupes prosthétiques chromophore nommés les phycobilines. Les phycobiliprotéines sont des pigments, solubles dans l'eau, produites par les cyanobactéries (algue bleu-vert), les algues rouges et les crypto-monades [93]. Les cyanobactéries, les rhodophycées ainsi que les cryptomonades contiennent des phycobiliprotéines, les pigments profonds fluorescents solubles dans l'eau et qui sont les principaux composants d'un complexe d'assemblage de la lumière photosynthétique des pigments qui sont les phycobilisomes [94].

Dans la spiruline, la phycocyanine est un phycobiliprotéine, elle est utilisée contre de nombreuses infections bactériennes et qui est douée des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antivirales. Elle est effectivement active contre les bactéries pathogènes tels que *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp. [56, 95].

De grandes quantités de la phycocyanine ont été isolées et purifiées partiellement à partir de l'*Anabaena cylindrical* et la cyanobactérie filamenteuse des eaux douces *Westiellopsis* sp. qui a été testée contre les bactéries à Gram positives et à Gram négatives [78, 96].

RATTANACHAIKUNSOPON et PHUMKHACHORN [97] et ABDO *et al.* [78] ont rapporté que cinq microalgues des eaux douces isolées à partir d'une station d'eau égyptienne qui sont *Anabaena sphaerica*, *Chroococcus turgidus*, *Oscillatoria limnetica*, *Spirulina platensis* et *Cosmarium leave* contiennent de la quercétine qui est douée d'une activité antibactérienne.

Trois composés de l'isoflavone ont été identifiés dans les algues des eaux douces et les cyanobactéries [98]. Il a été également rapporté que les composés phénoliques sont actifs autant que des agents antibactériens contre différents micro-organismes tels que *Salmonella typhi* [99] et les flavonoïdes sont actives contre plusieurs souches comme *Streptococcus* sp. [79]; *E. coli* et *Staphylococcus aureus* [100].

Il existe d'autres composés phytochimiques qui ont été documentés pour leurs potentiels antimicrobiens, nous citons le dérivé de la microalgue « oxylipines » ainsi que les aldéhydes insaturés. Ces composés sont synthétisés par des diatomées, par exemple *S. costatum* et *Thalassiosira rotula*. SMITH *et al.*, [88] ont étudiés le decadienal, un composé probablement dérivé de l'acide gras polyinsaturé l'acide arachidonique (C20:4 n-3), qui présente une forte activité antibactérienne contre les souches pathogènes multi résistante tels que *S. aureus* (MRSA) et *Haemophilus influenza* ainsi qu'à l'égard de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *S. epidermidis*. Certains composants volatils et des divers extraits de la spiruline ont également montrés des activités antibactériennes [101, 102].

1.5.2 Mécanisme d'action des agents antibactériens

Les agents antimicrobiens agissent sélectivement sur les fonctions microbiennes vitales avec des effets minimes ou sans affecter les fonctions hôte. Différents agents antimicrobiens agissent de différentes façons. La compréhension de ces mécanismes ainsi que la nature chimique des agents antimicrobiens est cruciale dans la compréhension de la manière comment la résistance contre eux se développe. Généralement, les agents antibactériens peuvent être décrits comme étant soit bactéricide ou bactériostatique [103].

Cependant, le mécanisme d'action des agents antimicrobiens peuvent être classés en outre selon la structure de la bactérie ou de la fonction qui est ciblée par les agents. Les modes d'action des différents agents antibactériens sont représentés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Mécanisme d'action de certains agents antimicrobiens

Composés antimicrobiens	Mécanisme d'action des agents antimicrobiens	Références
Caroténoïdes	La digestion des parois cellulaires par les enzymes de lysozyme.	[104]
Flavonoïdes	Augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne et une dispersion du potentiel membranaire Increase in permeability of the inner bacterial membrane and a dissipation of the membrane potential	[105]
Polyphénols	Binds to adhesins, enzyme inhibition, substrate deprivation, complex with cell wall, membrane disruption	[40]
Polysaccharide	Inhibition of hyaluronidase.	[40]
Acides gras et Lipides	Disruption of the cellular membrane	[106, 107]

Le mécanisme d'action des acides gras reste jusqu'à présent mal défini, ils peuvent agir sur de multiples cibles cellulaires, même si les cellulaires membranaires sont les plus probables, qui vont être endommagées ce qui entraîne des pertes cellulaires et la réduction de l'absorption des éléments nutritifs et une inhibition de la respiration cellulaire, inversement, DESBOIS *et al.* [107] ont rapporté que les acides gras tuent les bactéries selon un processus de peroxydations en impliquant de peroxyde d'hydrogène.

En outre, des composés synthétisés par *Scenedesmus costatum* et partiellement purifiés à partir de leur extrait organique, ont montrés une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes d'aquaculture (*Listonella anguillarum*, *Lactococcus garvieae* et *Vibrio* sp.) car leurs acides gras sont de longue chaîne et qui contiennent plus de 10 atomes de carbone, ce qui semble-t-il provoquer la lyse des protoplastes bactérienne. Plusieurs études ont démontrées l'activité antimicrobienne de certains acides gras notamment l'acide palmitoléique et l'acide oléique, LAMPE *et al.*, (1998) [106] ont émis l'hypothèse que les lipides tuent les micro-organismes en entraînant une rupture de la membrane cellulaire. BERGSSON *et al.* [108] ont confirmé la susceptibilité des bactéries à Gram négatif à être tué par les lipides et c'est du probablement aux différents types de parois cellulaires externes des bactéries.

1.6 Spirulina sp.

1.6.1 Historique

La spiruline nommée Tecuitlatl par les aztèques, cela signifie à des excréments de pierre au cours du 16^{ème} siècle. Plus tard, en raison de l'augmentation accrue des maladies contagieuses, des nouveaux produits ont été adoptés à des raisons religieuses, politiques et sociales et le thème de Tecuitlatl est venu à une fin. Il n'était pas connu jusqu'à quand l'homme a commencé à utiliser des micro-algues, mais à l'heure actuelle, cette ressource peut être ainsi appelé, "tendance verte" [109].

La spiruline - " Les petits gâteaux faits de la boue comme les algues, et que les autochtones ont pris à l'extérieur du lac pour faire du pain,...". Ils étaient séchés en gâteaux appelés "Dihé" ou "Die". Retour en 9^{ème} siècle, pendant l'Empire du Kanem, que de la spiruline à longue histoire au Tchad. En 1961, un court récit, la voix des dauphins, Leo Szilard postulé le développement de complément alimentaire à base d'algues et les algues nommé comme "Amruss". Au début des années 1970, des première usines de production à grande échelle par Sosa Texcoco, ont été établis [110].

La spiruline est commercialisée et consommée dans de nombreux pays comme l'Allemagne, le Brésil [111], le Chili, l'Espagne, la France, Canada, la Belgique, l'Égypte, les États-Unis, l'Irlande, l'Argentine, les Philippines, l'Inde, l'Afrique et d'autres pays, où l'administration publique, les organismes sanitaires et les associations ont approuvés sa consommation humaine [109].

Certaines des meilleures sociétés de production de la spiruline, connue dans le monde entier sont : Earthise Farms (USA), Cyanotech (USA), Hainan microalgues DIC Co., Ltd (Chine), Marugappa Chettir Research Centre (Inde), Genix (Cuba) et Solarium Biotechnologie (Chili) [112, 113].

1.6.2 Systematique

La spiruline (*Arthrospira*) est une bactérie photosynthétique qui utilise l'énergie solaire et l'eau pour la production de la biomasse et de l'oxygène et qui couvre le groupe des *Cyanobacteria* et *Prochlorales* [114]. Il s'agit des microorganismes filamenteux, non-hétérocystous. Les cyanobactéries qui sont généralement trouvés dans les régions tropicales et subtropicales dans des milieux à forte teneur en carbonate/bicarbonate, à un pH alcalin et une forte salinité. Leurs grandes vacuoles à gaz filamenteuses (3 à 12 µm de diamètre) sont facilement recueillies par filtration et d'autres moyens de séparation. La spiruline a été isolée à partir des échantillons d'eau douce en 1827 par Turpin [110].

STIZENBERGER en 1892 a étudié les formes d'aseptées du genre *Spirulina* et les formes spatiales du genre *Arthrospira*. Plus tard, il a regroupé les deux genres sous la désignation *Spirulina*. En 1989, ces micro-organismes ont été classés en deux genres, selon les suggestions de Gomont en 1892 [115]. Actuellement, cette classification est acceptée [114].

STANIER et VAN NEIL [116] ont incorporé les algues marines bleues-vertes dans le Règne des procaryotes et qui a nommé ces micro-organismes « cyanobactérie » et ce qui a été accepté et publié en 1974 dans le Manuel de Bergie de la Détermination de la bactériologie [117].

Les cyanobactéries (cyanoprokaryotes) sont un groupe particulièrement difficile à classer. Ils sont sans doute l'un des plus anciens groupes d'organismes sur terre, avec certains représentants fossiles ayant une morphologie très semblable aux espèces d'aujourd'hui [118, 119].

Sa longue et complexe évolution dans l'histoire (éventuellement obtenus par le transfert génétique horizontal, comme il a été indiqué par leur homoplasie) est difficile à cerner simplement à partir de la morphologie. Un certain nombre de caractères morphologiques ont été utilisés pour définir les taxons supérieurs (la forme coccal vis-à-vis trichal, l'effilé, la polarité, les types de ramification, les dimensions, présence des akinètes, etc.) ont apparemment été soulevées et/ou perdus à plusieurs reprises au cours de l'évolution des espèces et des genres [120-122].

Plusieurs systèmes de classifications des organismes supérieurs de cyanobactéries ont été publiés. Après les premiers systèmes de classification [123, 124], GEITLER [125] a proposé pour la première fois, *Chroococcales*, *Entophysalidales*, *Pleurocapsales*, *Dermocarpales*, *Siphononematales*, *Nostocales* et *Stigonematales*, mais sept ans plus tard, il a été adopté le système proposé par FREMY [126], qui n'incluait que trois ordres : *Chroococcales*, *Chamaesiphonales* et *Hormogonales* [127]. Dix ans plus tard, GEITLER [128] a reconnu : *Chroococcales*, *Dermocarpales*, *Pleurocapsales* et *Hormogonales*. 24 ans après quelques modifications ont été rapportés par ELENKIN [129] et STARMACH [130].

DESIKACHARY [131] a surtout reconsidéré *Stigonematales* et a suivi d'autres auteurs dans l'union des taxons filamenteux du non-embranchement dans le même ordre (bien qu'il ait choisi *Nostocales*). Rippka et d'autres. (1979) [132] a recommandé cinq sections, qui sont devenues la base primaire pour la classification de la nomenclature dans le Manuel de Bergey de la systématique Bactériologique et qui a reconnu cinq sub-sections au lieu des ordres, I (= *Chroococcales*), II (= *Pleurocapsales*), III (= *Oscillatoriales*), IV (= *Nostocales*) et V (= *Stigonematales*) [133].

Depuis 2000, plus de 50 genres de cyanobacteria ont été décrits. Au 19^{ème} symposium IAC à Cleveland (le 28 juillet – le 2 août 2013), 16 nouveaux genres putatifs supplémentaires ont été proposés à de nombreuses espèces [134].

1.6.2.1 Spirulinales

Cet ordre avait une position phylogénétique spécifique et caractéristique par une vis régulière, typique comme des trichomes spiralés sans gaines et qui ont des caractéristiques cytologiques et écologiques. La spiruline a une position instable dans les phylogénies moléculaires pour un long moment. Du point de vue morphologique, le problème de l'hélice ouverte et fermée n'est pas toujours résolu. Avec le séquençage du génome entier maintenant il est plus facile son classement phylogénétique, il semble qu'il est dans sa propre famille et qui toute à fait différente de *Synechococcophycidae* à laquelle il a été longtemps pensé d'appartenir. Donc, la spiruline a été classée dans un nouvel ordre. La souche commerciale " *Spirulina platensis* " est très différent à ces critères cytologiques et phylogénétiques, de cet ordre et doit être classé dans le genre *Arthrospira* (*Oscillatoriales*, *Microcoleaceae*).

1.6.2.2 Spirulinaceae (Gomont) Hoffmann, Komárek et Kaštovský

Syn. *Spirulinoideae* Gomont 1892. Les genres *Spirulina* et *Halospirulina* sont décrits à l'aide principalement des données moléculaires. Si *Halospirulina* est retenu comme un genre distinct, il fera de la spiruline polyphylétique et une révision est nécessaire [135].

1.6.2.3 Chroococcales

Cet ordre a été considérablement réduit par rapport à l'ancien concept lorsqu'il inclus des formes coccoïdes, plus compliqué avec la cytologie et sans baeocyte la production (comp. GEITLER ANAGNOSTIDIS KOMAREK, 1932 & 1998). Il a été restreint afin d'inclure seulement les coccidés qui ont plus ou moins un arrangement de thylakoïdes irréguliers que de simples des thylakoïdes pariétal (c.-à-d. l'exclusion des formes actuelle des *Synechococcales*). Il n'y a pas de données moderne pour de nombreuses familles dans cet ordre et leur évaluation plus approfondie est nécessaire. Il n'y a pas de nouvelles données pour de

plusieurs familles dans cet ordre et leur évaluation plus approfondie est nécessaire.

La spiruline appartient à l'ordre des *Nostocales* (= *Oscillatoriales*), la famille des *Oscillatoriaceae*, le genre *Oscillatoria* et le sous genre *Spirulina* ou *Arthrospira* [136].

La spiruline est classée selon RIPLEY FOX [137] dans :

Règne	Monera
Groupe ou Sous Règne	Procaryotes
Embranchement	Cyanophyta
Classe	Cyanophyceae
Ordre	Nostocales (= Oscillatoriales)

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

1.6.2.4 Famille Oscillatoriaceae

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

1.6.2.5 Genre *Oscillatoria*

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

1.6.2.6 Sous genre *Spirulina*

Le sous genre *Spirulina* qui groupe les espèces à trichome régulièrement enroulé en hélice plus ou moins serrée, soit une trentaine d'espèces dans les eaux douces en général. Leur déplacement s'effectue en se vrillant dans l'eau à la façon d'une vis. Les spirulines sont abondantes dans les eaux salées et natronées sahéliennes, et une espèce *Spirulina platensis* forme des fleurs

d'eau particulièrement denses ; dans certaines régions du Tchad (Kanem). Cette micro algue change de forme en fonction des caractéristiques physiques et chimiques du milieu dans lequel on la trouve. Mais on remarque aussi que dans un même milieu on trouve des variétés des formes [137].

1.6.2.7 Espèces

Parmi le genre *Arthrospira*, il existe trois espèces qui sont les plus largement cultivées dans le monde entier et utilisées comme des aliments fonctionnels ainsi que des compléments alimentaires, et des sources potentielles de composés de hautes valeurs nutritionnelles et de métabolites pharmaceutiques [138]. Ces espèces sont :

- *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*);
- *Spirulina geitleri* ou *Spirulina maxima* (*Arthrospira maxima*);
- *Spirulina fusiformis* ou *Spirulina jeejibai* (*Arthrospira fusiformis*)

1.6.3 Morphologie et caractères généraux

L'*Arthrospira* c'est une cyanobactérie filamenteuse reconnaissable par la principale caractéristique morphologique du genre : l'arrangement du trichome cylindrique multicellulaire sur toute la longueur de l'hélice (figure 1.11) [114].

Sous microscope optique, les filaments de couleur bleu-vert non-hétérocystous, composés des cellules végétatives qui subissent une fission binaire dans un plan simple. Les filaments sont solitaires, libres et flottantes avec une mobilité par glissement. Les trichomes sont enveloppés par une fine gaine, voire légèrement plus ou moins prononcées à l'encontre des constriction et des parois ont l'apex très peu ou pas du tout atténué. Les cellules apicales peuvent être largement arrondie ou pointue. La largeur du trichome sont composés de cellules cylindriques plus courtes que les cellules des extrémités qui varient de 6 à 12 μm (16 μm) dans des différentes formes (figure 1.12). Le pitch de l'hélice (h) est déterminé par l'équation :

$$h = 2 \times \pi \times r \times \cos \alpha$$

D'où:

r: Rayon de la surface du cylindre sur lequel l'hélice appartient ;

a : Angle formé par l'hélice et le cylindre génératrices et représente la pente de la courbe d'hélice. [114]

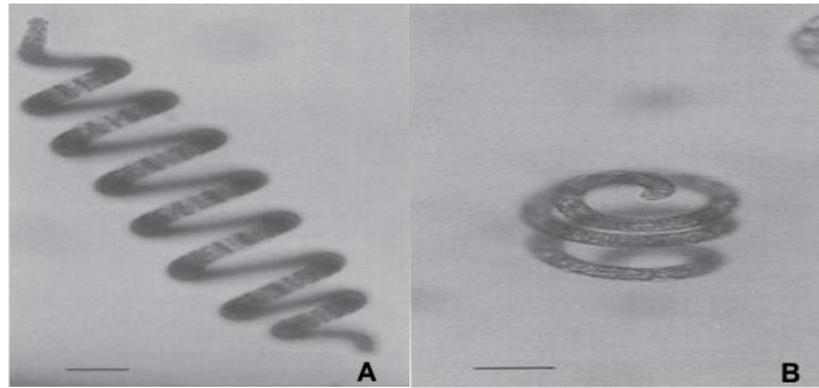


Figure 1.11 : Microphotographie de la spiruline. (A) : *Arthrospira maxima*, (B) : *Arthrospira platensis* (x 40).

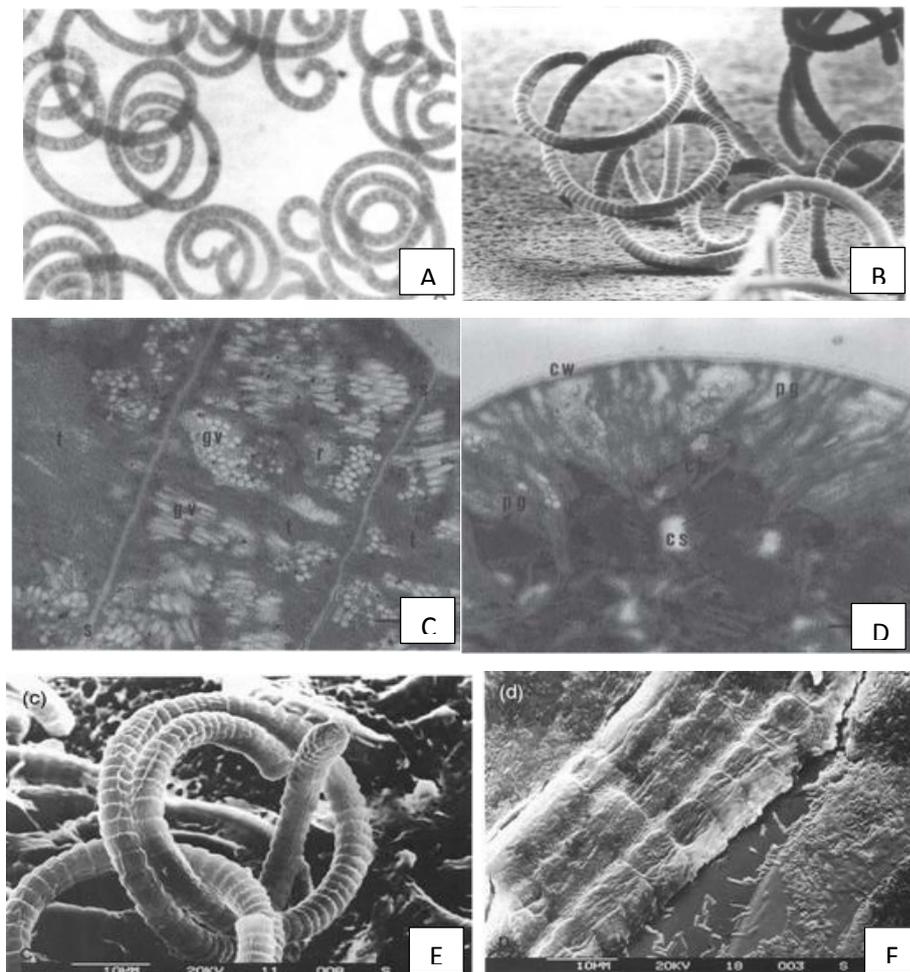


Figure 1.12 : Morphologie de la Spiruline. (A) Observation microscopique de *S. platensis* axénique (x40), (B) micrographie de microscope électrique à balayage du trichome de *S. platensis* axénique, (C) Micrographie de la division du trichome (section longitudinale) de *S. maxima*, (D) Micrographie de la section transversale de la paroi multicouche d'*Arthrospira platensis*, (E) Micrographie du trichome de de *S. platensis* (40 µm), (F) Micrographie du trichome de de *S. platensis* (10 µm) [114].

Dans de nombreuses souches de ces deux espèces, l'hélice est variable de 12 à 72 μm . Aussi le diamètre de l'hélice varie, allant d'environ 30 à 70 μm .

Les facteurs environnementaux, notamment la température, les conditions physiques et chimiques peuvent avoir une incidence sur la géométrie de l'hélice. Une modification radicale de cette géométrie c'est une transition de réversible de l'hélice en spirale après le transfert des filaments du milieu liquide à solide. Ces modifications ont été observées par VAN EYKELENBURG et al. [139].

1.6.4 Ultrastructure

Une organisation procaryotique avec des fibrilles dans la région d'ADN, système photosynthétique, paroi cellulaire pluristratifiée, capsule, ribosomes et de nombreuses inclusions. La paroi cellulaire est composée de quatre couches numérotées : L I, L II, L III et L IV [110]. La couche L I n'est pas digestible par l'homme, elle contient β -1, 2-glucane tandis que la couche L II contient des protéines et des lipopolysaccharides ce qui est la raison de la digestibilité de la spiruline par l'homme [140].

1.6.5 Cycle biologique

Il y a trois stades fondamentaux : la fragmentation des trichomes à partir des nécriides qui sont des cellules de filament de spiruline et que se différencient des autres cellules par leur aspect biconcave et sont assimilées à des disques de séparation. Le trichome se fragmente pour donner de nouveaux filaments de 2 à 4 cellules appelés hormogonies. Ces derniers vont croître en longueur par division binaire (chacune des cellules va donner deux cellules par scissiparité) et prendre la forme typique hélicoïdale (Figure 1.13) [136]. En conditions expérimentales, le temps de génération (passage d'une génération à une autre) maximal de la spiruline est de l'ordre de 7 heures [141].

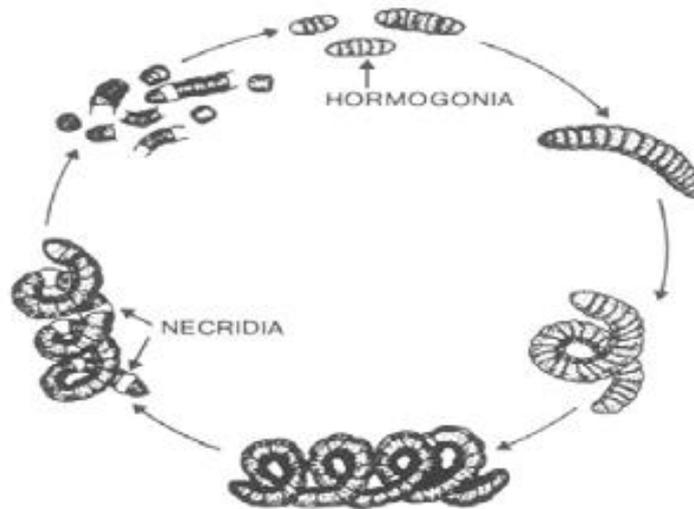


Figure 1.13 : Cycle biologique de la spiruline [136].

1.6.6 Composition nutritionnelle

La composition chimique de la spiruline a été effectuée pour la première fois en 1970 ou ils ont pu démontrer que cette algue est une source de protéines, vitamines et minéraux [114].

Les protéines représentent environ 60 à 70 % de son poids sec [110, 142]. Dans une étude, la spiruline a été utilisée comme complément protéique dans l'alimentation des tilapia, et d'après les résultats trouvés, ils ont pu démontrer que cette biomasse peut substituer jusqu'à 40 % de protéine du régime alimentaire des tilapia [143].

Autre avantage: la spiruline est beaucoup plus facile à digérer que d'autres compléments alimentaires comme les levures ou les chlorelles. Ses cellules ne sont pas protégées par d'épaisses parois cellulodiques, ce qui lui vaut un "taux de digestibilité" de l'ordre de 83 à 90 % [136].

Les minéraux spécialement intéressants de la spiruline sont le fer, le calcium, le phosphore et le magnésium. La spiruline constitue une source importante de fer (20 fois plus élevée que le germe de blé) [136, 144]. Elle contient 4 – 7 % de lipides [145], 13,6 % des carbohydrates [146] et fibres alimentaires (3 %) [147, 148]. Très riche en provitamine A (β -carotène) [149] et en vitamine B12 ce qui

motive son utilisation dans le traitement de l'anémie pernicieuse. Elle procure une quantité adéquate en fer aux femmes enceintes anémiques [150]. Elle contient 2,2 % - 3,5 % de ANR et 0,6 % - 1 % de AND [110].

La spiruline contient des acides gras comme : l'acide γ -linoléique (GLA) (une substance aux propriétés anti-inflammatoires qui appartient à la famille des bons acides gras oméga-6) [151], l'acide linoléique, acide docosahéxanoïque, l'acide eicosapentaénoïque, l'acide arachidonique et l'acide stéarique. L'oxydation des lipides insaturés est inhibée par la vitamine K (tocophérol) que l'on trouve aussi dans la spiruline [152].

Il y a également peu de pigments naturels tels que les carotènes, la chlorophylle a et la phycocyanine et ces micro-organismes sont utilisés comme source de pigmentation pour le poisson et les œufs [109, 110].

D'après une étude qui a été menée en 2008 par SALEH et al. [153], il a été rapporté que la β -carotène est contenue dans sept souches de spiruline parmi elle, on peut citer la souche Sp₄ qui a accumulée environ 231,7 $\mu\text{g/g}$ de son poids sec.

1.7 Chlorella sp.

1.7.1 Historique et taxonomie

Chlorella sp., c'est une algue verte unicellulaire d'eau douce [154] immobile, qui appartient à la classification suivante :

- Règne : Eucaryote
- Sous règne : Protista ;
- Embranchement : Chlorophyta ;
- Classe : Tre-bouxiophyceae
- Ordre : Chlorococcales ;
- Famille : Chlorellaceae
- Genre : *Chlorella*.

En 1890 MARTINUS WILLEM BEIJERINCK [154], c'était le premier chercheur néerlandais, qui a découvert une première microalgue marine avec un nucléotide nettement défini. Au début des années 1900, la teneur en protéine de la Chlorelle (> 55 % de poids sec) a attiré l'attention des plusieurs scientifiques allemands comme une source de nourriture. Au cours des années 1950, l'Institution Carnegie de Washington a repris de l'étude et a réussi à cultiver cette microalgue sur une grande échelle avec un abaissement de CO₂. Ces dernières années au niveau mondial, le Japon est la tête de liste des pays grands consommateurs de la chlorelle et leur utilisation dans les traitements médicales [155] et puisque elle a douée des propriétés anti-cancéreuses et immuno-modulateurs [156].

La consommation de la chlorelle sous forme de poudre par les rats, les souris ainsi que les lapins a démontrée des propriétés de protection contre les hématopoïèse [157], les maladies cardiovasculaires, hypertension et la cataracte. Elle baisse le risque d'athérosclérose et stimule la synthèse du collagène de la peau [158]. En outre, la chlorelle est aussi capable d'accumuler des quantités importantes de lipides, surtout après l'inanition d'azote avec un profil des acides gras convenables pour la production biodiesel [159].

Le nom *Chlorella* vient d'un mot grec *chloros* (Χλωρός), qui signifie vert et le suffixe latin *ella* signifié sa grandeur microscopique. C'est une microalgue marine unicellulaire qui croit dans les eaux douces et qui a été présente sur la planète terre depuis la période pré-cambrienne il y a 2,5 milliards d'années et depuis ce jour son intégrité génétique a restée constante [158].

La rigidité préserve l'intégrité de la cellule et est fondamentalement une protection contre les envahisseurs et l'environnement dur. Il varie selon chaque phase de croissance [158].

1.7.2 Morphologie

Les cellules sont de forme sphérique ayant une tendance à former des colonies de couleur jaune-verte, et d'un diamètre de 2 à 10 μm [160, 161], sans flagelles, avec beaucoup d'éléments structurels similaires aux plantes (Figure 1.14).

La rigidité de la paroi cellulaire préserve l'intégrité de la cellule et qui représente principalement une protection contre les envahisseurs et les conditions environnementales. Elle varie selon chaque phase de croissance.

Durant sa première formation dans son autospore, la nouvelle paroi cellulaire formée reste fragile, en formant une couche unilaminaire très fine de 2 nm. La paroi cellulaire de la cellule fille augmente progressivement dans l'épaisseur jusqu'à ce qu'il atteigne 17 – 21 nm après la maturation [162], où la couche microfibrillaire est formée en représentant une couche en chitosane composée de glucosamine [163], et qui représente sa rigidité. Au stade de maturité, l'épaisseur de la paroi cellulaire et sa composition ne sont pas constants et qu'ils peuvent changer au cours de la croissance et selon les conditions environnementales.

En outre, quelques rapports ont expliqué la rigidité de la paroi cellulaire en se focalisant sur la présence d'une couche sporopollénine, bien qu'il a été accepté que *C. vulgaris* a une paroi cellulaire unilaminaire qui ne contient pas de sporopollénine, qui est un caroténoïde polymère extrêmement résistant et qui se trouve sur la paroi cellulaire de *Haematococcus pluvialis* [164] et *Chlorella fusca* [165]. Tandis que, une étude contradictoire de MARTINEZ *et al.* [166] et qui ont rapportés que *C. vulgaris* révèle la présence de sporopollénine en observant une couche trilaminaire extérieure et en découvrant des résidus résistants après être soumis à une acétolyse.

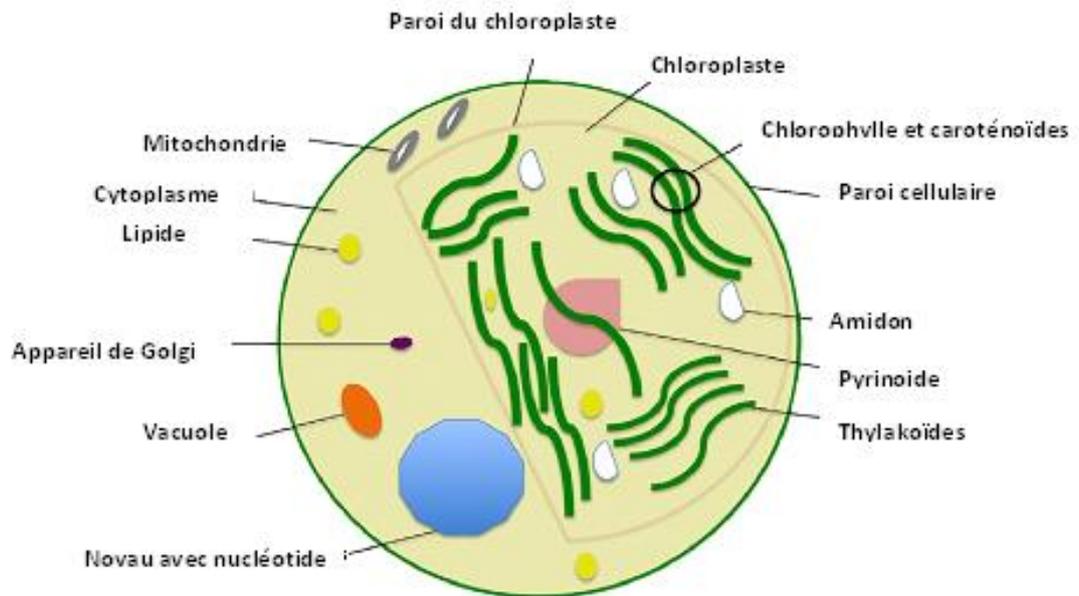


Figure 1.14 : Schéma de l'ultrastructure de *Chlorella* sp. des différents organes [158].

Le cytoplasme est une substance semblable au gel confinée dans la barrière de la membrane cellulaire et il est composé de l'eau, des protéines solubles et des minéraux. Il contient les organes intérieurs de la chlorelle comme la mitochondrie, un petit noyau, une vacuole, un chloroplaste simple et un appareil de Golgi [158].

Chaque mitochondrie contient un matériel génétique, un appareil respiratoire et une double-couche membranaire, la membrane externe entoure tous les organes et elle est composée d'un rapport égal de protéines et de phospholipides. Alors que, la membrane interne est composée de trois fois plus de protéines que de phospholipides, elle entoure l'espace intérieur appelé la matrice, qui contient la majorité de protéines mitochondrial [158].

La chlorelle possède un seul simple chloroplaste avec une double membrane composée de phospholipides, la membrane externe est perméable aux métabolites et les ions, mais la membrane interne a une fonction plus spécifique comme le transport des protéines. Les grains d'amidon sont composés d'amylose et d'amylopectine et qu'ils peuvent être formés à l'intérieur du chloroplaste, surtout

pendant les conditions de croissance défavorables. Le pyrinoïde contient des teneurs élevées en ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) et qui est le centre de fixation de dioxyde de carbone [158].

Le chloroplaste contient aussi un groupe de thylakoïdes fusionnés où la chlorophylle le pigment dominant est synthétisée en masquant la couleur d'autres pigments comme la lutéine. Pendant le stress d'azote, les globules lipidiques sont accumulés surtout dans le cytoplasme et le chloroplaste [167].

1.7.3 Reproduction

La chlorelle c'est une cellule reproductrice non-mobile (autospore) qui se reproduit de façon asexuée et rapidement. Ainsi, dans 24 h, une cellule de la chlorelle cultivée dans des conditions optimales multiplie par autosporulation, qui est la reproduction asexuée la plus commune chez les algues. De cette manière, quatre cellules filles ayant leur propre paroi cellulaire sont formées à l'intérieur de la paroi cellulaire de la cellule mère (Figures 1.15 et 1.16). Après la maturation de ces cellules nouvellement formées, la paroi cellulaire de la cellule mère se rompt et les cellules filles se libèrent ainsi que des débris restants de la cellule mère qui seront une nourriture pour les cellules filles nouvellement formées [162].

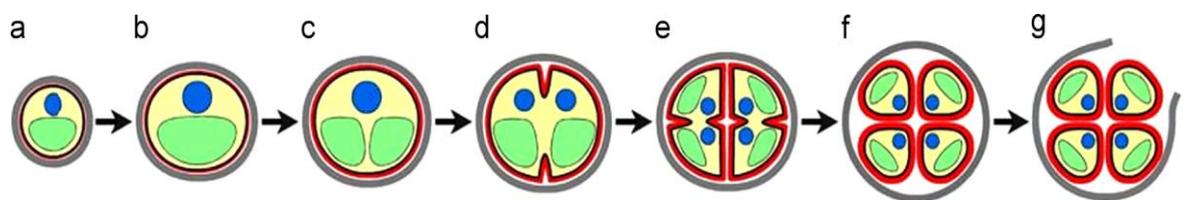


Figure 1.15 : Les différentes phases de formation des cellules filles de *Chlorella* sp. : (a) Première phase de la croissance cellulaire; (b) Dernière phase de la croissance cellulaire; (c) Phase de la division du chloroplaste; (d) Première phase de la division du protoplaste; (e) Dernière phase de la division du protoplaste; (f) Phase de maturation des cellules filles, (g) Phase d'éclosion [158].

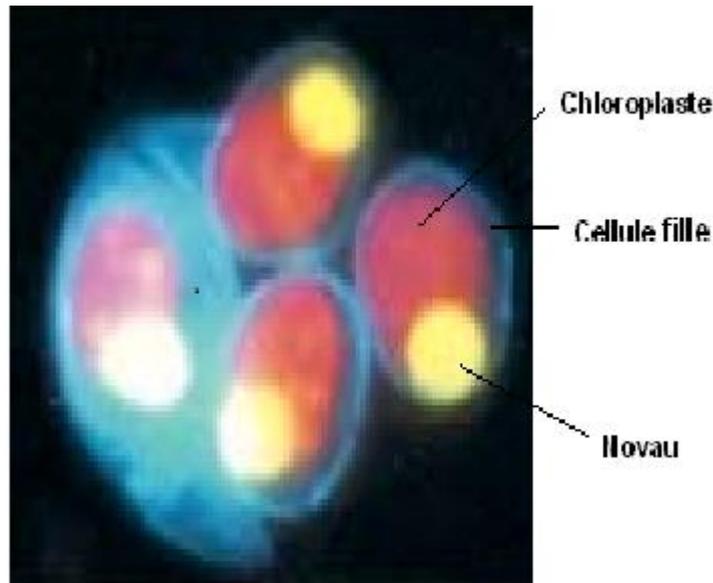


Figure 1.16 : Les cellules nouvellement formées émergent à l'extérieur de la paroi cellulaire de la cellule mère après l'éclosion [162].

1.7.4 Production

La production annuelle de la chlorelle a atteint 2000 t (de poids sec) en 2009 et les producteurs principaux sont le Japon, l'Allemagne et le Taiwan [10]. Cette microalgue a un taux de croissance rapide et répond à chaque ensemble de condition de croissance en modifiant la production d'une composante spécifique.

Sa production est très intéressante vue leur remarquablement résistance contre les conditions dures et les envahisseurs. D'une part, la teneur en lipides et en amidon augmente et la productivité en biomasse [168] diminue lorsque les conditions de croissance devient défavorables tel que la diminution en taux d'azote et de phosphore, une augmentation de la concentration de CO₂, l'exposition excessive à la lumière [169, 170], un excès en fer dans le milieu [171] ainsi que une augmentation dans la température. D'autre part, la teneur en protéine augmentant pendant les conditions de croissance normales et contrôlées (supplémentation en azote). Donc, beaucoup de techniques de croissance ont été testées pour améliorer la productivité de biomasse, la teneur en lipides, protéines, glucides et en pigments [158]. Généralement, la culture algale peut être cultivée photoautotrophie, hétérotrophie ou mixotrophie, dans des systèmes de culture ouverts ou fermés [172].

1.7.5 Composition nutritionnelle

Les protéines sont impliquées dans les fonctions principales telles que la croissance, la réparation et la maintenance des cellules aussi bien que le fait de servir comme des moteurs cellulaires, des messagers chimiques, des régulateurs d'activités cellulaires et de défense contre les envahisseurs étrangers [158]. La teneur en protéine de la Chlorelle représente 42–58 % du poids sec de la biomasse [173] et varie selon les conditions de croissance. Les protéines ont des rôles multiples et presque 20 % des protéines totales sont attachées à la paroi cellulaire, plus de 50 % sont à l'intérieur et 30 % émigrent dans et dehors de la cellule. Leurs poids moléculaires révélés par électrophorèse SDS-PAGE (en présence du dodécylsulfate de sodium sur gel de polyacrylamide) sont compris entre 12 et 120 kDa, avec la majorité entre 39 et 75 kDa après une croissance dans des conditions autotrophiques ou hétérotrophe. Un pic important d'intensité est observé chez les cellules cultivées dans des conditions autotrophiques [174]. La chlorelle contient un bon profil d'acides aminés (AA) en comparaison avec le profil standard pour la nutrition humaine proposé par l'Organisation de la Santé Mondiale (WHO) et l'organisation de la nutrition et de l'Agriculture (FAO), dont 19 acides aminés sont présent (y compris les acides aminés essentielles) [158].

Les lipides sont un groupe hétérogène de composés et qui ne sont pas définies par leurs structures mais plutôt selon leurs solubilités dans les solvants non-polaires et relativement leurs insolubilités dans l'eau [175]. Pendant les conditions optimales de croissance la chlorelle peuvent atteindre 5–40 % de lipides du poids sec de la biomasse et sont surtout composés de glycolipides, de cire, des hydrocarbures, de phospholipides et des petites quantités d'acides gras libres [167, 176].

Ces composants sont synthétisés par les chloroplastes et qui sont localisés aussi sur la paroi cellulaire et les membranes d'organes (membranes des chloroplastes et des mitochondries). Alors que, durant les conditions défavorables à la croissance, la teneur en lipides (composé surtout de triglycérols) peut arriver à 58 % [177, 178]. Autres lipides, triacylglycérols n'exerce pas leurs rôles

structurel, mais ils sont plutôt accumulés comme des réserves dans le cytoplasme ainsi que les espaces inter-thylakoïde des chloroplastes [176].

Selon Yeh et Chang [179] le profil des acides gras de la chlorelle cultivée sous les conditions de croissance mixotrophiques peut accumulé 60–68 % des acides gras saturés et monoinsaturés composés de l'acide palmitique C16:0, l'acide stéarique C18:0, l'acide palmitoléique C16:1 et l'acide oléique C18:1 [159]. Par contre si la chlorelle est cultivée dans des conditions favorables, son profil d'acide gras est inapproprié pour la production de biodiesel mais plus tôt convenable pour un usage nutritionnel vu la présence des acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique C18:2, l'acide linoléique C18:3 et l'acide eicosapentaénoïque C20:5 [180].

Les carbohydrates représentent un groupe des sucres réducteurs et des polysaccharides comme l'amidon et la cellulose. L'amidon est le polysaccharide le plus abondant chez la chlorelle. Il est localisé généralement dans le chloroplaste et il est composé d'amylose et amylopectine. L'amidon et les sucres représentent l'énergie de réserve au niveau cellulaire. La cellulose est le polysaccharide structural avec une grande résistance, il est localisé dans les parois cellulaires de la chlorelle autant que une barrière fibreuse protective. En plus, un des plus importants polysaccharides présents dans la chlorelle est le β 1-3 glucan [181], qui a multiples effets bénéfiques pour la santé et le bien-être [158]. Selon TEKEDA [182] la composition en sucres de la paroi cellulaire s'agit d'un mélange de rhamnose, galactose, glucose, xylose, arabinose et mannose dont le rhamnose est le sucre dominant (45–54 %).

Plusieurs auteurs ont rapporté que le pigment majoritaire de la chlorelle est la chlorophylle et qui peut représenter 1-2 % du poids sec. Elle est située dans les thylakoïdes. Selon DE-BASHAN *et al.* [183], KITADA *et al.* [184] et KONG *et al.* [185] la chlorophylle-a représente 250–9630 $\mu\text{g.g}^{-1}$ du poids sec de la chlorelle. Tandis que la chlorophylle-b représente 72–5770 $\mu\text{g.g}^{-1}$ du poids sec [186]. La chlorelle contient aussi des teneurs importantes en caroténoïdes : β -Carotène 7–12 $\mu\text{g.g}^{-1}$ du poids sec [184-187], Astaxanthine 550 $\mu\text{g.g}^{-1}$ [187, 188], Cantaxanthine 362 $\mu\text{g.g}^{-1}$ [185, 187] et en Lutéine 52–3830 $\mu\text{g.g}^{-1}$ [184, 189] Violoxanthine 10–37 $\mu\text{g.g}^{-1}$ [183].

Le β -carotène est par exemple associé aux gouttelettes lipidiques au niveau du chloroplaste, alors que les caroténoïdes primaires sont associés à la chlorophylle au niveau des thylakoïdes où se déroule la phase photochimique (ou claire) de la photosynthèse. Quelques pigments agissent comme des photo-protecteurs en protégeant les molécules de la chlorophylle de la dégradation et de la décoloration pendant la forte exposition aux radiations et à l'oxygène [158].

Ces pigments sont doués des propriétés thérapeutiques multiples, comme l'activité antioxydante [190], l'effet protecteur contre la dégénération de la rétine [191], en régulant le taux de cholestérol dans le sang, la prévention des maladies chroniques (cardiovasculaire et le cancer du côlon) et un fortifiant pour le système immunitaire [192]. Les phéophytines sont biochimiquement semblables à la chlorophylle, mais il manque l'ion Mg^{+2} ; il peut être formé après la dégradation de la chlorophylle durant la croissance des cellules microalgales ou durant les conditions d'extraction dures. En plus, ces pigments sont lipophiles et son extraction est généralement associée à l'extraction lipides [158].

La Chlorelle contient des minéraux tel que le sodium (1,35 g/100 g de poids sec), le calcium (0,59 g/100 g), le phosphore (1,76 g/100 g) [148], le potassium (2,15 g/100 g), le magnésium (0,44 g/100 g) [193], ainsi que certains oligo-éléments comme le fer (0,68 g/100 g), zinc (0,55 g/100 g), le manganèse (0,40 g/100 g) [193] tandis que le cuivre, le chrome et le sélénium a état de trace [148].

La chlorelle a un profil en vitamine hydrosolubles et liposolubles très important qui sont des éléments clés pour la croissance cellulaire et de différenciation dans le corps humain (Vitamine A) et qui sont aussi douées d'activité antioxydante et qui agissent sur l'amélioration de la circulation sanguine et le contrôle de la fonction des muscles (Vitamines E et C) [158]. Elle contient la vitamine B1 (Thiamine) (2,4 mg/ 100 g), vitamine B2 (Riboflavine) (6 mg/ 100 g) [194], vitamine B3 (Niacine) (23,8 mg/ 100 g) 198, vitamine B5 (pantothénique) (1,3 mg/ 100 g), vitamine B6 (pyridoxine) (1,7 mg/ 100 g), vitamine B7 (Biotine) (191,6 mg/ 100 g), vitamine B9 (acide folique) (26,9 mg/ 100 g), vitamine B12 (cobalamine) (125,9 mg/ 100 g) [193], vitamine C (100 mg/ 100 g) [194], vitamine E (2787 mg/100 g), vitamine A (Rétinol) (13,2 mg/ 100 g) [195].

CHAPITRE 2

MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN

2.1 Caractéristiques du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des micro-organismes, majoritairement des bactéries, qui résident au niveau du tube digestif. Il a été estimé que chez un être humain adulte, le microbiote intestinal renferme plus de 10^3 espèces bactériennes différentes correspondant à 10^{14} bactéries c'est-à-dire dix fois plus que le nombre totale de cellules eucaryotes humaines [196, 197]. Ce qui représente finalement plus de 1 à 2 kg de la masse corporelle [198]. La plupart des cellules du microbiote intestinal se trouvent dans le tractus gastro intestinal (TGI), avec une gamme de 10^1 à 10^3 bactéries par gramme de contenu dans l'estomac et duodénum pour 10^{11} à 10^{12} cellules par gramme dans le gros intestin. Il n'est donc pas étonnant que le microbiote intestinal soit aujourd'hui caractérisé comme un nouveau « organe » à part entière, un « petit monde » à l'intérieur de nous-mêmes [199], de telle sorte que la symbiose entre humain et microbiote soit aujourd'hui définie comme un « superorganisme » [200].

L'étude européenne des méta-génomiques du tractus intestinal qui a été menée en 2010 a révélé que parmi un consortium de 1 000 à 1 150 espèces bactériennes détectées dans les échantillons humains, au moins 160 sont communes à tous les individus. 3,3 millions de gènes microbiens dont 99 % sont bactériens ont été identifiés, ce qui représente environ 150 fois le génome humain [201]. La majorité de ces espèces sont des anaérobies et appartiennent à deux phyla dominants : les Gram+ *Firmicutes* et les Gram- *Bacteroidetes*. On retrouve également d'autres grands phyla tels qu'*Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* et *Methanobacteriales* ainsi que plusieurs mineurs comme *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria* (Figure 2.1). Ces espèces très majoritairement commensales ainsi que diverses levures et autres micro-organismes coexistent dans un équilibre écologique et dynamique et ne jouent pas de rôles pathogènes [202].

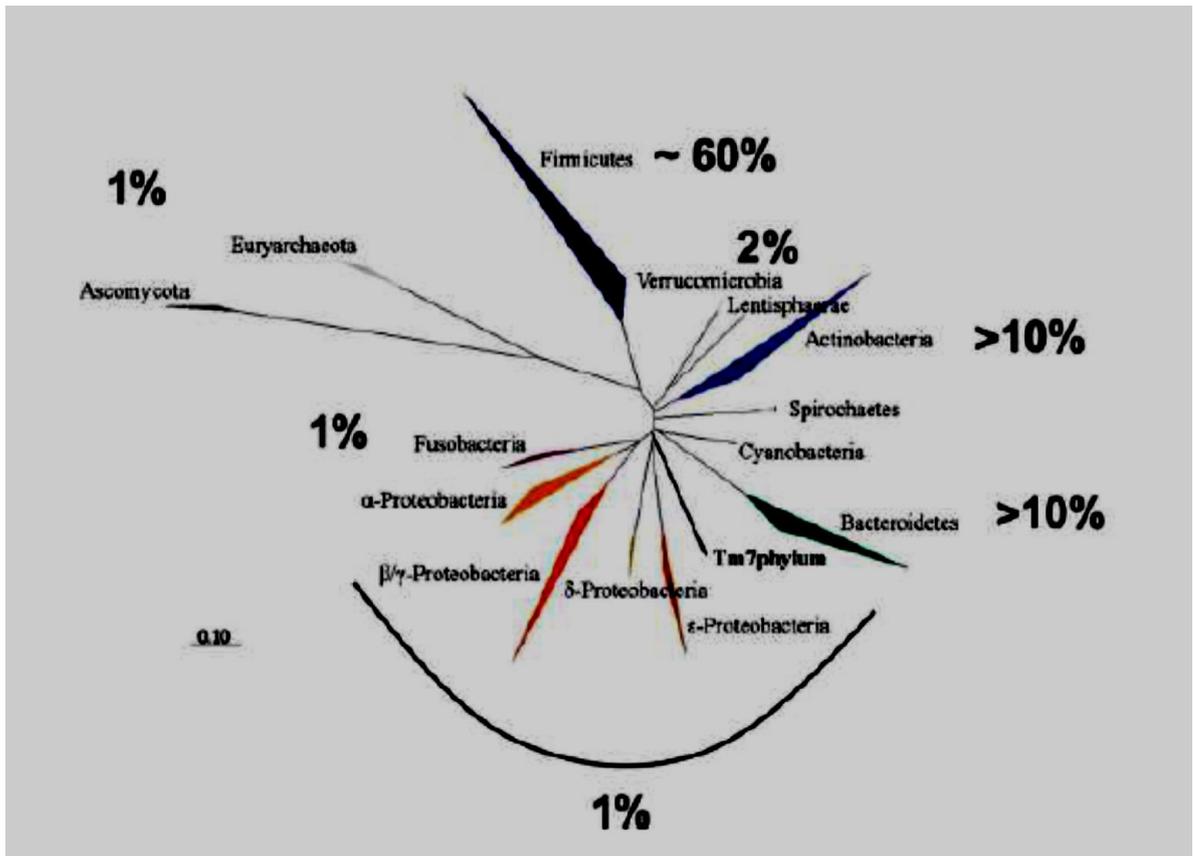


Figure 2.1 : Arbre phylogénétique des principaux phyla du tractus intestinal humain et leur présence relative (en %) chez des européens en bonne santé [203]

2.2 Fonctions métaboliques du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal fermente les fibres alimentaires non digestibles et les transforme en métabolites. Ces derniers peuvent être absorbés par la muqueuse intestinale et ainsi servir de substrat énergétique pour l'hôte [202].

Les bactéries intestinales jouent également un rôle dans la synthèse de nutriments (Figure 2.2) en particuliers : les acides gras à courte chaîne (AGCC), en particulier les acides butyrique, acétique et propionique. Tandis que l'acétate et le propionate sont réabsorbés par la veine portale et métabolisés par le foie en tant que source énergétique, le butyrate est rapidement absorbé par l'hôte et constitue la source énergétique majeure des colonocytes [204].

Le microbiote intestinal produit aussi les vitamines (B₁₂, K, acide folique et biotine), ainsi que la dégradation des protéines, des hydrates de carbones complexes non absorbés tels que les composants des membranes végétales et l'amidon résistant [205] et qui aboutissant à la production d'acides organiques tel que : l'acide lactique nécessaire pour la production d'énergie dans les muscles [202] et qui sont assimilables par l'hôte [206], des gaz (dioxyde de carbone, méthane et hydrogène) dont la majorité est recyclée par les bactéries elles-mêmes [207], ainsi que de l'éthanol, des neurotransmetteurs (acide γ -aminobutyrique-GABA-) ou d'autres molécules actives (polysaccharide A -PSA-, acide conjugué linoléique -CLA-) [208]. Ils sont également engagés dans des mécanismes de protection de la muqueuse intestinale (en particulier en ce qui concerne le butyrate), et anti-inflammatoires par interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPR) ou récepteur des acides gras libres (FFAR) [209].

Le microbiote intestinal intervient également dans le renforcement du système immunitaire intestinal [210], la production des anticorps de type IgA [211] ainsi que la maturation intestinale et le renforcement de la barrière mucoale [212].

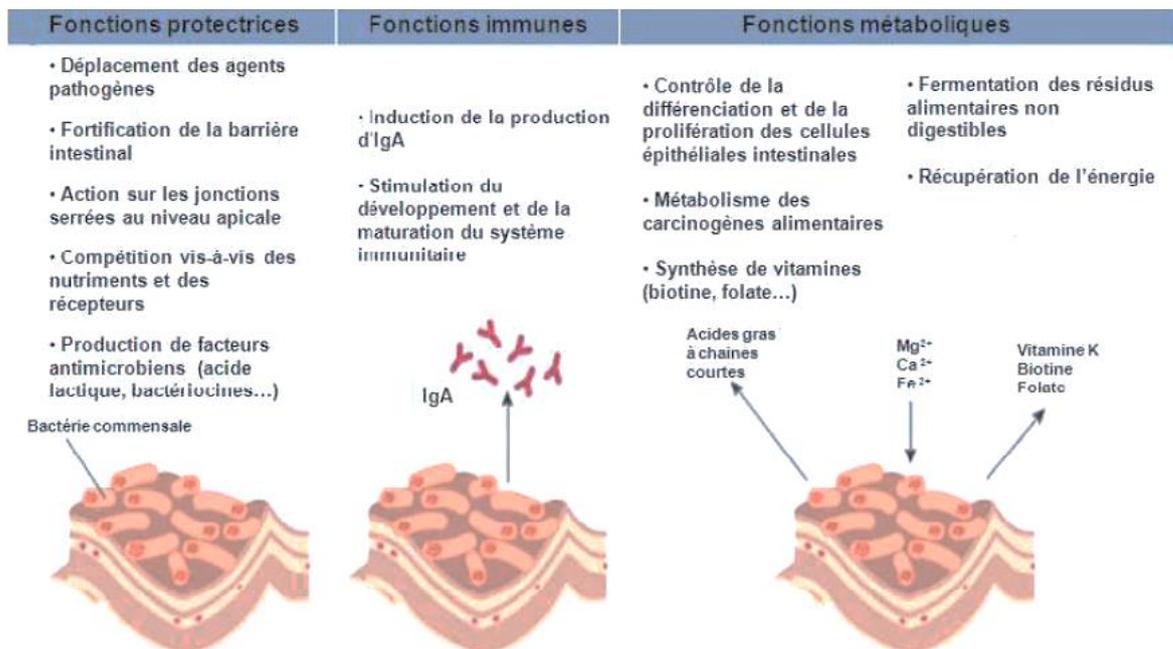


Figure 2.2 : Les principales fonctions des bactéries commensales qui composent le microbiote intestinal [213].

2.3 Interactions entre microbiote et alimentation

L'intestin joue le double rôle, il est tout d'abord nécessaire à l'absorption des nutriments donc à leur assimilation par l'organisme, mais il est également essentiel pour la protection contre les agents pathogènes qu'il doit différencier des bactéries utiles. C'est pourquoi la régulation de sa perméabilité est fondamentale [214].

Au vu de la liaison étroite qui existe entre le microbiote et l'intestin, il est logique de conclure à des interactions entre ces deux entités et l'alimentation qui se retrouvent en contact direct. La nourriture ingérée est à la fois source de nutriments pour l'hôte grâce à la translocation des nutriments par la barrière intestinale, mais elle l'est aussi pour le microbiote qui lui-même pourvoit également à ses besoins au travers du mucus. Tout ce qui passe donc par le tractus digestif, y compris antibiotiques, pré- et probiotiques, est à même de modifier les populations intestinales et d'induire ou non une dysbiose avec des répercussions sur l'organisme [215]. ZHANG et al. [216] ont ainsi estimé que 60% de la variation totale des populations microbiennes pourrait être expliquée par le changement de régime alimentaire, alors que 10 % sont attribués à la variation génétique propre à l'hôte.

Avec la notion de microbiote intestinal a émergé l'idée que puisque de « bonnes » bactéries logeaient dans notre intestin, en rajouter dans notre diète pourrait induire des effets bénéfiques, d'où la notion de probiotiques. Les premiers probiotiques sont nés avec la compréhension que les microorganismes du lait et du yaourt (*Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius thermophilus*) semblaient induire des effets bénéfiques [214].

2.4 Probiotiques

De nombreuses études ont démontré que certains constituants alimentaires sont capables de modifier qualitativement le microbiote intestinal en ciblant spécifiquement certaines bactéries. Un des produits qui peuvent avoir une influence sur le microbiote sont les probiotiques [202].

Le mot probiotique a été né en 1907 par le biologiste russe Elie Metchnikoff, lauréat du prix Nobel de médecine et physiologie, qu'il a établi un lien entre la longévité « inhabituelle » de certaines populations rurales en Bulgarie et leur grande consommation de produits laitiers fermentés. Il a pu alors identifier deux souches bactériennes nécessaires à la fermentation : *Lactobacillus bulgaricus* (bacille bulgare) et *Streptococcus thermophilus*. La présence de ces souches dans le tube digestif crée un environnement défavorable à l'implantation de pathogènes entériques. Metchnikoff fut ainsi le premier à suggérer que la consommation des bactéries lactiques présentes dans ces laits fermentés pourrait avoir un effet bénéfique sur la santé [202].

Le mot « probiotique » vient du grec et signifie « en faveur de la vie ». Plusieurs définitions ont été proposées depuis la théorie de Metchnikoff pour définir le terme probiotique. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les probiotiques sont des microorganismes (bactéries ou levures) vivants, qui, consommés en quantité adéquate, produisent des effets bénéfiques sur leur hôte. Ils doivent également présenter une totale innocuité [217].

Plusieurs études ont démontré les multiples effets bénéfiques des probiotiques (Figure 2.3). En effet, les probiotiques interviennent dans la prévention et le traitement de plusieurs diarrhées, notamment la diarrhée du voyageur et la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques [218] et les diarrhées en cas d'infection à rotavirus [219]. Ils sont aussi impliqués dans la réduction et le traitement de certaines infections gastro-intestinales [220]. Ils contribuent également à la modulation du système immunitaire et au renforcement de la muqueuse intestinale [221], ainsi que l'amélioration de la digestion des aliments et qu'ils jouent un rôle dans la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose [222]. Les probiotiques possèdent aussi une action antimicrobienne grâce à la production des bactériocines. Certains probiotiques ont démontré leur capacité à prévenir certaines maladies chroniques telles que la maladie de Crohn, l'obésité et le diabète. D'autres travaux laissent présager qu'ils pourraient également jouer un rôle important dans la prévention du cancer du côlon [202].

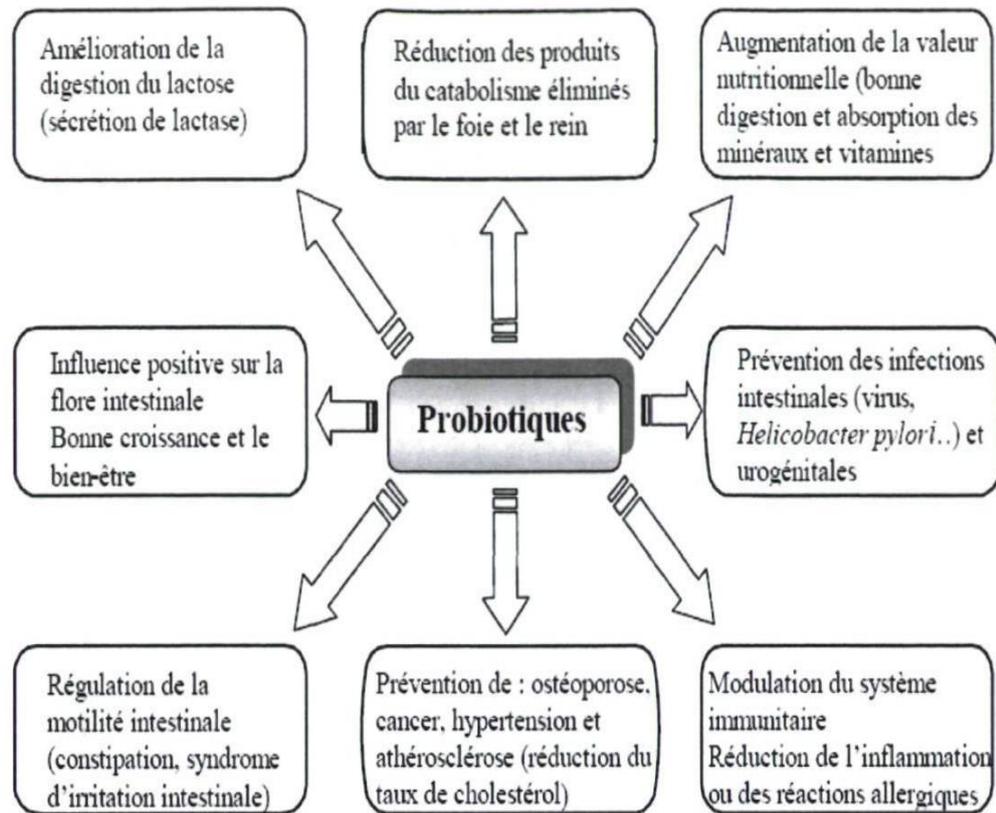


Figure 2.3 : Les principaux bienfaits des probiotiques [223]

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou "probiotiques" (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale [224].

2.5 Classification des probiotiques

Les probiotiques peuvent être classés en quatre catégories (Tableau 2.1). La première catégorie renferme les espèces du genre *Lactobacillus*. Les lactobacilles sont des bactéries à Gram-positif, classées dans le phylum des Firmicutes et appartenant à la famille de *Lactobacillaceae*. Elles se présentent sous forme de bacilles ou de coques et sont anaérobies facultatives, immobiles, non flagellés et non sporogènes. Ces espèces colonisent l'être humain et sont généralement présentes dans le TGI, les muqueuses vaginales et la cavité buccale [202]. Parmi les souches commerciales les plus utilisées, on retrouve les souches de *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* et de *Lb. johnsonii* [225].

La deuxième catégorie est composée des espèces de *Bifidobacterium*. Ce sont des bacilles à Gram-positif, anaérobies strictes, immobiles et forment le groupe bactérien prédominant de la flore intestinale humaine [202]. Parmi les souches commerciales *Bf. animalis* ssp. *lactis* Bb12 [226].

Le troisième groupe de probiotiques comprend d'autres bactéries lactiques en forme de coques tels que les *Enterococcus* et les *Streptococcus*. Quant au quatrième groupe, il est constitué de micro-organismes non-lactiques notamment les bactéries sporulées (*Bacillus cereus*), les bactéries appartenant à l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* ainsi que certaines levures de type *Saccharomyces* principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire [202].

Tableau 2.1 : Microorganismes considérés comme des probiotiques [202]

Espèces <i>Lactobacillus</i>	Espèces <i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Bactéries non lactiques
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bf. adolescentis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>faecalis</i>	<i>var. toyoi</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Bf. breve</i>	<i>faecium</i>	<i>souche nissle</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Bf. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>subsp. bulgaricus</i>	<i>Bf. lactis</i>	<i>Leuconstoc</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Bf. longum</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Lb. gasseri</i>		<i>Pediococcus</i>	<i>cerevisiae</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		<i>acidilactici</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Lb. paracasei</i>		<i>Sporolactobacillus</i>	<i>boulardii</i>
<i>Lb. plantarum</i>		<i>inulinus</i>	
<i>Lb. reuteri</i>		<i>Streptococcus</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i>		<i>thermophilus</i>	

2.6 Bifidobactéries

2.6.1 Taxonomie et habitat

Les bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium*, ont été découvertes pour la première fois par Tessier (1900) dans les selles infantiles allaités au sein, une bactérie anaérobie de morphologie bifide qu'il appela *Bacillus bifidus communis* [227].

Dans la 8e édition du manuel de Bergey du déterminatif de la bactériologie (Rogosa, 1974), les bifidobactéries ont été classifiées dans le genre *Bifidobacterium* en utilisant le même nom proposé par Orla-Jensen. Le genre a comporté huit espèces; il a été inclus dans la famille des Actinomycetaceae d'ordre Actinomycetales [228].

Avec l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire (l'analyse des séquences des ARNr 16S, l'analyse des séquences des gènes codant pour la protéine du choc thermique de 60 kDa (*Hsp60*), contenu G+C d'ADN), on dénombre aujourd'hui 31 espèces de bifidobactéries de diverses origines [228].

Les bifidobactéries forment le plus important groupe de la flore intestinale humaine. Elles s'installent juste après la naissance et deviennent dominantes dans le microbiote intestinal du nouveau-né. *Bf. breve* et *Bf. infantis* sont des espèces typique des bébés nourris au lait maternel ou aux formules lactées pour nourrissons tandis que *Bf. bifidum*, *Bf. catenulatum*, *Bf. longum* et *Bf. pseudocatenulatum* sont présents dans les fèces des nouveau-né et/ou dans les fèces d'adulte. *Bf. adolescentis* a été isolés seulement dans les fèces d'adulte [228]. Quelques espèces comme *Bf. bifidum*, *Bf. breve* ou *Bf. longum* biovar *infantis* peuvent également coloniser le vagin de la femme. *Bf. dentium* a pour habitat la cavité orale de l'homme, mais cette espèce est également retrouvée dans les fèces et dans le vagin [228].

Chez les animaux quelques espèces sont apparemment une présence spécifique. *Bf. merycicum* et *Bf. ruminantium* sont isolés des bovins. *Bf. choerinum*, *Bf. psychraerophilum* et *Bf. thermacidophilum* subsp. *porcinum* sont présents chez les porcs. *Bf. gallinarum* et *Bf. pullorum* sont associés aux volailles. *Bf. cuniculi*, *Bf. saeculare* et *Bf. magnum* sont isolés des lapins. *Bf. asteroides*, *Bf.*

coryneforme et *Bf. indicum* sont hébergés dans l'intestin des abeilles. En revanche, *Bf. animalis* subsp. *animalis*, *Bf. boum*, *Bf. longum*, *Bf. pseudolongum*, *Bf. thermophilum* sont isolés de diverses espèces animales. *Bifidobacterium tsurumiense* une nouvelle espèce isolée par OKAMOTO *et al.* [229] à partir des plaques dentaires des hamsters nourris durant six semaines avec une alimentation riche en sucres [228].

2.6.2 Morphologie et propriétés physiologiques

Les bifidobactéries se présentent sous forme des bâtonnets qui développent des ramifications donnant des formes variables, généralement en V, Y, X (Figure 2.4). Cependant, leur polymorphisme dépend principalement du milieu de culture et des conditions de croissance. Les colonies constituées par les bifidobactéries sont lisses, convexes, crèmes ou blanches, scintillant et de la régularité molle. Les cellules de *Bf. angulatum* montrent l'arrangement de V ou de palissade, tandis que les cellules *Bf. animalis* montrent la portion centrale agrandie. *Bf. asteroides* exposés des arrangements à la forme étoile peu communs [228].

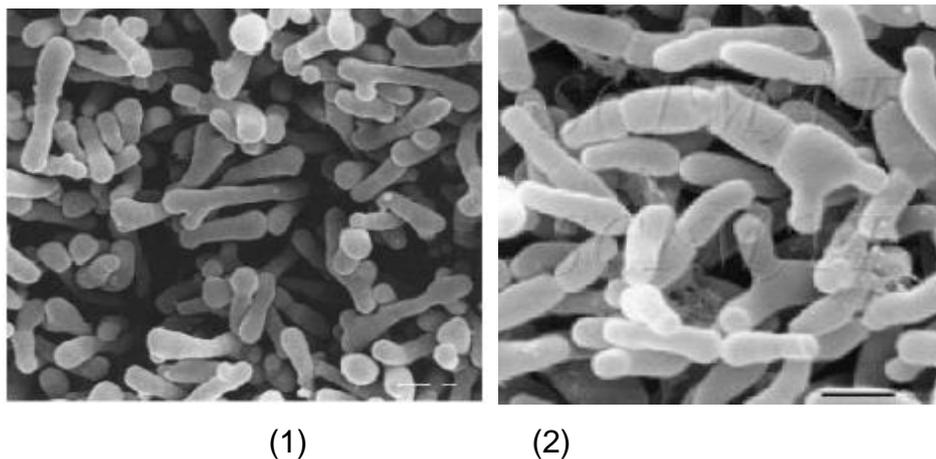


Figure 2.4 : Observation au microscope électronique des cellules de : (1) *Bifidobacterium* sp., (2) *Bifidobacterium breve*.

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram-positives, immobiles, non sporulées, non productrices de gaz, anaérobies (sauf quelques espèces pouvant tolérer l'oxygène), catalase négatives (exceptées *Bf. indicum* et *Bf. asteroides*) et saccharolytiques.

La température de croissance des bifidobactéries d'origine humaine ou animale, varie respectivement de 36 °C à 38 °C et de 41 °C à 43 °C l'exception de *Bf. thermophilum*, *Bf. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* et *Bf. thermacidophilum* subsp. *porcinum* qui sont capables de croître aux états modérément thermophiles (46,5°C, 47°C et 49,5°C). Les bifidobactéries sont anaérobies strictes et peuvent s'adapter à l'environnement intestinal [230].

Les bifidobactéries sont des micro-organismes non acido-résistants. L'optimum pH est entre 6,5 et 7,0. Aucune croissance n'est enregistrée à pH plus bas que 4,5 et plus fortement qu'à 8,5. Seulement *Bf. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* a une croissance retardée à pH 4 [230] et *Bf. animalis* subsp. *animalis* et *Bf. animalis* subsp. *lactis* peuvent survivre exposés au pH 3,5 pendant 3 heures [228]. Ils se caractérisent par leur activité enzymatique leur permettant d'utiliser de nombreux sucres et de produire de l'acide lactique et de l'acide acétique. Les bifidobactéries se distinguent des lactobacilles principalement par la production d'une enzyme caractéristique: la fructose-6-phosphate phosphocétolase impliquée dans la voie métabolique de D-fructose-6-phosphate [231].

2.6.3 Besoins nutritionnels des bifidobactéries et facteurs bifidogènes

Les bifidobactéries sont des microorganismes aux exigences nutritionnelles élevées. La cystéine et la cystine sont des sources essentielles d'azote pour les bifidobactéries. Certaines espèces de bifidobactéries peuvent aussi utiliser les sels d'ammonium comme source d'azote [227]. Ces espèces, lorsqu'elles croissent sans source d'azote organique, rejettent des taux considérables d'acides aminés dans le milieu [228].

Ces bactéries ne réduisent pas les nitrates et sont incapables de former de l'indole, de liquéfier la gélatine, de fermenter le glycérol ou d'utiliser les acides aminés, les acides gras et les acides organiques comme sources de carbone. Toutefois, les carbonates ou les bicarbonates sont des sources de carbone utilisées par les bifidobactéries [227]. L'utilisation des hydrates de carbone comme source de carbone varie d'une espèce à l'autre. L'espèce *Bf. infantis* peut fermenter quatre types de hydrate de carbone alors que l'espèce *Bf. adolescentis* peut en fermenter plus de 19 [232].

Toutes les souches d'origine humaine sont capables d'utiliser le glucose, le galactose, le lactose et généralement le fructose comme source de carbone. Les besoins en minéraux ont été étudiés surtout chez *Bf. bifidum*. Cette espèce a besoin de fer, de magnésium et de manganèse. La plupart des espèces de bifidobactéries d'origine humaine sont capables de produire des vitamines telles que la thiamine (B1), riboflavine (B2), pyridoxine (B6), acide folique (B9), cobalamine (B12), acide ascorbique (C), acide nicotinique (PP) et biotine (H).

Toutefois, cette capacité est variable selon les espèces et les souches de la même espèce. *Bf. bifidum* et *Bf. infantis* sont des grandes producteurs des vitamines alors que *Bf. breve* et *Bf. longum* sont de faibles producteurs et certaines souches de l'espèce *Bf. adolescentis* ne synthétisant aucune vitamine [228].

Les facteurs bifidogènes sont définis en tant qu'ingrédients non digestibles qui affectent avantageusement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un, ou un nombre limité de, des bactéries dans le côlon, et qui peuvent améliorer ainsi la santé d'hôte [228]. Le N-acétyl-D-glucosamine présent dans le lait maternel a alors été identifié comme étant la substance essentielle et a été nommé facteur bifidogène 1. D'autres glycoprotéines, telles que les le N-acétyl-galactosamine et le N-acétyl-mannosamine, ont été identifiées comme étant des facteurs bifidogènes [233].

Le lactulose s'est avéré un facteur efficace pour la croissance de *Bifidobacterium* et il est également appliqué dans une grande variété d'aliment comme facteur bifidogène ou comme ingrédient fonctionnel pour la régulation intestinale. Parmi les différents fructooligosaccharides (FOS) à chaîne courte, l'oligofructose, une molécule à chaîne linéaire comportant le glucose et le fructose à un degré de polymérisation de quatre, ont montré l'effet bifidogène le plus élevé [234]. Les xylooligosaccharides (par exemple xylobiose) et transgalactosyleoligosaccharides (par exemple lactosucrose) sont également connus en tant que facteurs bifidogènes efficaces de la prolifération des bifidobactéries intestinal [228].

2.7 Probiotiques et renforcement de la barrière intestinale

Parmi les principaux mécanismes d'action par lesquels les probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques, nous citons le renforcement de la barrière intestinale, ainsi que l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la muqueuse intestinale (Figure 2.5).

Les probiotiques exercent une action antimicrobienne directe en s'opposant à l'invasion des microorganismes pathogènes dans le tube digestif tout en empêchant leur adhésion aux parois intestinales. En effet, il existe une compétition directe entre les souches probiotiques et les germes infectieux pour occuper les sites d'adhésion aux parois de l'intestin. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif et peuvent le coloniser de manière prolongée. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant leur implantation au niveau des parois intestinales et par conséquent, l'inhibition de la fixation des germes pathogènes. Ainsi, les probiotiques jouent un rôle de barrière physique contre les microorganismes pathogènes [202]. Ce phénomène a été observé chez certains bifidobactéries (*Bf. breve* IPLA 20005) qui ont inhibé l'adhésion des souches pathogènes testées (*Cronobacter sakazakii*) d'un modèle d'une muqueuse intestinale d'un nourrisson de deux mois [235].

L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire permet d'accroître la réponse immune de l'hôte contre les agents entéropathogènes. En effet, les probiotiques interviennent dans la stimulation de l'immunité adaptative, tel que la production des anticorps de type IgA [202], ainsi que l'immunité innée tel que la production des macrophages, des monocytes, etc. [236]. Par conséquent, les probiotiques agissent comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse intestinale et renforçant ainsi le système immunitaire intestinale [202].

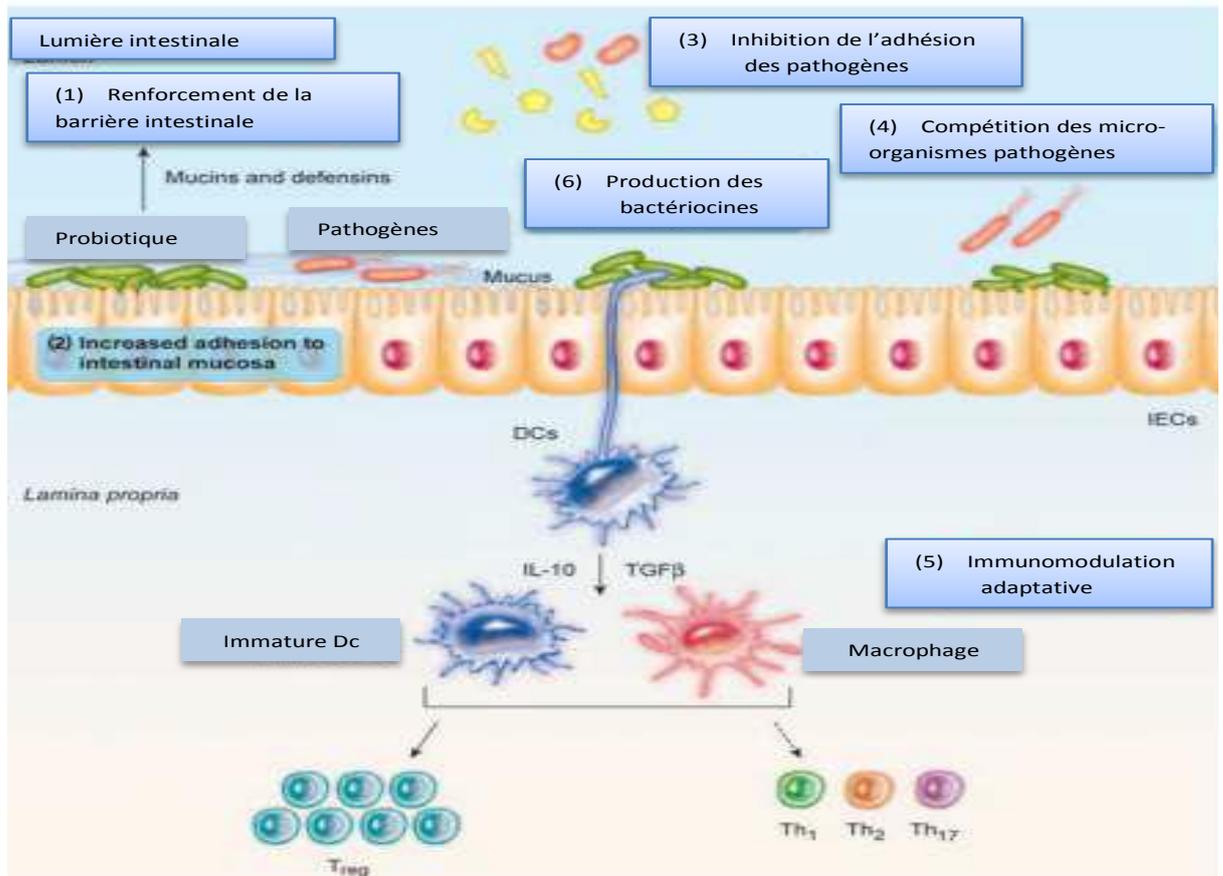


Figure 2.5 : Illustration schématique des principaux mécanismes d'action des probiotiques [237].

L'épithélium intestinal joue un rôle indispensable dans la défense et la protection du tube digestif. En effet, il constitue une véritable barrière continue permettant d'empêcher l'invasion de la flore entérique ainsi que les différents constituants du lumen dans l'organisme [238]. Cependant, certains événements endogènes ou exogènes peuvent altérer les fonctions protectrices de cette barrière entraînant le passage des micro-organismes à travers la muqueuse intestinale et ainsi le déclenchement des réactions inflammatoires et des troubles intestinaux [239]. Plusieurs études ont démontré que les probiotiques sont impliqués dans le renforcement et le maintien de la barrière intestinale en favorisant une meilleure intégrité de la muqueuse intestinale. ANDERSON, COOKSON et al. [240] et OHLAND and MACNAUGHTON [241] ont rapporté que la fonction de barrière de la muqueuse intestinale est médiée par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le fonctionnement des jonctions serrées de l'intestin et en favorisant la production de mucus et de certains anticorps de type IgA.

Certains chercheurs ont rapporté que l'addition de *Bf. bifidum* et *Streptococcus thermophilus* à une formule lactée infantile protégeait les enfants de la survenue d'une diarrhée à rotavirus alors qu'une récente étude clinique en double insu a montré l'absence d'effet de *Lactobacillus rhamnosus GG* sur l'infection nosocomiale à rotavirus dans un contexte hospitalier. Une autre étude faite chez des volontaires sains adultes montre que l'ingestion de lait fermenté par *Lactobacillus johnsonii LA1* et de bifidobactéries pendant 28 jours, jointe à un stimulus infectieux (*Salmonella typhi* atténuée) a conduit à une augmentation de la concentration des IgA sériques spécifiques de Salmonella, celle-ci étant quatre fois plus élevée que celle observée chez des sujets ne recevant pas de lait fermenté. Cependant, un traitement de 28 jours par *Lactobacillus johnsonii LA1* n'induisait qu'une faible augmentation des IgA totales sériques et aucune modification des autres immunoglobulines [242].

Ces études soulignent qu'un effet bénéfique observé avec une souche particulière ne peut en aucun cas être généralisé à d'autres souches. Dans l'ensemble, les résultats indiquent un renforcement de l'immunité sécrétoire IgA au niveau de la muqueuse intestinale, vis-à-vis de pathogènes viraux ou bactériens, par certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus johnsonii* et/ou certains *Bifidobacterium* sp.) [243].

La notion de flore intestinale est aussi accompagnée par le concept de prébiotiques, substrats des probiotiques et microorganismes intestinaux, parmi lesquels on trouve par exemple les galacto-oligosaccharides (GOS) et les dérivés de l'inuline comme les fructo-oligosaccharides (FOS) [244]. Roberfroid établit en 2007 l'une des définitions les plus complètes à partir de trois critères : un prébiotique doit donc être résistant à l'acidité gastrique et à l'hydrolyse enzymatique des mammifères, être fermenté par le microbiote intestinal et stimuler la croissance ou l'activité des bactéries intestinales qui contribuent à la santé et au bien-être de l'hôte [245]. L'absence d'une définition internationale est palliée en 2008 lorsque la FAO les décrit comme étant des «composés alimentaires non viables qui confèrent un bénéfice sur la santé à l'hôte, associé à la modulation du microbiote».

2.8 Prébiotique

2.8.1 Définition

Les prébiotiques sont définis comme des ingrédients alimentaires indigestibles, qui ont un effet bénéfique sur le hôte par le biais d'une stimulation de la croissance et/ou de l'activité d'un nombre restreint d'espèces bactériennes déjà résidente dans la flore digestive de l'hôte ce qui peut contribuer à l'amélioration de sa santé [246-249]. Selon GIBSON et *al.* [250], un produit sera classé comme prébiotique dès qu'il répond aux trois conditions suivantes :

- Etre ni hydrolysé, ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal.
- Etre sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes.
- Modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition.
- Tout ceci doit nécessairement induire une modification de la composition de la flore, améliorant ainsi l'état de la sante de l'hôte.

2.8.2 Différentes classes des prébiotiques

Les prébiotiques sont classés selon la taille de la molécule ou suivant leur origine, naturelle ou synthétique [250].

2.8.2.1 Hexoses

Il s'agit généralement de : fructose, glucose, galactose, mannose et des pentoses tels que le ribose, le xylose et l'arabinose et qui sont les monosaccharides prébiotiques les plus importants. Le galactose est disponible sous forme de disaccharides tels que le lactose. Cependant le monosaccharide le plus couramment utilisé comme prébiotique est certainement le mannose [251].

2.8.2.2 Disaccharides naturels

Les plus couramment utilisés sont le sucrose, le lactose et le maltose [251].

2.8.2.3 Oligosaccharides

C'est le produit de synthèse ou d'hydrolyse enzymatique, soit à partir des hexoses monosaccharidiques, soit à partir de la paroi de cellules microbiennes ou par fermentation des polysaccharides. Parmi les oligosaccharides, les fructo-oligosaccharides (FOS) occupent certainement une place importante [251].

Les FOS sont produits par hydrolyse d'inuline ou par synthèse à partir de sucrose ou de lactose. Les FOS réduisent la colonisation de l'intestin par *Salmonella*. L'administration de FOS dans les aliments pour volaille semble également réduire la colonisation de l'intestin par *Campylobacter* et les salmonelles. Les mannane-oligosaccharides (MOS) sont des constituants naturels de la paroi des levures et des gommes naturelles. Ce produit est constitué d'un lysat centrifuge de *Saccharomyces cerevisiae* [251]

2.8.3 Mode d'action des prébiotiques

Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne constitués approximativement de deux à vingt unités de sucre. Ils échappent à la digestion au niveau de l'intestin grêle et qui sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales [248].

Les prébiotiques sont des substrats sélectifs à un nombre restreint de souches bactériennes du microbiote intestinal dont les bifidobactéries et les lactobacilles sont les plus fréquemment ciblés [252].

Les FOS sont des composants qui se retrouvent dans divers végétaux et qui ne sont pas digérés par les mammifères mais qui peuvent être métabolisés par certaines bactéries. Ils assurent une diminution significative de la flore pathogène et qui est incapable d'utiliser les FOS et ce qui induit à la création d'un environnement plus favorable aux développements de la flore bénéfique du microbiote intestinal [251].

2.9 Epithélium intestinal

2.9.1 Structure de la muqueuse intestinale

La muqueuse peut être décrite en deux parties: les villosités orientées vers la lumière intestinale et les glandes (ou cryptes) de Lieberkühn (figures 2.6 et 2.7) orientées vers la couche musculaire [253].

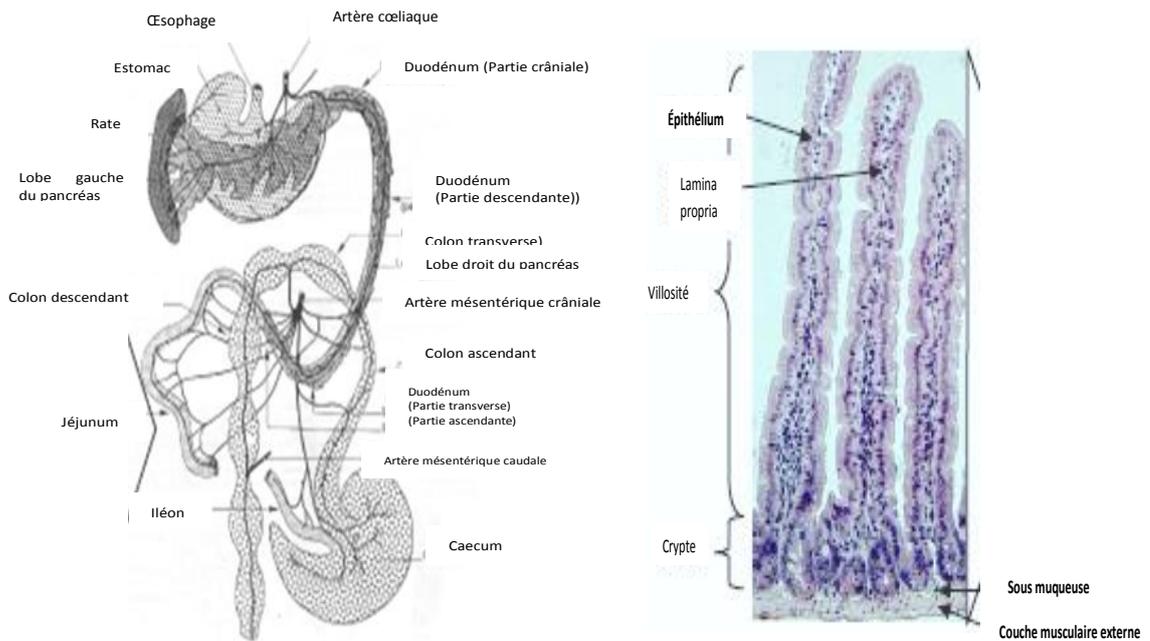


Figure 2.6 : Tube digestif de souris et détail de la structure du jéjunum de souris en coloration Hématoxyline et éosine (HES). Sur le plan anatomique, le tube digestif Comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), me gros intestin (caecum, cōlon ascendant, transverse et descendant) puis le rectum. Sur le plan microscopique, le jéjunum est composé d'une muqueuse (cryptes et vollisités), d'une sous-muqueuse et de deux couches musculaires (X40) [253].

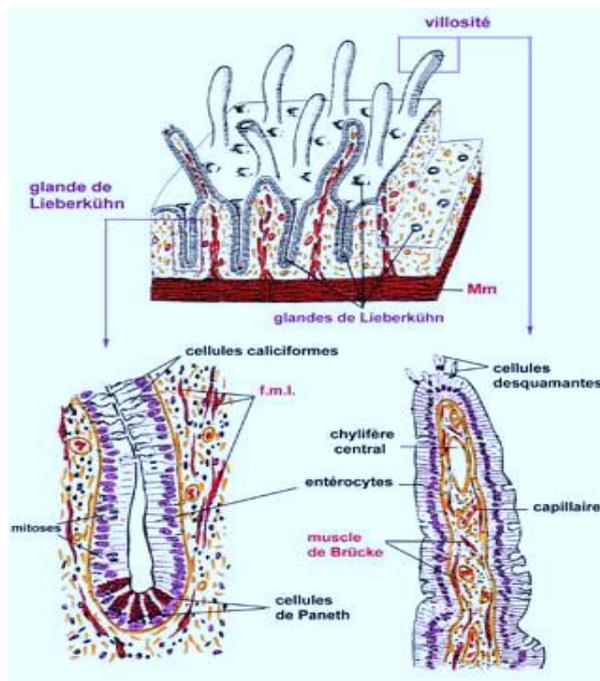


Figure 2.7 : Structure schématique de la muqueuse de l'intestin grêle. Mm : muscularis mucosa ; fml : myofibroblaste [253]

2.9.1.1 Villosités

La muqueuse comporte les villosités intestinales (figures 2.6 et 2.7), expansions vers la lumière, avec un axe villositaire tapissé par l'épithélium de surface. L'épithélium de revêtement intestinal est un épithélium prismatique simple constitué de plusieurs types cellulaires. Quatre types cellulaires sont présents: des entérocytes, des cellules caliciformes (cellules à mucus), des cellules neuroendocrines et des cellules «M ». Les villosités représentent le compartiment fonctionnel et différencié de la muqueuse. Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses (80 % de l'épithélium) et sont responsables de la fonction d'absorption intestinale. Les cellules caliciformes sécrètent du mucus (mucopolysaccharides) qui protège l'épithélium contre les enzymes de la lumière du tube digestif, les infections bactériennes et les conditions de pH. Contrairement aux entérocytes, ces cellules ne possèdent pas de microvillosités, mais elle possède une vacuole de sécrétion [253].

2.9.1.2 Cryptes

Les glandes (ou cryptes) de Lieberkühn sont invaginées en forme de doigts vers la paroi musculaire (figures 2.6, 2.7 et 2.8). Il est observé cinq types cellulaires: des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules «de transit », des cellules neuroendocrines et au fond des cryptes, des cellules de Paneth. Les cellules caliciformes et les entérocytes sont du même type que celles des villosités bien que leur taille soit légèrement moins importante. Les cellules dites « de transit » sont des cellules immatures encore capables de se diviser et situées vers le fond des cryptes; elles se différencient ensuite et migrent le long de la villosité [253].

Les cellules neuroendocrines intestinales sont rencontrées en plus grand nombre dans les cryptes qu'au niveau des villosités; elles sont responsables de plusieurs types de sécrétion de médiateurs locaux (sérotonine, sécrétine, neurotensine, substance P ...). Elles représentent 1 % des cellules épithéliales de la muqueuse. Ces cellules expriment des marqueurs de différenciation neuronale incluant ceux de la biosynthèse des neurotransmetteurs. De plus, elles expriment des protéines de structures contrôlant la différenciation des neurones. Ces protéines appartiennent à la famille des neurotrophines: facteur de croissance de

nerfs (NGF), facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (FNBD), neurotrophine (NT) [254].

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes: ce sont des cellules sécrétrices à action antimicrobienne, elles déversent leurs produits de sécrétion dans la lumière des cryptes. Elles contribuent donc au rôle de défense de l'épithélium intestinal. Les cellules souches sont localisées dans le fond de la crypte au-dessus des cellules de Paneth. Elles seraient au nombre de 4 et servent au renouvellement très rapide des cellules de l'épithélium intestinal [253].

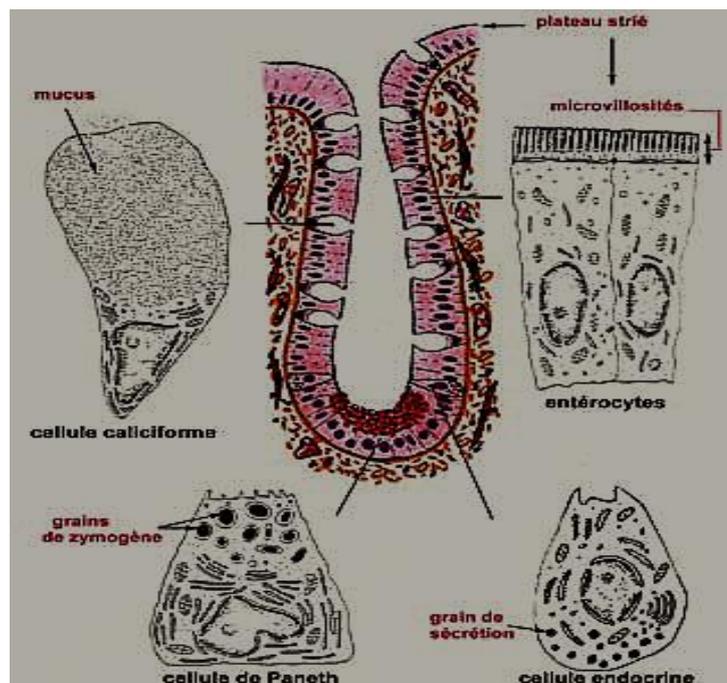


Figure 2.8 : Cryptes, composition et structure. Au niveau des cryptes il est retrouvé les entérocytes, les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth [253].

2.9.1.3 Lamina propria

Elle occupe l'espace entre la lame basale de l'épithélium et la seconde couche cellulaire, la musculaires mucosa (figure 2.9). Les populations cellulaires présentes sont nombreuses, dans un état de migration, différenciation et renouvellement permanent. La lamina propria peut être considérée comme un tissu de soutien de l'épithélium intestinal contenant des cellules

immunocompétentes comme les cellules B et T, les macrophages, les cellules dendritiques, les éosinophiles et les mastocytes. Les autres types cellulaires sont des myofibroblastes et les fibres nerveuses du système nerveux entérique. Les myofibroblastes sont localisés à la base de l'épithélium et forment une gaine qui englobe les cryptes. Dans la lamina propria au niveau du jéjunum et de l'iléon (chez la souris), des follicules lymphoïdes en forme de plaques ovoïdes sont présents: ces formations sont dénommées «plaques de Peyer» et appartiennent au système immunitaire de l'intestin nommé GALT (Tissu lymphoïde associé au tube digestif). La lamina propria est également traversée par des micro-vaisseaux sanguins (artères et veines) et lymphatiques (vaisseaux chylifères) [253].

2.9.2 Rôle immunitaire de l'intestin grêle

L'intestin a également un rôle dans la défense immunitaire de l'organisme. L'épithélium intestinal est en effet en permanence en contact avec le milieu extérieur et la lumière intestinale est riche en micro-organismes potentiellement toxiques. Le système immunitaire intestinal est appelé GALT (Tissu lymphoïde associé au tube digestif) [253].

Le GALT est constitué de plaques de Peyer, de follicules lymphoïdes isolés et de lymphocytes disséminés inclus dans la lamina propria. Les plaques de Peyer sont constituées d'un dôme sous-épithélial riche en cellules dendritiques, en lymphocytes B, et en lymphocytes T (figure 2.9). Ce dôme est surmonté au niveau de l'épithélium par des cellules épithéliales particulières, les cellules M, qui endocytent les antigènes de la lumière intestinale à leur pôle apical et les transfèrent intacts jusqu'aux cellules dendritiques situées au niveau de leur pôle basal. Les cellules dendritiques présentent ensuite les antigènes apprêtés aux lymphocytes B qui migrent alors dans la circulation générale en se différenciant, et gagnent la lamina propria pour devenir des plasmocytes matures sécrétant des IgA (Figure 2.10) [253].

Les cellules immunitaires disséminées dans la lamina propria sont surtout des plasmocytes produisant les IgA sécrétoires, ainsi que des lymphocytes B et T, des cellules NK, des macrophages et des cellules dendritiques. Certaines de ces cellules peuvent s'intercaler dans l'épithélium, en particulier les cellules

dendritiques qui sont capables d'internaliser les bactéries dans la lumière en émettant des dendrites traversant l'épithélium [255]. L'intestin est l'un des organes les plus riches en cellules lymphocytaires [253].

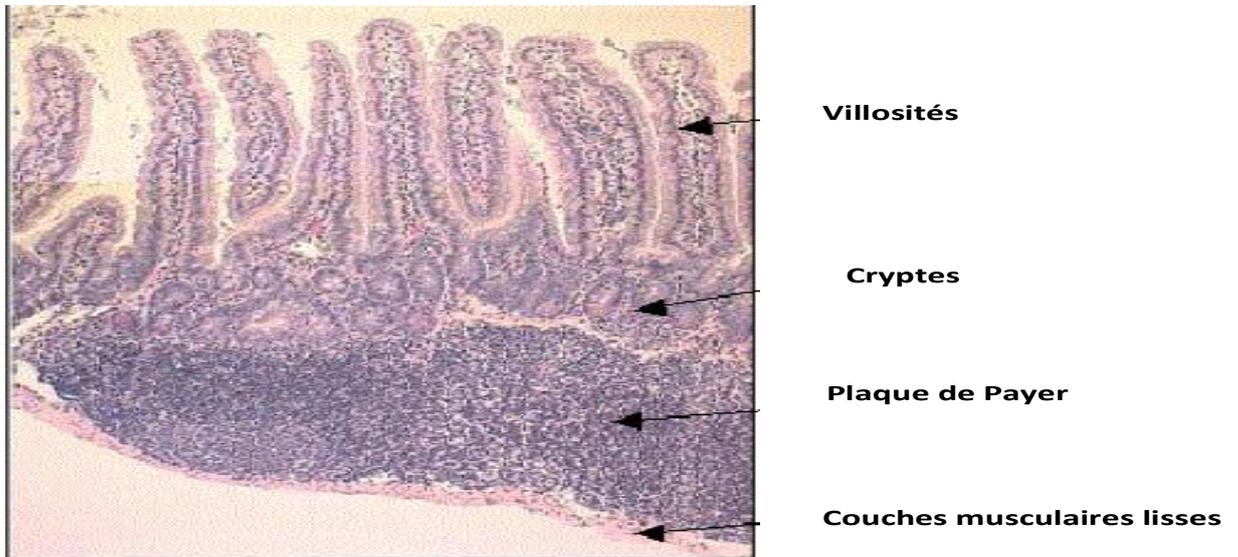


Figure 2.9 : Plaque de Peyer chez la souris (X10). Les plaques de Peyer se situent sous la muqueuse, elles sont composées de lymphocytes T et B [253].

Les systèmes immunitaires spécifiques et non spécifiques n'ont pas atteint leur maturité au moment de la naissance. La colonisation du tube digestif par la flore intestinale est un stimulus essentiel impliqué dans la maturation des réponses immunitaires [242].

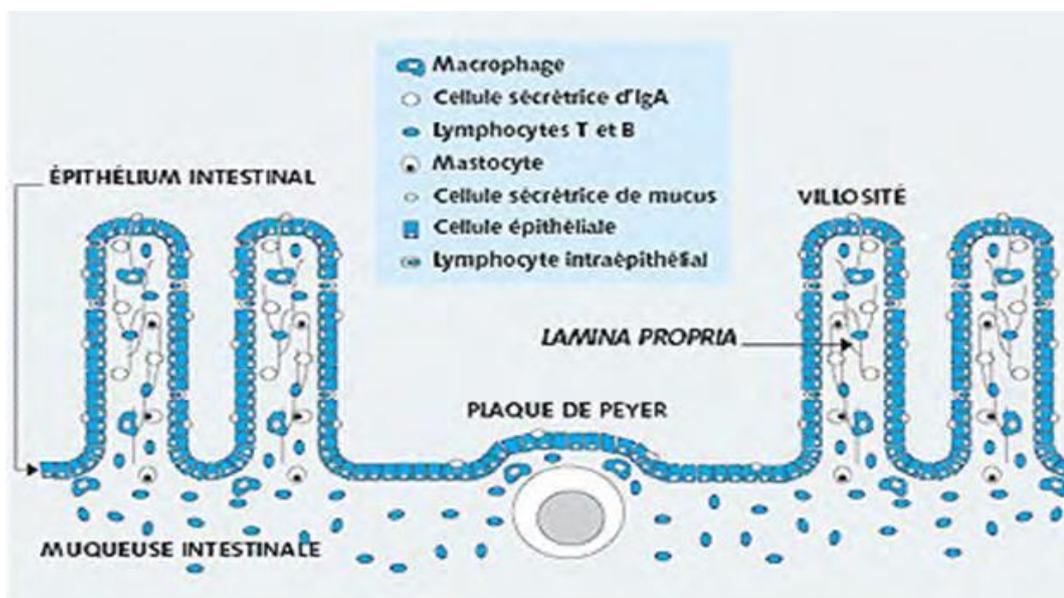


Figure 2.10 : Organisation du système immunitaire intestinal [256].

La défense immunitaire innée est contrôlée par les cellules de Paneth, les neutrophiles, les macrophages, le flux intestinal, le mucus de surface, la desquamation entérocytaire alors que la défense immunitaire acquise est contrôlée par les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes [256].

Les connaissances les plus récentes en immunologie ont permis de démontrer un lien entre la flore bactérienne, la muqueuse intestinale et le système immunitaire, notamment par l'intermédiaire du système immunitaire inné dont les «récepteurs de type Toll» (TLR), sont les principaux acteurs. Cette colonisation bactérienne est donc essentielle dans la maturation du système immunitaire, notamment en stimulant la capacité de sécréter des immunoglobulines A, contribuant ainsi à la barrière immunitaire intestinale. Plus récemment, il a été établi que le système immunitaire du nouveau-né est immature, caractérisé par une réponse déséquilibrée des lymphocytes T helper 2 (Th2) supérieure à celle des Th1 de même qu'une insuffisance de lymphocytes T régulateurs. La colonisation progressive du tube digestif est, à cet égard, essentielle pour établir un équilibre entre les Th2 et les autres types de lymphocytes (Th1 et Th3) [257]

Des études réalisées par l'utilisation de modèles animaux de souris sans flore (axéniques) ou reconstitués de bactéries sélectionnées alors appelés « gnotobiotiques », ont permis de démontrer le rôle crucial de la flore commensale dans l'initiation, le développement et la maturation du système immunitaire [258].

Des études comparatives entre des souris axéniques et leurs homologues élevés classiquement en animalerie ont démontré le rôle essentiel joué par le microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire et donc sur ses fonctions [242].

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

3.1 Contexte et démarche

Les microalgues vue sa richesse en micronutriments, elles peuvent être utilisées comme prébiotique nourrissant les probiotiques pour un bon équilibre du microbiote intestinal et que cette biomasse est une source de nouvelles biomolécules et des métabolites biologiquement actives à l'égard des pathogènes.

Le but de cette présente thèse est d'évaluer par des modèles *in vitro* et *in vivo* l'influence de la supplémentation en cyanobactérie *Spirulina* sp. et en algue verte *Chlorella* sp. sur le potentiel de la souche de bifidobactérie d'origine humaine à caractère probiotique dans la prévention et la résistance aux infections entériques bactériennes dues à *Escherichia coli*, infections à incidence très élevée chez l'humain.

Pour cela nous avons émet l'hypothèse de recherche suivante : les microalgues sont capables de modifier qualitativement le microbiote intestinal en ciblant spécifiquement les bifidobactéries à fort potentiel probiotique et qui peuvent supplanter la prolifération et le développement des pathogènes responsables d'infections entériques au niveau intestinal.

Le présent travail s'est déroulé en trois étapes qui sont représentées par les études suivantes :

- La première étude intitulée : caractérisation nutritionnelle des deux poudres algales *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*, analyse phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques. L'objectif principal de cette étude est de caractériser la biomasse algale des deux espèces *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* afin de déterminer les principes actifs comme agents antimicrobiens, après une série d'extraction par des solvants organiques et une évaluation de l'activité antimicrobienne de chaque extrait.

- La deuxième étude intitulée : étude, *in vitro*, de l'effet de la supplémentation sur la survie de *Bifidobacterium bifidum* BHI 7, son effet antagoniste à l'égard des souches du microbiote intestinal après interaction. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'effet *in vitro* des deux microalgues sur l'accroissement de la souche *Bf. bifidum* BHI 7, son pouvoir antimicrobien à l'égard d'autres souches du microbiote intestinal et l'interaction des souches entre eux.

La souche bifidobactérie utilisée dans cette étude a été isolée à partir des selles de nourrissons sains sous différents type d'allaitement et sélectionnée après un screening selon les propriétés probiotiques et technologiques.

Des études récentes ont été menées pour étudier l'effet de la biomasse de *S. platensis* sur les propriétés technologiques des levains lactiques et bactéries probiotiques [259-261]. Dans ce contexte, nous avons choisi quatre concentrations (1 %, 3 %, 5 % et 10 % (m/v)) d'enrichissement de milieu de culture. Toutefois, l'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues seules et en combinaisons sur l'accroissement de la souche probiotique BHI 7 et son pouvoir antibactérien à l'égard d'autres souches du microbiote intestinal afin de sélectionner la meilleure concentration qui va faire l'objet de la troisième étude.

- La troisième étude intitulée : étude, *in vivo*, de l'effet de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sur la gravité de l'infection entérique provoquée expérimentalement. L'objectif principal de cette étude est de valider l'effet des deux microalgues sur le pouvoir anti-*Escherichia coli* de la souche *Bf. bifidum* BHI 7 à l'aide d'un modèle *in vivo* d'infection entérique.

Un modèle d'infection à *Escherichia coli* a été développé chez des lapins en croissance de 35-40 jours. Les paramètres suivants ont été suivis avant, pendant et après provocation infection chez les lapins : poids corporel, analyse de la prise alimentaire, suivi des paramètres du tube digestif et la structure histologique de l'intestin grêle et des analyses microbiologiques de la flore fécale et caecale.

3.2 Lieux de travail

La présente étude a été réalisée au niveau du :

- Centre Algérien de Contrôle de Qualité et d'Emballage
- Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques
- Animalerie du laboratoire d'Hygiène et pathologie Animale de l'Université de Ibn Khaldoun de Tiaret ;
- Service d'Anatomie-pathologie de l'Hôpital de Frantz Fanon, Blida.

3.3 Matériel

3.3.1 Matériel biologique

3.3.1.1 Souches algales

3.3.1.1.1 Spiruline

La microalgue *Spirulina platensis* souche pure, séchée, vendue comme complément alimentaire en Tchad sous la dénomination commerciale « Spiruline ». Cette poudre algale a été achetée et conservée dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

3.3.1.1.2 Chlorelle

La microalgue *Chlorella pyrenoidosa* souche pure, séchée, vendue comme complément alimentaire en France sous la dénomination commerciale «Chlorelle». a été achetée et conservée dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

3.3.1.2 Lait

- Deux laits de vache cru et deux autres de chamelle de race locale ont été utilisés lors de cette étude. Ils ont été collectés à partir des fermes d'élevage situées à l'ouest-Algérien à la wilaya de Tiaret et le sud-Algérien à la wilaya de Tamanrasset. La traite des animaux a lieu le matin avant la sortie des troupeaux au pâturage dans des conditions aseptiques afin d'éviter toute sorte de contamination. Avant la traite de lait de chamelle, l'éleveur a désinfecté ses mains et les mamelles du troupeau par l'eau légèrement javellisée, alors que le lait de vache a été prélevé dans des flacons stériles au moment de la traite mécanique. Les échantillons de lait ont été transportés dans une glacière au

laboratoire pour faire l'objet d'isolement des bactéries lactiques dans les 24 h qui suit la traite.

- Le lait écrémé en poudre fourni par l'unité de Trèfle, Blida, il a été utilisé pour l'enrichissement des milieux de conservation des bactéries lactiques isolées et purifiées.

3.3.1.3 Selles de nourrisson

Vingt échantillons de selles de nourrisson en bonne santé âgés de 15,4 mois et allaités depuis 10 jours non traités par antibiotique ont été choisis pour l'isolement des souches bifides et autres souches de la flore intestinale résidente. Ainsi qu'un prélèvement des selles d'un nourrisson diarrhéique d'un âge de 6 mois et 13 jours a été choisi pour l'isolement de la souche *Escherichia coli*.

Les échantillons ont été transportés dans une glacière au laboratoire pour faire l'objet des analyses microbiologiques.

3.3.1.4 Lapins

Les expériences sont réalisées sur des lapins de race papillons, issus de 03 portées de la région de Chréa, la wilaya de Blida. 36 lapereaux femelles âgés de 35 – 40 jours avec un poids moyen de $793 \pm 208,34$ g au moment de la réception. Les sujets ont été répartis en six groupes de 6 lapins pour chacun selon le poids vif moyen similaire sous cinq traitements. Chaque lapin est identifié, chaque groupe est soumis à un régime différent pendant 30 jours. Ces poids moyens n'étaient pas statistiquement différents ($P = 0,1$).

3.3.1.5 Souches pathogènes de référence

Six bactéries dont deux à Gram (-) : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) et quatre à Gram (+) : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 et deux levures : *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus* sp. ATCC 16404. Les souches ont été fournies par Institut Pasteur d'Alger.

Les souches ont été conservées à température - 20 °C dans du bouillon nutritif contenant 30 % du glycérol.

3.3.2 Disques d'antibiotiques

Onze antibiotiques ont fait l'objet de cette étude : l'acide fusidique (10 µg), l'érythromycine (15 µg), la chloramphénicol (30 µg), la pénicilline (10 U), la gentamicine (10 µg), la streptomycine (10 µg), l'ampicilline (10 µg), la céfotaxime (30 µg) (Bioanalyse, France), l'amoxicilline (25 µg) (Himedia, Inde), l'oxacilline (1 µg) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), Cefalaxin (30 µg) (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

3.3.3 Milieux de cultures

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, la composition est indiquée en Appendice A. Tous les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage en cycle humide pendant 20 min à 120 °C. Il s'agit des milieux suivants :

- Géloses : MRS (de Man-Rogosa et Sharp), M 17, Mueller-Hinton, PCA (Plat Count Agar), VRBL (gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre), Mac conkey, Chapman, SS (Salmonelle-Shigella), OGA (gélose à la térramycine), BBE (Bacteroides Bile Esculin Agar).
- Bouillons : MRS, M 17, nutritif, hypersalé à 4 % et à 6,5 % de NaCl, SFB.

3.4 Méthodologies

3.4.1 Analyse nutritionnelle et phytochimique des poudres algales des espèces : *Spirulina platensis* et une algue verte *Chlorella pyrenoidosa*

Une caractérisation physicochimique a été effectuée des deux poudres algales séchées, puis des extractions excessives avec des solvants organiques à polarité croissante ont été effectuées et une évaluation de l'activité antimicrobienne de ces extraits organiques a été faite afin de sélectionner l'extrait à fort pouvoir antimicrobien et qui a fait l'objet d'une caractérisation par analyse chromatographique et spectrale.

La qualité physico-chimique et nutritionnelle des deux poudres algales a été déterminée et qui a comprenait :

- Analyse de pH, acidité et de la matière sèche ;
- Analyse de la composition en nutriments (protéines, matière grasse, glucides, et minéraux ;
- Valeur énergétique ;
- Analyse des acides gras de la fraction lipidique ;
- Analyse des microéléments (fer, zinc, calcium, Magnésium, potassium,) par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ;
- Analyse des métaux lourds (Plomb, cadmium)
- Analyse élémentaire par fluorescence des rayons X (FRX) ;
- Analyse thermogravimétrique (ATG) ;
- Analyse de la microstructure par microscope électronique à balayage (MEB).

3.4.1.1 pH

Le pH d'une solution algale à 4 % (4 g de poudre d'algue diluée dans 100 ml d'eau distillée) a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre de type *HANNA* 211 préalablement étalonné [262].

3.4.1.2 Acidité titrable

L'acidité titrable a été exprimée en grammes d'acide acétique pour 100 g de produit selon l'équation suivante [262]:

$$\text{Acidité } (^{\circ}D) = V \times 10$$

Soit : V : Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N.

3.4.1.3 Détermination de la teneur en humidité

La détermination de la teneur en humidité a été effectuée par étuvage à 103 ± 2 °C jusqu'à poids constant selon la méthode NF EN 12145.

5 grammes de l'échantillon ont été introduits dans un creuset préalablement pesé. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du poids d'eau par rapport au poids initial selon l'équation suivante :

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

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

m₀ : masse, en gramme, de la capsule vide ;

m₁ : masse, en gramme, de la capsule et de la prise d'essai ;

m₂ : masse, en gramme, de la capsule et le résidu sec.

3.4.1.4 Détermination de la teneur en protéines : Méthode de Kjeldhal

Les protéines totales ont été dosées par la méthode de KJELDAHL (NA.1158/1990). L'action oxydante de l'acide sulfurique concentré bouillant transforme l'azote organique en azote minéral sous forme de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄. Après déplacement par la soude, l'ammoniac est distillé et recueilli dans une solution d'acide borique qui le piège. Cette solution colorée est ensuite titrée par acidimétrie.

3.4.1.4.1 Mode opératoire

0,2 grammes d'échantillon ont été introduits dans un matras en présence d'un catalyseur (3,5 g de sulfate de potassium K₂SO₄ et 0,4 g de sulfate de cuivre CuSO₄, 5H₂O) et 10 mL d'acide sulfurique H₂SO₄ concentré (36 N). Le mélange a été soumis à une minéralisation pendant 4 h à 550 °C puis le volume du minéralisât a été complété avec de l'eau distillée après refroidissement jusqu'à 50 mL. Une solution de soude (10 N) a été ajoutée au minéralisât en présence de phénolphtaléine jusqu'à l'obtention d'une couleur rose. Cette solution a été distillée et le distillat a été piégé dans 20 mL d'acide borique contenu dans un erlenmeyer de 250 mL. La distillation a été arrêtée lorsque le volume final atteint 150 mL. Le distillat a été titré par l'acide sulfurique (0,1 N). La fin de la réaction est marquée par le virage de couleur de l'indicateur coloré (du bleu vert le jaune). Un essai à blanc (sans l'échantillon) a été lancé en parallèle dans les mêmes conditions.

La teneur en azote total est déterminée selon la formule suivante :

$$N (\%) = V \times 0,001 \times 4 \times \left(\frac{100}{M}\right)$$

D'où :

M : Masse en grammes du produit prélevé ;

V : Volume d'acide sulfurique (0,1 N) utilisé pour la neutralisation de l'ammoniac

La teneur en protéines (T_p) est déterminée selon la formule suivante :

$$T_p (\%) = N (\%) \times 6,25$$

3.4.1.5 Détermination du taux de la matière grasse

La détermination du taux de la matière grasse a été effectuée selon la méthode d'extraction au soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant à reflux (NA 1933).

3.4.1.5.1 Mode opératoire

30 g d'échantillon ont été introduits dans une cartouche d'extraction en cellulose, qui a été bouchée avec du coton cardé et placée dans le soxhlet. 300 mL d'hexane sont introduits dans un ballon d'ébullition préalablement pesé. Le soxhlet est monté et le ballon chauffé à ébullition du solvant. Un système de réfrigération permet de condenser les vapeurs du solvant destinées à entraîner les lipides. Les matières grasses sont extraites pendant 4 à 6 h et recueillies dans le solvant qui est ensuite évaporé au Rotavapor à 40 °C. Le ballon contenant la matière grasse a été pesé.

La teneur en matière grasse a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Taux de matière grasse } (\%) = \frac{PF - PO}{PE} \times 100$$

PE : Prise d'essai (30)

PO : Poids du ballon vide

PF : Poids du ballon contenant les matières grasses

3.4.1.6 Analyse de profile des esters méthyliques des acide gras

La détermination de la composition en acides gras des deux microalgues a été effectuée par la chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de type Agilent / HP 5973 au niveau de laboratoire de chromatographie au centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique de Boulsmail, selon la méthode ISO 5508 (1990).

Les composants en acide gras ont été convertis en ester méthylique avant d'être analysés par GC. Les esters méthyliques ont été préparés par une transméthylation selon la méthode ISO 12966-2 (2011). 10 mg d'échantillon ont été pesés avec précision puis ils étaient dissous dans 1 mL d'heptane. Le tube a été bouché hermétiquement, puis agité manuellement pendant 2 secondes, puis 200 μ L d'hydroxyde de potassium méthanolique (2 mol/L) ont été ajoutés. Le mélange a été agité de nouveau pendant 10 secondes puis placé dans un bain-marie à 50 °C pendant 20 secondes. Après agitation et décantation des deux phases, 1 μ L de la phase supérieure contenant les acides gras méthylés a été injecté en GC par mode splitless 1/100.

L'analyse a été réalisée par un chromatographe phase gazeuse HP 6890 équipé d'une colonne capillaire en silice (Siloxane méthyle) HP-1, 30 m \times 250 μ m \times 0,25 μ m, avec un gaz vecteur composé d'hélium à un débit de 1,5 mL.min⁻¹ et un détecteur à ionisation à flamme (MSD) CP 9002. La température du four a été de 150 – 240 °C (3 – 6 °C/ mn), la température d'injection a été de 150 °C et celle du détecteur de 250 °C.

L'identification des composés a été déterminée selon les deux banques de données de la GC-MS (Wiley et NIST) par le logiciel MSD ChemStation 2005.

3.4.1.7 Détermination du taux de sucres totaux

Le taux des sucres totaux a été déterminé par la méthode de dosage de Bertrand. Le glucose réduit partiellement la liqueur de Fehling en excès l'oxyde cuivreux formé (précipité rouge) est dosé par manganimétrie. Une table donne la correspondance entre la masse de cuivre et la masse de glucose. La réaction doit

se dérouler à chaud et pendant trois minutes à partir de l'ébullition pour respecter la correspondance des tables.

Une quantité de glucose réagit avec les ions cuivre (II) en excès pour former un précipité rouge brique. L'excès d'ions cuivre (II) est éliminé. Le précipité réagit avec un excès d'ions fer (III) pour le dissoudre. On obtient des ions fer (II) dosés par une solution de permanganate de potassium.

La teneur en sucres réducteurs a été exprimée en (g/L) selon l'équation suivante :

$$SR \left(\frac{g}{L} \right) = (X \times 10^{-3} \times 1000 \times K \times V_1) / V_2$$

D'où :

X : Quantité des sucres interverti correspond au volume de KMnO_4 0,1 N (lue sur le tableau de Bertrand) ;

K : Facteur de dilution ;

V_1 : Volume de KMnO_4 0,1 N (chute de burette)

V_2 : prise d'essai pour le dosage

3.4.1.8 Détermination du taux des cendres

La teneur en cendres (minéraux) a été estimée par incinération au four à 550 °C selon la méthode (NA 732/1991) de façon à obtenir la totalité des cations sous forme de carbonate et autres sels minéraux anhydres.

Mode opératoire

05 grammes de l'échantillon ont été introduits dans un creuset en porcelaine préalablement taré. L'ensemble est placé dans un four à moufle à 550 °C pendant 5 heures. Après refroidissement au dessiccateur pendant 30 minutes, on pèse à nouveau (**PF**). La teneur en cendres est donnée par la formule suivante:

$$\text{Taux de cendres (\%)} = \frac{PF - PO}{PE} \times 100$$

Soit : PE : Prise d'essai (2 g)

PO : Poids du creuset à vide

PF : Poids total en fin d'incinération

3.4.1.9 Dosage des minéraux

L'analyse a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique avec flamme, équipé d'une lampe à cathode creuse spécifique pour chaque élément. Ceci a été le cas pour les macroéléments (Ca, Mg, Na, K), les microéléments (Cu, Fe, Zn) et les métaux lourds (Pb, Cd).

La minéralisation a été effectuée selon le protocole de WHEAL *et al.* modifié [263], 0,5 g d'échantillon ont été digesté avec 10 mL d'acide nitrique (HNO₃) et 1 mL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à une température de 103 °C. Le minéralisat a été filtré dans une fiole de 50 mL et le volume du minéralisat a été complété avec de l'eau ultra pure jusqu'à le trait de jauge. La lecture a été effectuée aux longueurs d'onde suivantes : Ca (239,9 nm), Mg (202,6 nm), Na (589 nm), K (404,4 nm), Cu (324,7 nm), Fe (248,3 nm), Zn (213,9 nm), Pb (217 nm), Cd (228,8 nm), selon les type de flamme suivante : Ca (Protoxyde d'azote), Na, K, Cu, Fe, Zn (Air-acétylène), après un ajustement des conditions de flamme de manière à obtenir une sensibilité et une fidélité optimales.

Pour le dosage du calcium et du magnésium, une solution de chlorure de lanthane est ajoutée au milieu réactionnel pour éviter toute interférence. Pour chaque élément, une courbe d'étalonnage correspondante a été tracée (Appendice C) en ayant recours aux solutions standards ISO (Atomic spectroscopy standard) de concentrations initiales 1000 ppm. Des dilutions ont été préparées aux concentrations respectives de : Ca (0-50 ppm), Mg (0-20 ppm), Na (0-10 ppm), K (0 -100 ppm), Cu (0-10 ppm), Fe (0-30 ppm), Zn (0-2,5 ppm), Pb (0-30 ppm), Cd (0-3 ppm) par le logiciel SpectrAA.

Chaque mesure a été répétée trois fois et une moyenne a été calculée de ces valeurs. La valeur de l'absorbance moyenne de la solution à blanc a été soustraire de la valeur moyenne de mesure de chaque élément. Par intermittence, une vérification de l'appareil et un contrôle de la stabilité de l'étalonnage a été effectuée à l'aide des solutions étalon du deuxième point (C₂) généralement à la fin de mesure. Les teneurs en minéraux des échantillons exprimées en (mg/Kg) ont été calculées selon l'équation suivante :

$$W_s = \frac{C_s \times f \times V}{m}$$

Ws est la teneur en minéraux de l'échantillon, en mg/Kg ;

Cs est la teneur en minéraux de la solution d'essai, en mg/L, lue sur la courbe d'étalonnage ;

f est le facteur de dilution (volume final de la solution d'essai divisé par le volume de la solution d'essai initiale utilisé pour la dilution ;

V est le volume de la solution d'essai en mL ;

m est la masse, en g, de la prise d'essai.

3.4.1.10 Calcul de la valeur énergétique

La valeur énergétique théorique des échantillons a été calculée à partir des valeurs analytiques pour les protéines totales, les matières grasses et les hydrates de carbone [264].

En utilisant les valeurs d'énergie physiologique moyenne, la valeur énergétique théorique des deux microalgues a été déterminée selon la formule :

$$E \text{ (kJ)} = 17 \left(\frac{\text{kJ}}{\text{g}} \right) \times \% \text{ protéines totales} + 38 \left(\frac{\text{kJ}}{\text{g}} \right) \times \% \text{ matières grasses} + 17 \left(\frac{\text{kJ}}{\text{g}} \right) \times \% \text{ glucides totaux}$$

3.4.1.11 Analyse élémentaire par FRX

L'analyse a été effectuée au niveau du CRAPC, de Boulsmail, d'Algérie par l'équipement « ZSX Primus II de Rigaku », selon les conditions suivantes : Diamètre de pastille : 30 mm, temps de mesure : 10 min. La fluorescence des rayons X est une méthode d'analyse physique qui consiste à la détermination qualitative des éléments constituant les échantillons donnés et les quantifier avec cadence rapide et une précision très appréciable [265].

L'échantillon à analyser est irradié par un faisceau de rayons X d'un tube. Sous l'effet de ces rayons X, les atomes constituant l'échantillon passent de leur état fondamental à un état excité. L'état excité est instable, les atomes tendent alors à revenir à l'état fondamental en libérant de l'énergie, sous forme de photons X notamment. Chaque atome, ayant une configuration électronique propre, va

émettre des photons d'énergie et de longueur d'onde propres. C'est le phénomène de fluorescence X qui est une émission secondaire de rayons X, caractéristiques des atomes qui constituent l'échantillon. L'analyse de ce rayonnement X secondaire permet à la fois de connaître la nature des éléments chimiques présents dans un échantillon ainsi que leur concentration massique.

Les deux poudres algales très bien broyées ont été pressées dans un petit disque pour former des pastilles de 10 g et 30 mm de diamètre.

3.4.1.12 Analyse thermogravimétrique

L'analyse de l'ATG a été effectuée dans le cadre d'étudier le comportement thermique de la dégradation de la biomasse. La composition chimique, la vitesse de chauffage, le séchage préalable, le temps de maintien de température peuvent jouer un rôle important comme facteurs qui affectent ce comportement.

L'analyse thermogravimétrique a été effectuée sur les deux espèces microalgales à l'aide du thermogravimètre SDT Q600 (Figure 4 en Appendice B), avec l'azote (N₂) comme gaz de balayage à 100 mL/min garantissant un milieu inerte. Les paramètres fournis du logiciel de l'ATG (QSeries) sont la température, la variation de la masse de la biomasse et le temps écoulé. L'analyse a été réalisée avec une vitesse de chauffage de 10 °C/min, jusqu'à atteindre une température de 1000 °C.

La vitesse de décomposition est aussi un paramètre important à considérer, car il présente la décomposition instantanée de la biomasse en fonction de la température. Ce paramètre permet de déterminer les températures de début et fin ainsi qu'à laquelle y aura le maximum de décomposition. On appelle cette analyse, l'analyse thermogravimétrique dérivative [20].

3.4.1.13 Analyse de la microstructure par MEB

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière [20].

Le microscope électronique à balayage est une technique utilisée pour définir la répartition, la forme et la morphologie en 3 dimensions des cellules. La microscopie électronique repose sur le même principe que la microscopie optique, à la différence près que le rayon incident est constitué par un faisceau d'électrons au lieu d'un rayon de lumière visible [20].

L'analyse de la microstructure a été effectuée par un MEB-EDX de type QUANTA 250 de marque FEI. Les échantillons ont été fixés à l'aide d'un ruban adhésif en carbone conducteur sur des platine porte-objets pour être scannés sous vide avec une tension d'accélération de 10 KV. Plusieurs agrandissements ont été effectués : 60, 400, 800, 1500 et 1600.

Le couplage de microscope électronique à balayage (MEB) avec dispersion des électrons des rayons X (EDX), permet de donner la microanalyse d'échantillon étudié, c'est-à-dire la détermination de sa composition chimique soit en pourcentage atomique ou pourcentage massique.

3.4.2 Extraction des molécules bioactives et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques

3.4.2.1 Préparation des extraits à partir des poudres de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

Différents extraits organiques ont été préparés à partir de la poudre de la cyanobactérie *Spirulina platensis* et l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*. Nous avons choisis l'extraction conventionnelle par soxhlet qui est une technique couramment utilisée pour isoler les composés bioactifs, elle permet de réaliser des extractions en continues solide-liquide à l'aide de cycles de vaporisation – condensation du solvant (Figure 1.D en appendice D) [266].

L'efficacité de l'extraction au soxhlet est liée au fait que le solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage. Dans le cas de la macération, le solvant devant extraire la matière végétale peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé [267].

Cinq extraits organiques ont été obtenus à partir de chaque algue par quatre extractions successivement au soxhlet avec des solvants de polarité croissante (du moins polaire au plus polaire): hexane, éther, dichlorométhane, acétone afin de récupérer l'ensemble des molécules organiques et une extraction hydrométhanolique a été préparée par macération.

L'extrait à l'hexane et à l'éther contient des composés apolaires, tandis que celui au dichlorométhane contient les composés peu polaires et d'acétone moyennement polaires. Le méthanol extrait les composés les plus polaires.

3.4.2.1.1 Préparation des autres extraits

10 g de la poudre fine algale a été introduits dans la cartouche d'extraction en cellulose, 250 mL de solvant a été ajoutés dans le ballon. Cette extraction en continu a été menée, jusqu'à extraction totale des composés extractibles (environ 6 h). Chaque extrait a été concentré avec un évaporateur rotatif (de type Heidolphe) (Figure 1.D en appendice D) sous vide à 45 °C puis conservé à l'obscurité et à - 18 °C jusqu'à utilisation ultérieure. Après extraction avec le premier solvant organique, le résidu a été séché à 45 °C puis il a subit la même opération d'extraction décrite précédemment (Figure 3.1).

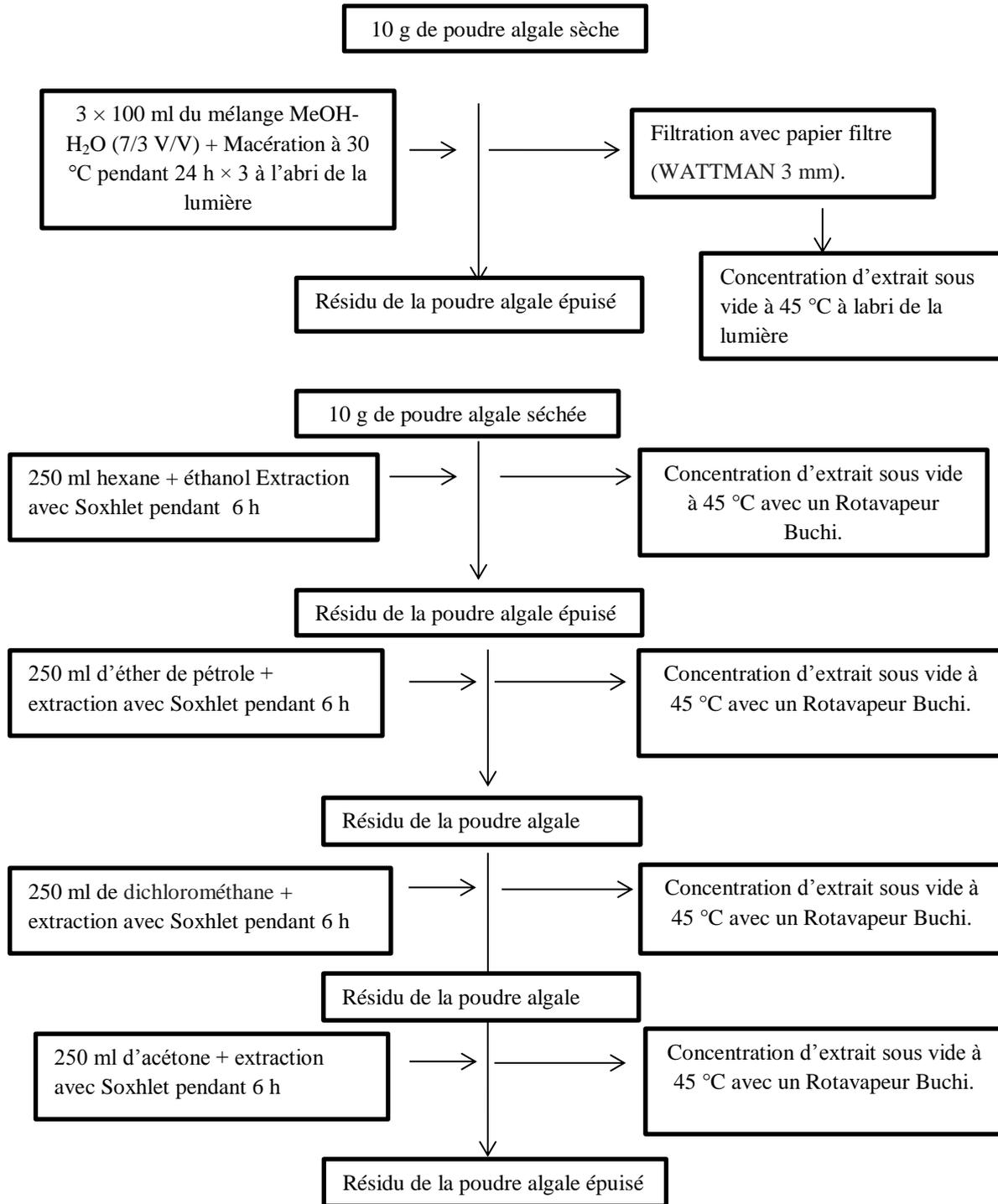


Figure 3.1 : Protocole d'extraction à partir de la poudre algale sèche

3.4.2.1.2 Préparation de l'extrait hydrométhanolique

La même prise d'essai a subi une extraction par macération dans le solvant selon le ration 10 g de poudre dans 100 mL du mélange méthanol/eau (7 :3) (v/v) pendant 24 h, la macération a été cette opération a été répétée trois fois (3 × 100 ml) pour faire extraire le maximum de molécules d'intérêt. L'extrait obtenu est séparé du résidu par filtration par papier filtre wattman puis le filtrat a été centrifugé à 4000 g durant 20 min. Le surnageant a été concentré au ratovapeur (de type Heidolphe) à 45 °C, puis congelé et lyophilisé à une température de – 55 °C pendant deux cycles (48 h) par un lyophilisateur de type CHRIST ALPHA 2-4 LSC plus équipé d'un condenseur et d'un piège à glace. Le lyophilisat a été ensuite conservé à + 4 °C à l'obscurité jusqu'à utilisation ultérieure.

Ces extraits ont fait l'objet d'analyse phytochimique et étude de l'activité antimicrobienne.

3.4.2.2 Calcul du rendement d'extraction

Une fois les extraits ont été obtenus, nous avons déterminé leurs couleurs et leurs rendements par rapport au résidu sec de l'algue selon la formule suivante [20] :

$$R_{dt} = \frac{m_{\text{extrait}}}{m_{\text{algue}}} \times 100$$

m_{extrait} : La masse de l'extrait

m_{algue} : La masse de l'algue sèche ($m_{\text{algue}} = 10 \text{ g}$).

3.4.2.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques

Les différents extraits organiques obtenus à partir de la cyanobactérie *Spirulina platensis* et de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* ont faits l'objet d'une étude de leur activité antimicrobienne à l'égard de quatre bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922 multi-résistante à la HLG (gentamycine), S (streptomycine), C (chloramphenicole), E (erythromycine), *Klebsiella sp* ATCC 4352, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 multi-résistante à la S (streptomycine) et HLG (gentamycine), et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et quatre bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 multi-résistante à la C (chloramphenicole), S (streptomycine), HLG (gentamycine) et E (erythromycine) (Figure 1.E en Appendice E), *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilus* ATCC

6633, and *Bacillus subtilis* ATCC 9372, ainsi que deux levures : *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus sp* ATCC 16404. Cette étude a pour but de déterminer l'effet bactériostatique ou bactéricide des substances extraites.

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique a été déterminée par la méthode de diffusion sur agar décrite par SPOONER & SYKES [268] sur la gélose Muller-Hinton pour les bactéries et la gélose Sabouraud dextrose pour les levures. Cette méthode permet d'observer rapidement les effets d'une substance vis-à-vis du développement bactérien c'est-à-dire l'effet bactériostatique. Il s'agit d'une technique fiable, facile à mettre en œuvre, et sa lecture est rapide.

L'activité bactériostatique des extraits testés est rendues visible par la présence d'une auréole d'inhibition plus ou moins étendues du développement bactérien. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés en millimètres pour chaque substance testée.

3.4.2.3.1 Protocole expérimental

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion en puits en utilisant le milieu solide. Donc un milieu de culture solide est nécessaire au développement des bactéries. Il s'agit de milieu Muller-Hinton (MH), gélosé, stérilisé et coulé dans des boites de Pétri des diamètres (60 mm).

3.4.2.3.1.1 Préparation de la suspension bactérienne

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boites de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées à 37 °C pendant 24 h, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boites et à l'aide d'une ose quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées et mises dans 5 mL d'eau physiologique stérile à 0,9 % de sel (NaCl). La suspension bactérienne a été bien homogénéisée correspond à une absorption à 600 nm de densité optique D.O = 0,8 – 1. Il est admet que cette densité mesurée à 600 nm est équivalente à 10⁸ CFU/ml. L'inoculum a été ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement a été fait en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

3.4.2.3.1.2 Méthode de diffusion

100 µL d'une suspension bactérienne en phase de croissance exponentielle ont été ensemencés sur la surface de la gélose. La suspension a été étalée le plus homogènement possible à l'aide d'un étaleur stérilisé, puis des puits de 6 mm de diamètre ont été perforés dans la gélose à l'aide des pipettes pasteur stérilisées.

Une solution à 20 mg/mL dans DMSO 2 % a été préparée pour chaque extrait, chaque 100 µL de ces solutions ont été introduites dans les puits, puis les boîtes ont été maintenues au réfrigérateur (4 °C) pendant 2 h pour une bonne diffusion des molécules bioactives. Ensuite les boîtes ont été incubées à 37 °C à 18-24 h pour les bactéries et 24-48 h pour les champignons.

L'activité antibactérienne a été déterminée en termes de diamètres de la zone d'inhibition produit autour des puits pour le développement du germe en question.

Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif, la gentamicine (10 µg/disque) et l'érythromycine (10 µg/disque) comme contrôle positif.

Les bactéries montrant une sensibilité aux extraits ont été sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

3.4.2.4 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits organiques

La Concentration minimale inhibitrice a été déterminée selon la méthode de dilution de bouillon [269, 270] Dans le but de déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme.

Une solution mère a été préparée par pesée de concentration 100 mg/mL dans le diluant (DMSO), puis une série de dilution a été préparée : allant de 75 mg/mL jusqu'à 1 mg/mL. Après stérilisation par filtration, 1 mL de chaque dilution préparée a été ajouté à 5 mL de bouillon Mueller-Hinton de façon à obtenir les concentrations suivantes : 15 mg/mL jusqu'à 0,2 mg/mL. Chaque dilution a été ensemencée avec une souche test. Puis les tubes ont été incubés aux températures appropriées pendant 24 h. La CMI a été indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'a été constatée, c'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'a été observée dans le milieu. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif, la gentamicine (100 µg/mL) comme contrôle positif.

3.4.2.5 Analyse phytochimique des extraits organiques

L'analyse phytochimique des extraits organiques obtenus à partir de la poudre séché des deux microalgues a été effectuée par des dosages et des tests chimiques dans le but de déterminer les différents composés chimiques en utilisant le protocole adopté par HARBONE [271].

3.4.2.5.1 Composés polyphénoliques totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode décrite par SINGLETON *et al.* [272] en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. A 300 µL d'échantillon 1,5 mL de Folin-Ciocalteu (1/10 v/v) ont été ajoutés et après 5 mn d'agitation, 500 µL d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L) ont été ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante, le contenu a été ensuite centrifugé à 2000 g pendant 5 min et l'absorption du liquide surnageant a été prise à 760 nm. L'estimation des composés phénoliques a été réalisée en trois essais. Une courbe d'étalonnage (Figure 1.F en Appendice F) a été obtenue à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en moyennes ± écart en mg d'équivalents d'acide gallique (EAG) par 10 g de poids sec (mg EAG/g PC).

3.4.2.5.2 Composés flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode décrite par KOSALEC *et al.* [273]. Cette méthode consiste à ajouter 0,5 mL d'une solution de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (2 % dans de l'éthanol absolu) à 0,5 mL d'échantillon. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 450 nm. La teneur en flavonoïdes totaux a été calculée en terme d'équivalent quercétine par référence au courbe étalon (Figure 2.F en Appendice F).

3.4.2.5.3 Tanins

Les tanins catéchiques ont été identifiés par le réactif de STIASNY (Formol 30 %, HCl concentré : 1/0,5). Cinq (5) mL de chaque extrait ont été évaporés à sec. 15 mL ont été ajoutés puis le mélange a été porté au bain-marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiques.

Les tanins galliques ont été identifiés par l'ajout de FeCl_3 au mélange précédent après son filtration. Le filtrat a été recueilli et saturé avec l'acétate de sodium et l'ajout de 3 gouttes de FeCl_3 à 2 %. L'apparition d'une coloration bleu-noir intense dénote la présence de tanins galliques.

3.4.2.5.4 Alcaloïdes

5 mL d'extrait ont été évaporés à sec, puis repris avec 6 mL d'alcool 60 °, puis 2 gouttes de réactif Dragendorff ont été ajoutées au mélange et après l'apparition d'un précipité d'une couleur orangée, 2 gouttes du réactif Mayer (Bouchardat) ont été ajoutées au mélange ce qui induit à l'apparition d'un précipité de coloration brun-rougeâtre si la réaction est positive [274].

3.4.2.5.5 Terpénoïdes

5 mL d'extrait ont été évaporés à sec puis repris avec 10 à 20 mL d'hexane, À 2 g de matériel végétal en poudre sont ajoutés 1 ml d'anhydride acétique. Le mélange est soumis à une agitation de 30 min puis un ajout de 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition à l'interphase, d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu au vert indique une réaction positive [20].

3.4.2.5.6 Quinones

A 2 mL d'extrait, quelques gouttes d'ammoniaque 50 % ont été ajoutées, la présence de quinones est confirmée, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet [274].

3.4.2.5.7 Détermination de la teneur en phycocyanine

La teneur totale en pigment bleu phycocyanine a été déterminée selon le protocole décrit par SILVERIRA *et al.* [275], par colorimétrie en mesurant l'absorbance DO à 280, 615 nm et DO 652 nm respectivement, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible du filtrat centrifugé à 6000 tours/mn issu après une destruction mécanique dans un tampon phosphate 0,05 M (pH = 6,8) comme solvant d'extraction.

Le poids de la phycocyanine a été déterminé selon la méthode suivante :

$$\text{Teneur en phycocyanine (mg/g)} = \frac{DO\ 615 - 0,474 (DO\ 652)}{5,37}$$

$$\text{Pureté d'extraction} = \frac{DO\ 615}{DO\ 280}$$

3.4.2.5.8 Détermination de la teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle a été déterminée selon le protocole décrit par LICHTENTHALER [276] par colorimétrie en mesurant l'absorbance DO à 660 nm et à 642,5 nm après extraction de la chlorophylle (Appendice E). La quantité de la chlorophylle (a) et (b) a été déterminée en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Chlorophylle totale (mg/g)} = 7,12\ DO\ 660 - 16,8\ DO\ 642,5$$

3.4.2.6 Analyse des polyphénols par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des extraits bruts hydro-méthanoliques

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.) [277]. Le schéma (Figure 1.G en Appendice G) présente le principe général de la méthode.

La méthode HPLC analytique qui a été utilisée, il s'agit d'une méthode optimisée spécifique pour l'analyse qualitative des polyphénols totaux au niveau du laboratoire des analyses chromatographiques du CRAPC.

L'analyse des extraits bruts méthanoliques a été menée par une HPLC YL 9100 System selon les conditions opératoires suivantes : une pompe YL9110, d'un injecteur et un détecteur UV-Visible, intégrateur a été utilisée en phase inverse, avec une colonne analytique C18 (Dimension 25 cm x 4,6 mm x 5 µm). Le débit de la

phase mobile été de 1 ml.min⁻¹. La phase mobile utilisée est constituée de deux solvants : solvant A : méthanol (100 %), solvant B : eau acidifiée à 1 % avec d'acide acétique. Le volume injecté a été de 20 µL. La longueur d'onde de détection optée a été de 254 nm. Le gradient de la phase mobile est présenté dans le tableau 3.1. Le traitement des données a été effectué par le logiciel YL-CLARITY.

Tableau 3.1 : Gradient de solvants utilisé pour le dosage des polyphénols totaux des deux extraits méthanoliques bruts de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

Temps (min)	Solvants	
	A (%)	B (%)
0	95	5
55	5	95
60	95	5

3.4.2.7 Analyse spectrale des extraits hydro-méthanoliques

3.4.2.7.1 Spectroscopie UV et IR

L'absorption moléculaire dans le spectre ultraviolet et visible dépend de la structure de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons d'orbitales de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieure. La structure particulière d'une molécule est liée à une absorption plus ou moins importante à chaque longueur d'onde observable (UV de 200 à 400 nm et visible de 400 à 800 nm), ce qui peut se traduire par l'établissement d'un spectre d'absorption. Cette technique permettra de connaître les groupements chimiques particuliers, surtout s'ils comportent des doubles liaisons en mesurant la longueur d'onde d'absorption maximale de la molécule λ_{\max} , et l'intensité de cette absorption (densité optique DO) [20].

3.4.2.7.2 Spectrométrie Ultraviolet (UV)

Les spectres UV des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type SPECORD 210 UV/Vis AnalytikJena, double faisceau permettant des lectures directes contre un blanc. Les mesures ont été effectuées dans des cuves en quartz à trajet optique de 1 cm. Les résultats ont été traités par le logiciel WinASPECT PLUS.

3.4.2.7.1.2 Spectrométrie Infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouges des molécules ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre ALPHA-P BRUKER. Les spectres ont été traités par le logiciel OPUS.

3.4.3 Caractérisation et criblage des souches probiotiques de bactéries lactiques et pseudolactiques isolées de différents biotopes

Dans cette partie, nous avons effectué un isolement des bactéries lactiques à partir des laits de vache et de chamelle, ainsi que des bifidobactéries à partir de selles de nourrissons sous différents types d'allaitement. Les souches purifiées et identifiées biochimiquement ont fait l'objet d'un criblage selon les propriétés probiotique et technologique. Afin de sélectionner les meilleures souches à fort potentiel.

3.4.3.1 Isolement et cultures des bactéries lactiques et pseudolactiques autochtones isolées

1 mL de lait a été ajouté de façon aseptique dans 9 mL de diluant (solution de NaCl 0,9 % stérile). Une série de dilution (10^{-1} à 10^{-8}) a été préparée et homogénéisée. 1 mL de la dilution appropriée à partir des dilutions ainsi préparées a été ensemencé dans l'un des milieux de culture approprié à chaque souche.

Lactobacillus sp. ont été isolés sur le milieu MRS ajusté à pH 5,4 avec de l'acétate de sodium de sorte que la croissance d'autres organismes pourraient être supprimés [278]. Les boîtes de Pétri ont été incubées en anaérobies (jarres anaérobies avec gaz-packs) à 37 °C pendant 48 à 72 h jusqu'à ce que la croissance a été observée.

Lactococcus sp. et *Streptococcus* sp. ont été isolés sur le milieu M17 (MERCK, Darmstadt, Allemagne) [279] Après une incubation de 48 h à 30 °C et 42 °C, respectivement, en aérobiose.

Pediococcus sp. et *Enterococcus* sp. ont été isolés sur le milieu MRS. Les boîtes de Pétri ont été incubées en aérobies à 37 °C et 44 °C pendant 48 h, respectivement.

L'isolement des bifidobactéries à partir de selles fraîches de nourrisson a été effectué selon le protocole de BEEREN [280], sur le milieu MRS supplémenté avec 0,05 % chlorure-cystéine (Cys-HCl, Sigma) et 2 mg/L d'acide nalidixique à pH 6,8. Les boîtes ont été incubées en anaérobiose (jarres anaérobies avec gaz-packs) à 37 °C pendant 48 h à 72 h.

3.4.3.2 Purification et conservation des isolats

La purification a été effectuée par des repiquages successifs sur des boîtes de Pétri contenant les milieux sélectifs cités précédemment avec une incubation aux températures appropriées.

Les souches purifiées ont été ensemencées dans ces géloses sélectives inclinées en tubes. Ces cultures ont été stockées à 4 °C pendant 4 semaines, en cas de besoin, elles ont été repiquées dans du lait écrémé reconstitué (10 %).

Un autre type de conservation a été utilisé, il s'agit de la conservation à – 20 °C pendant 3 mois, pour les bifidobactéries ont été conservés dans du lait reconstitué contenant 30 % de glycérol et 10 % d'extrait de levure et 0,2 % de HCl-cystéine [281]. Alors que les cultures de *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Pediococcus* ont été maintenues dans du lait écrémé contenant 30 % de glycérol, 10 % d'extrait de levure. Avant utilisation les souches ont été revivifiées pendant 72 h à température appropriée et repiquées au moins trois fois.

3.4.3.3 Identification des souches isolées

Les isolats ont été identifiés par l'application de l'approche qui est basée sur les caractères phénotypiques (morphologiques), biochimiques et physiologiques. La morphologie des colonies et leurs dimensions ont été étudiées après un repiquage de deux à trois colonies de même boîte sur le même milieu de culture.

Suite à la purification des isolats, quatorze souches de bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus* ont été isolées à partir de lait cru et qui y ont été codées S1 à S14 et cinquante-quatre souches bifides ont été isolées à partir des fèces de nourrisson et qui y ont été codées BHI 1 à BHI 45.

3.4.3.3.1 Examen macroscopique

Un examen macroscopique a été effectué pour décrire l'aspect des colonies des isolats (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité) qui ont été purifiés sur les milieux appropriés et dans le but d'exclure ceux qui ne répondent pas aux critères de classifications des bactéries lactiques.

3.4.3.3.2 Examen microscopique

La pureté des souches a été contrôlée par la coloration de Gram, celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

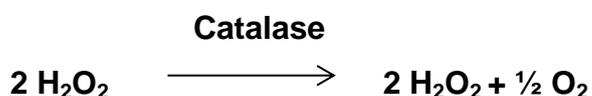
3.4.3.3.3 Pré-identification des isolats

3.4.3.3.3.1 Tests physiologiques et biochimiques

Les isolats ont été pré-identifiés selon les tests physiologiques et biochimiques décrits par MAHMOUDI et al. [282] et SCHILLINGER et FRIEDRICH-KARL [283].

3.4.3.3.3.2 Recherche de la catalase

La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de peroxyde d'hydrogène sous l'action de l'enzyme à tester selon la réaction suivante :



Le contraire est négatif [284].

3.4.3.3.3.3 Recherche de l'oxydase

Le cytochrome oxydase assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit. La recherche de cette enzyme est faite en utilisant des disques commercialisés «ox», imprégnés d'oxalate de N-diméthyl paraphrénie diamine (Diagnostic Pasteur, BioMerieux), oxydé par le cytochrome C, se transforme en composé violet foncé.

Le disque « ox » est déposé sur une lame propre et imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile. Une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri à l'aide d'une pipette pasteur puis déposer sur le disque. En présence de l'oxydase (le cas de bactéries oxydase positive), la coloration violet foncé apparaît immédiatement ou en quelque secondes, puis noircit (Rose violette puis elle devient brun foncé).

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

NN-diméthyl-paraphénylène diamine	—————>	Produit coloré
Incolore	—————>	rose violacé

3.4.3.3.4 Recherche de l'uréase

La recherche d'une uréase consiste à constater l'alcalinisation d'un milieu contenant de l'urée par la formation d'ammoniac. A partir d'une culture pure, une suspension dense a été préparée dans 0,5 ml de milieu urée-indole. La préparation est ensuite été incubée aux températures appropriées aux isolats pendant 24 heures. Le résultat étant positif se traduit par un virage de l'indicateur du jaune au rouge violacé ou au rose rouge.

3.4.3.3.5 Recherche de citratase

La citratase est mise en évidence en ensemencant le milieu Kempfer et McKey avec une culture jeune, les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 72 h. Les souches dites citratase (+) sont caractérisées par la formation des colonies de couleur bleue. Cette enzyme est prépondérante chez *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et certaines espèces du genre.

3.4.3.3.6 Croissance à différentes températures et de thermo-résistance

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du milieu de culture par les souches pures, les tubes ont été incubés pendant 24 h à 48 h aux températures 25 °C, 30 °C et 45 °C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Pour la thermo-résistance, on fait chauffer la suspension bactérienne pendant 10 min à 63,5 °C puis en incube à 30 °C [285, 286].

3.4.3.3.7 Culture sur milieu hypersalé

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont étéensemencées sur des bouillons hypersalés à 4 % et à 6,5 % de NaCl. Après une incubation aux températures appropriées pendant 24 à 72 h. Le développement des cultures a été apprécié par comparaison avec un tube témoin nonensemencé, incubé dans les mêmes conditions.

3.4.3.3.8 Croissance à différentes valeurs de pH

La croissance à différents pH de milieu de culture a été étudiée. Les isolats ont étéensemencés sur des bouillons de pH 4, 5, 6,5, 8 et 8,5. Après une incubation aux températures appropriées pendant 2 à 3 jours. Le développement des cultures a été apprécié par comparaison avec un tube témoin nonensemencé, incubé dans les mêmes conditions.

3.4.3.3.9 Détermination du type fermentaire

Ce test permet de classer les bactéries en espèces homo ou hétéro-fermentaires, il consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO₂), il est réalisé en inoculant les isolats dans 10 mL de bouillon contenant une cloche de Durham. Après une incubation aux températures appropriées pendant 48 h, la présence ou l'absence de gaz dans les cloches indique le type fermentaire.

3.4.3.3.10 Profil fermentaire des sucres

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches lactiques à fermenter quelques sucres. Pour ce faire, le milieu MEVAG sans sucre additionnés des sucres à étudier a étéensemencé en masse par les cultures bactériennes. Une couche suffisante de l'huile de vaseline stérile a été versée à la surface du milieu pour favoriser l'anaérobiose. Après 24 h d'incubation, le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre testé.

Le profil fermentaire des bifidobactéries a été étudié par l'utilisation des galeries biochimiques *Api 50 CHL* (biomérieux). Ces galeries permettent l'étude rapide de la fermentation de 49 sucres. Le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent le virage d'un indicateur de pH.

Les souches ont été repiquées à deux reprises sur le milieu MRS. Les cultures ont été centrifugées (6000 g, 5 min), puis le culot a été remis en suspension dans 4 mL d'eau distillée stérile. 400 à 500 μ L ont été prélevés de cette suspension bactérienne puis ont été additionnés de 4 mL d'eau distillée stérile de manière que la capacité du mélange corresponde à l'étalon n°2 dans l'échelle de Mac Farland. Cette suspension a été répartie dans les 50 microtubes de la galerie qui ont été recouvertes par la suite d'huile de vaseline stérile afin d'obtenir les conditions d'anaérobiose. Les galeries ont été incubées à 37 °C et des lectures ont été faites à 3 h, 6 h, 24 h et 48 h.

3.4.3.3.11 Production des composés aromatiques (production d'acétoïne)

La production d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol) a été testée sur le milieu Clark et Lubs. Les souches ont été cultivées sur ce milieu, après 24 h d'incubation, on teste par la réaction de Voges- Proskauer dite réaction de V.P selon le protocole décrit par AVRIL *et al.* [287]. Dans un tube à hémolyse, 2 mL de chaque culture bactérienne, 0,5 mL d'une solution de soude (NaOH) à 16 % dans l'eau distillée (VP1) et 0,5 mL de réactif α -naphtol (VP2), ont été transvasés puis agités. Après un délai de 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion de la couleur rose à la surface du milieu. Un VP positif signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylène glycolique [288].

3.4.3.3.12 Test d'hydrolyse de l'arginine (ADH), lysine (LDC) et ornithine (ODC)

Ce test consiste à la recherche des enzymes : lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, arginine dihydrolase. Ces enzymes catalysent respectivement la décarboxylation de l'arginine, de la lysine et de l'ornithine présent dans le milieu. Cette dégradation aboutit à la formation de produits basiques; l'alcalinisation du milieu est révélée par un virage de l'indicateur de pH (le pourpre de bromocrésol) à sa teinte basique (violette). Le milieu a étéensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne dense. Une couche de vaseline stérile a été ajoutée afin de placer le milieu en anaérobiose. Après une incubation aux températures appropriées pendant 24 h. La présence de ces enzymes se traduit par une coloration violette du milieu qui est due à une réalcalinisation du milieu liée à la dégradation du substrat

(arginine ; lysine ou ornithine) par la bactérie après une acidification du milieu liée à la fermentation du glucose.

L'identification complète des souches lactiques isolées à partir des laits a été achevée selon les schémas de systématique cités en Appendice H. Tandis que, celle des souches pseudolactiques, les résultats du profil fermentaire ont été traités avec logiciel *Api web*.

3.4.3.4 Etude du potentiel probiotique des souches lactiques et pseudolactiques

La tolérance des souches isolées et identifiées comme des bactéries lactiques et pseudolactiques aux conditions acides, aux sels biliaires a été testée selon le protocole décrit par CHUNG et al. [289], KLINGBERG et al. [290] modifié, afin d'étudier la survie de ces souches durant son passage dans le tractus digestif.

3.4.3.4.1 Tolérance à l'acidité et la résistance aux sels biliaires

Avant la réalisation de ce test, chaque souche a étéensemencée sur le bouillon de culture en triple essai. 1 mL d'une préculture de 18 h a été inoculé dans 5 mL de bouillon nutritif ajusté à différentes valeurs de pH (pH 2, pH 3 et pH 5) et additionné de différentes concentrations de sels biliaires (0,3, 0,5 et 1 %). Les tubes ont été incubés pendant 3 h aux températures appropriées à chaque souche. Ensuite, des séries de dilution de 10-fois ont été préparées dans du PBS, 100 µl de chaque culture a étéensemencé sur le milieu gélosé, ensuite les boîtes de Pétri ont été incubés pendant 4 h. chaque 2 h le taux de survie a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\log \text{UFC à } T_{2h}}{\log \text{UFC à } T_{0h}} \times 100$$

Le taux de survie a été calculé comme étant le pourcentage de colonies cultivées par rapport à la concentration bactérienne initiale. Chaque détermination a été réalisée en triple essai.

3.4.3.4.2 Résistance aux sels biliaires

La capacité des souches à croître en présence des sels biliaires a été déterminée selon le protocole décrit par VINDEROLA et REINHEIMER [290]. Chaque souche a été inoculée (2 % v/v) dans le bouillon MRS ou M 17 additionnée de 0,3, 0,5 et 1 % (p/v) de la bile bovine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). La densité optique (DO) à 620 nm des cultures inoculées pendant 24 h aux températures appropriées a été mesurée chaque heure. La résistance des souches aux différentes concentrations aux sels biliaires a été comparée entre eux et par rapport au témoin négatif (sans sels biliaires).

Le taux de survie des souches a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\log \text{UFC à } T_{3h}}{\log \text{UFC à } T_{0h}} \times 100$$

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) \pm écarts-types. Chaque détermination a été réalisée en triple essai.

Toutes les souches lactiques et pseudolactiques sélectionnées ont fait l'objet d'étude ultérieure.

3.4.3.5 Etude des propriétés technologiques des d'intérêt

Deux critères technologiques ont été étudiés à savoir : la quantité d'acide lactique produite et sa vitesse de production ainsi que le taux de croissance, dans le but de sélectionner les meilleures souches lactiques et pseudolactiques.

3.4.3.5.1 Détermination de l'acidité titrable et de pH

Le pouvoir acidifiant a été déterminé selon la méthode d'ACCOLAS *et al.* [291] modifiée. La mesure de cette activité a été réalisée par la détermination du pH et l'acidité dornic. La méthode consiste à ensemercer 100 μ l de la souche dans 10 ml de lait écrémé, les prélèvements ont été effectués au moment d'inoculation et après 2, 4, 6, 8, 24 et 48 h pour la mesure du pH à l'aide d'un pH-mètre (HANNA Instrument, pH 211, Woonsocket, Roumanie) et l'acidité par titrage avec de NaOH (Panreac Química, Spain) (N/9) en présence de 0,1 ml de phénolphtaléine (Sigma-Aldrich, Allemagne) (1 %) comme indicateur. sachant que :

$$1 \text{ } ^\circ\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

(1 $^\circ$ D = 0,1 g d'acide lactique dans 1 Litre de lait.)

La vitesse maximale d'acidification est exprimée en unités de pH par min se calcule en divisant la valeur du pH à laquelle correspond la fin de la phase exponentielle de croissance par le temps de cette même valeur [292].

$$V_{max} = \frac{pH_f - pH_i}{T_m}$$

V_{max} : Vitesse maximale d'acidification exprimée en mUpH/min

T_m : Temps ou intervient V_{max} (en min)

pH_i : pH initial

pH_f : pH final

3.4.3.5.2 Etude de la cinétique de croissance

La cinétique de croissance des cultures pures des souches LAB et de *Bifidobacterium* a été étudiée dans le lait reconstitué (10 %). Les prélèvements ont été effectués au moment d'inoculation et après 2, 4, 6, 8, 24, 27 et 48 h, en utilisant des dilutions décimales périodiques préparées dans une solution d'eau physiologique (0,9 %) et eau physiologique-Cystéine (0,05 %). 100 μ L des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} pour les périodes (0, 2, 4, 6 et 8 h), de 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} pour les périodes (24, 27 et 48 h) ont été ensemencé sur l'agar approprié aux souches en double essai pour chaque dilution, puis incubés aux températures appropriés. Seules les boîtes qui contiennent entre 30 et 300 colonies ont été retenu pour le dénombrement. Le nombre de colonies a été estimé en (UFC.ml⁻¹), ainsi que le taux de croissance (μ) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\mu = (\log_{10}X_t - \log_{10}X_0)/(t_t - t_0)$$

D'Où X_t et X_0 sont le nombre des colonies (UFC.ml⁻¹) à temps t_t et t_0 .

Les souches lactiques et pseudolactiques sélectionnées selon les propriétés technologiques ont fait l'objet d'évaluation de l'activité antagoniste

3.4.3.6 Etude de la résistance des souches d'intérêt aux antibiotiques

La sensibilité ou la résistance aux antibiotiques des isolats a été déterminée par la technique normalisée de diffusion selon le protocole décrit par PHILLIPS et al. [293] et ZHOU et al. [294] vis-à-vis 11 disques d'antibiotiques commerciaux : l'acide

fusidique (10 µg), l'érythromycine (15 µg), la chloramphénicol (30 µg), la pénicilline (10 U), la gentamicine (10 µg), la streptomycine (10 µg), l'ampicilline (10 µg), la céfotaxime (30 µg) (Bioanalyse, France), l'amoxicilline (25 µg) (Himedia, Inde), l'oxacilline (1 g) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), Cefalaxin (30 µg) (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h. La détermination de la sensibilité ou la résistance des bactéries s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition apparues.

Une suspension bactérienne a été préparée par le prélèvement d'une ou deux colonies caractéristiques à partir de la gélose à l'aide d'une boucle stérile qui a été ensemencée dans un bouillon stérile et incubés pendant 18 h. À l'aide d'un écouvillon stérile, la suspension a été appliquée à la surface de la gélose Mueller-Hinton, alors que les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des boîtes dans des conditions aseptiques à l'aide d'une pince stérile.

Deux souches de référence résistantes aux antibiotiques *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été testées avec la même technique que les souches tests. Les résultats ont été interprétés selon les recommandations de la Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2007) et les directives NCCLS (national comity of clinical laboratory standars). Le résultat (moyenne de 3 lecture) ont été exprimés comme sensibles (S) et résistante (R), non sensible (NS), intermédiaire (I) par mesurer précisément le diamètre de la zone claire apparaissant autour des disques avec un pied à coulisse digitale [295].

3.4.3.7 Activité antimicrobienne des souches lactiques et pseudolactiques

Ce test consiste à étudier l'activité inhibitrice des cinq bactéries lactiques et la souche pseudolactiques *Bf. bifidum* sélectionnées vis-à-vis de quatre souches indicatrices : *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

La capacité de surnageant de la souche *Bf. bifidum* en culture seule et son interaction avec les cinq souches LAB sélectionnées à inhiber la croissance des micro-organismes pathogènes a été étudiée par la méthode de diffusion en puits décrite par TAGG *et al.* [296]. L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition (zone claire) avec un pied à coulisse [297].

Une à deux colonies a été prélevée à partir des boîtes de Pétri à l'aide d'une boucle stérile, puis elles ont étéensemencées dans 5 mL de bouillon puis incubées pendant une nuit. Une culture de 18 h de chaque souche a été centrifugée à 3000xg pendant 20 min, le pH de la phase aqueuse a été ajusté à 6,5 - 7 ± 0,1 avec du NaOH 1 N puis stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre seringue 0,22 µm avant d'être utilisé pour l'essai antibactérien. Les boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) ainsi coulées avec la gélose ont été inondées avec 1 % (v/v) d'une culture de 18 h de chaque souche pathogène. Des puits de 6 mm ont été perforés dans la gélose puis 100 µL de surnageant brut stérilisé a été versé dans chaque puit. Les boîtes ont été laissées à 4 °C pendant 2 h, pour une bonne diffusion de surnageant à tester. Un puit rempli avec du bouillon nutritif stérile et un autre avec l'antibiotique tétracycline en raison de 100 µg/ml (sigma-Aldrich) pour chaque souche test ont été utilisés comme contrôle négatif et positif, respectivement. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h dans des conditions appropriées pour chaque agent pathogène spécifique. Un triple essai a été effectué pour chaque souche.

3.4.4 Etude, *in vitro* de l'activité antagoniste de la spiruline et de la chlorelle, à l'égard des espèces du microbiote intestinal

Dans cette étude nous avons isolé des bactéries de la flore intestinale résidente à partir des selles humaines. Une évaluation de l'influence de la supplémentation des milieux de cultures avec quatre différentes concentrations en *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sur les propriétés technologiques de la souche probiotique *Bf. bifidum* BHI 7 a été réalisée ainsi que sur l'activité antagoniste de cette souche à l'égard des bactéries pathogènes, et son interaction avec les souches de la flore intestinale isolées. Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition ou non des souches

pathogènes et de la flore intestinale au profil d'un enrichissement et de déterminer la meilleure concentration de supplémentation.

3.4.4.1 Isolement et identification des souches du microbiote intestinal

L'isolement d'*E. coli* a été réalisé selon le protocole de BERNARD ET REYNAUD [298]. 1 g de selle fraîche d'un nourrisson diarrhéique de huit mois a été prélevé stérilement dans 9 mL d'eau physiologique, après homogénéisation, une série de dilution a été préparée. 1 mL a été ensemencé en profondeur à partir de trois dernières dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) sur gélose Mac Conkey. Les boîtes ont été incubées à 44 °C pendant 48 h.

L'isolement des Lactobacilles a été réalisé en profondeur sur le milieu MRS, à partir des selles d'un nourrisson sain d'un âge de 6 mois et 13 jours.

Une souche de bacteroides a été procurée de laboratoire central d'hôpital Frantz Fanon et qui a été isolée à partir des selles sur gélose BBE (Bacteroides Bile Esculin Agar).

L'identification de ces trois espèces repose sur l'étude des caractères cultureux (aspect des colonies), morphologiques (examens microscopiques) et biochimiques à l'aide des galeries API 20 E.

3.4.4.2 Repiquage et revivification des souches du microbiote intestinal

La souche bifide BHI 07, souche autochtone et qui a montrée un fort potentiel probiotique de même qu'un pouvoir antagoniste à l'égard des bactéries pathogènes élevé et qui a été sélectionnée. Cette souche a été conservée à – 20 °C, puis décongelée et inoculée dans le lait écrémé reconstitué à 12 % ; puis repiquées plusieurs fois sur leur milieu sélectif d'enrichissement (MRS-Cystéine).

Les souches pathogènes ont été conservées à – 20 °C, puis décongelée et inoculée dans le bouillon nutritif enrichi en glycérol à 30%, ensuite repiquées sur gélose nutritive.

Après incubation, la pureté des souches a été confirmée par des examens macroscopiques et microscopiques (coloration de Gram) et quelques tests biochimiques.

3.4.4.3 Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sur le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance de la souche *Bf. bifidum*

Afin d'évaluer l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* ainsi que de déterminer la meilleure concentration, le pouvoir acidifiant et le taux d'accroissement de la souche *Bf. bifidum* ont été déterminés.

3.4.4.3.1 Détermination de l'acidité titrable et de pH de milieu de culture

Le pouvoir acidifiant a été déterminé selon la méthode d'ACCOLAS et al. [291]. 9 mL de lait infantile Biomil 1^{er} Âge supplémenté avec quatre différentes concentrations (1 %, 3 %, 5 % et 10 % (g/v)) de spiruline seule et de la chlorelle seule ainsi que la combinaison des deux a étéensemencé avec 1 mL d'une pré-culture de 18 h. Les tubes ont été incubés à 37 °C. Le suivi de la survie de la souche *Bf. bifidum* pendant les intervalles de temps suivants : 0 h, 2 h, 4 h, 24 h, 27 h, 48 h.

Le pH est mesuré par un pH mètre (*HANNA 210*). Tandis que l'acidité a été mesurée selon la méthode titrimétrique avec NaOH (0,1 N) en présence de l'indicateur coloré phénolphtaléine (1 %). Un triple essai a été effectué pour chaque mesure.

3.4.4.3.2 Détermination de la cinétique de croissance de la souche *Bf. bifidum*

La cinétique de croissance de la souche *Bf. bifidum* a été suivie sur le milieu MRS-Cystéine supplémenté avec quatre différentes concentrations (1 %, 3 %, 5 % et 10 % g/v) de spiruline seule et de la chlorelle seule ainsi que la combinaison. Un dénombrement a été effectué pendant les intervalles de temps suivant : 0 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h.

3.4.4.4 Etude de l'antagoniste de la souche probiotique *Bf. bifidum* à l'égard des trois souches du microbiote intestinal

L'activité antagoniste de la souche *Bf. bifidum* à l'égard des trois souches de la flore intestinale : *Escherichia coli*, *Bacteroides* sp. et *Lactobacillus* sp. a été mise en évidence par la méthode de diffusion en puit selon le protocole décrit par SCHILLINGER et FRIEDRICH-KARL [283] et TAGG *et al.* [296], dont le principe de cette méthode est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture solide pour inhiber la croissance des bactéries indicatrices [299].

3.4.4.4.1 Préparation des prés cultures

Une à deux colonies de la souche *Bf. bifidum* BHI 7 ont été repiquées dans 5 mL du bouillon MRS-Cystéine, puis les tubes ont été incubés pendant 18 h à 37 °C en anaérobiose. Tandis que les deux souches indicatrices (*Lactobacillus* sp. et *Bacteroide* sp.) ont été repiquées sur bouillon nutritif puis incubées à 37 °C et *Escherichia coli* à 44 °C pendant 18 h.

3.4.4.4.2 Méthode de diffusion sur agar

Des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre ont été coulées avec 20 mL de la gélose Mueller-Hinton, après solidification la gélose a été inondée avec 1 % (v/v) de la pré-culture de chaque souche indicatrice.

La pré-culture de *Bf. bifidum* a été centrifugée à 3000xg pendant 20 min, le pH de la phase aqueuse a été ajusté à 6,5 - 7 ± 0,1 avec du NaOH 1 N puis stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre seringue 0,22 µm avant d'être utilisé pour l'essai antibactérien.

Des puits de 6 mm ont été creusés dans la gélose, puis 100 µL de surnageant stérilisé a été versé dans chaque puit. Les boîtes ont été laissées à 4 °C pendant 2 h, pour une bonne diffusion de surnageant à tester. Pour chaque souche test, un contrôle négatif a été utilisé, donc un puit a été rempli avec 100 µL de surnageant de la pré-culture de *Bf. bifidum* cultivée sur bouillon MRS-Cystéine seul. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h dans des conditions appropriées pour chaque agent pathogène spécifique. Un triple essai a été effectué pour chaque souche.

3.4.4.5 Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sur l'interaction des espèces isolées du microbiote intestinal

Afin d'évaluer l'effet de la supplémentation avec les deux micro-algues sur l'interaction entre les quatre souches de la flore intestinale résidente isolées et identifiées, nous avons utilisé la méthode de détermination de taux d'inhibition et de croissance des espèces après interaction par la méthode de culture mixte.

3.4.4.5.1 Préparation des pré-cultures bactériennes

La souche *Bf. bifidum* a été repiquée dans du bouillon MRS-Cystéine supplémenté avec quatre différentes concentrations (1 %, 3 %, 5 % et 10 % g/v) de spiruline seule et de la chlorelle seule ainsi que la combinaison des deux, puis incubée à 37 °C pendant 18 h en anaérobiose. Tandis que les trois autres souches ont été repiquée dans du bouillon nutritif supplémenté, puis incubées à 37 °C pendant 18 h en anaérobiose.

3.4.4.5.2 Détermination de la charge des espèces intestinales après l'interaction par la méthode de culture mixte (co-culture)

Cette méthode a été évaluée dans le cadre d'estimer le nombre des bactéries cibles par dénombrement, après interaction entre eux. Le protocole qui a été utilisé est celui qui a été décrit par METLEF [300].

5 mL de bouillon nutritif supplémenté en avec quatre différentes concentrations (1 %, 3 %, 5 % et 10 % g/v) de spiruline seule et de la chlorelle seule ainsi que la combinaison des deux a été inoculé avec 1 mL de chaque souche indicatrice. Après incubations des tubes à 37 °C, un dénombrement a été effectué pendant les intervalles de temps : 0 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h et 192 h. Un témoin négatif (bouillon nutritif seul inoculé) a été lancé en parallèle. L'analyse a été effectuée en triple essais.

3.4.5 Etude, *in vivo* de l'influence de la spiruline et de la chlorelle seule et en association sur la prolifération et la diversification du microbiote intestinal des lapereaux

Cette étude a été mise en place en mois d'Avril au mois de mai 2016 avec pour but d'évaluer l'effet des deux suppléments : *Spirulina* et *Chlorella* sur la prolifération de la souche *Bifidobacterium* à potentiel probiotique ainsi que sa survie à l'égard de la souche pathogène *Escherichia coli* responsable d'une gastroentérite chez les lapins en croissance, tout en assurant les bonnes performances zootechniques.

L'étude *in vivo* a été exécutée dans l'animalerie du laboratoire de recherche d'hygiène et pathologie animale de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret, les analyses chimiques ont été menées dans le laboratoire de Contrôle de qualité alors que les coupes histologiques dans le service d'Anatomie pathologie de l'Hôpital Frantz Fanon, Blida.

3.4.5.1 Condition d'élevage des lapins

Les animaux ont été hébergés dans une pièce convenablement aérée, à température de (18 – 21 °C), humidité relative (41,9 % - 73,4 %) et soumises à un cycle de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. Ils ont été logés individuellement dans des cages métalliques (0,29 × 0,48 × 0,80 cm) à température et lumière contrôlée (Figure 1.1 en appendice I).

Les cages sont faites de fil galvanisé net et équipés de mangeoires et buveurs automatique (tétines). La distribution d'aliment s'est effectuée en une seule fois par jour entre 9 et 10 h du matin. L'eau était renouvelée tous les jours.

3.4.5.2 Régimes alimentaire expérimentaux

Les animaux ont été admis pendant une semaine pour s'adapter au régime alimentaire en granulé en diminuant graduellement la nourriture fournie par le fournisseur de lapin. Afin d'obtenir une alimentation équilibrée dans son contenu en énergie et en nutriments, la composition chimique et la teneur en énergie de la matière de la spiruline et de la chlorelle ont été préalablement analysés (tableau 3.2).

Quatre régimes expérimentaux granulés iso-nitrogène, iso-énergétique, iso-fibres ont été utilisés dans le cadre de cette étude. Un régime de contrôle, il a été désigné par l'abréviation (C) dans la suite de l'étude, trois autres régimes supplémentés en microalgues : le premier contenant 5 % de spiruline (S), le second contenant 5 % de Chlorelle (CH), le troisième contenant 2,5 % de spiruline + 2,5 % de Chlorelle (SCH).

Les matières premières qui ont servi à la fabrication de ces régimes alimentaires sont présentées dans le tableau 3.2. Après le broyage et le mélange des ingrédients, les aliments obtenus ont été granulés (Figure 2.I en appendice I). La granulation des rations a été retenue dans le cadre de cette étude pour éviter le tri des particules alimentaires par les animaux. Le lapin a en effet un comportement alimentaire qui le conduit à trier entre les particules alimentaires lorsque les aliments sont distribués en l'état, sans broyage, mélange et granulation. La granulation permet de maîtriser les proportions des différents constituants alimentaires ingérés par l'animal ce qui permet de déterminer la digestibilité de chaque constituant alimentaire avec plus de précision que lorsque les aliments sont distribués en l'état. L'aliment une fois fabriqué est stocké dans des sacs.

Chaque régime alimentaire a été attribué à un lot d'animaux de façon aléatoire. Durant cette expérimentation, les animaux n'ont reçu aucun médicament.

Tableau 3.2 : Formulations des régimes expérimentaux

Ingrédients (%)	Régime de contrôle	Régime suppl. 5 % spiruline	Régime suppl. 2,5 % spiruline + 2,5 % chlorelle	Régime suppl. 5 % chlorelle
Blé dur	20	22,5	22,5	22,5
Son gros	40	40	40	40
Tourt. Soja	11	5	5	5
Paille	6	5	5	5
Luzerne	20	19,5	19,5	19,5
CMV ¹	3	3	3	3
Spiruline	0	5	2,5	2,5
Chlorelle	0	0	0	5

¹ : Vitamines : A : 1,200,000 UI/kg ; D3 : 300,000 UI/kg ; E : 3,340 mg/kg ; B1 : 140 mg/kg ; ; B2 : 350 mg/kg ; Panthoténate de calcium : 1050 mg/kg ; PP (Niacim) : 2100 mg/kg ; B 12 : 2 mg/kg ; B 6 : 280 mg/kg ; K 3 : 175 mg/kg ; Acide folique : 70 mg/kg ; Chlorure de choline : 35000 mg/kg ; Biotine : 2 mg/kg, oligo-éléments: I : 7000 mg/kg ; Sélénium : 4100 mg/kg ; Manganèse : 2500 mg/kg ; Cu²⁺: 2200 mg/kg; I- : 40 : 9600 mg/kg ; Mn²⁺ : 400 mg/kg ; Co²⁺ : 40; Se : 10 mg/kg; coccidiostatique: robénidine (E 758) : 13,200 mg/kg ; (support: carbonate de calcium)

3.4.5.3 Lots expérimentales

Les trente-six lapereaux de 35-40 jours d'âge, de race papillons et de même sexe ont été répartis sur six lots expérimentaux (tableau 3.3). Les lapereaux ont été soumis à une période d'adaptation de 7 jours.

Tableau 3.3 : Répartition des lapereaux dans les lots expérimentaux

Lots	Expérimentations
Lot 1	06 lapereaux sous régime de contrôle (C) (Groupe contrôle)
Lot 2	06 lapereaux inoculés avec 1 mL d'une préculture de <i>Bf. bifidum</i> BHI 7, infectés et soumis au régime contenant 5 % de spiruline (S)
Lot 3	06 lapereaux inoculés avec 1 mL d'une préculture de <i>Bf. bifidum</i> BHI 7, infectés et soumis au régime contenant 2,5 % de spiruline et 2,5 % de Chlorelle (CHS)
Lot 4	06 lapereaux inoculés avec 1 mL d'une préculture de <i>Bf. bifidum</i> BHI 7, infectés et soumis au régime contenant 5 % de Chlorelle (CH)
Lot 5	06 lapereaux inoculés avec 1 mL d'une préculture de <i>Bf. bifidum</i> BHI 7, infectés, traités par antibiotique et soumis au régime de contrôle (C).
Lot 06	06 lapereaux inoculés avec 1 mL d'une préculture de <i>Bf. bifidum</i> BHI 7, infectés, non traités et soumis au régime de contrôle (C).

3.4.5.4 Analyses chimiques des régimes expérimentaux

Les analyses des suppléments (spiruline, chlorelle) ainsi que celles des régimes expérimentaux ont été effectuées en triple essais à l'aide de méthodes de l'AOAC (2000) pour déterminer les concentrations de la matière sèche (934.01), les protéines bruts (ISO 5983-2), la matière grasse (ISO 6492), ainsi que une analyse de quelques minéraux (Ca, P, K, Na, Fe) et métaux lourds (Pb, Cd) par SAA (Agilent Technologies 200 Séries AA) (999.10).

3.4.5.5 Inoculation des lapins avec la souche test *Bf. bifidum* et provocation de l'infection expérimentale par *Escherichia coli*

Le repiquage des colonies de la souche d'*Escherichia coli* a été fait sur le bouillon nutritif, tandis que la souche *Bifidobacterium bifidum* sur le bouillon MRS-cystéine puis incubés à 44 °C et 37 °C respectivement pendant 18 h. Le jour d'administration des souches par voie per-os, la culture bactérienne est diluée dans la solution saline de phosphate (PBS) stérile pour obtenir la concentration désirée. Les lapins sont inoculés avec 1000 µL de la dilution bactérie contenant 2,0 Log UFC/mL [301].

Alors 7^{ème} jour (j₇), nous avons administré aux 06 lapins des lots (2, 3, 4, 5 et 6) par voie per-os, 1 mL d'inoculum de *Bf. bifidum* et durant 7 jours (J₇ au J₁₃). Les lapereaux des lots (2, 3, 4, 5 et 6) ont subits une provocation d'infection par voie per os (une administration orale d'une préculture de 18 h d'*E. coli*) en utilisant une seringue après 48 h d'inoculation avec la souche bifide. L'infection est induite avec l'administration de 1 mL de *E. coli* contenant 10⁸ UFC / ml en suspension dans une solution saline tamponnée phosphate (PBS, pH 7,3) et cela pendant 48 h (J₉ et J₁₀). Les lapereaux du lot 1 (Témoin) ont subis une administration de 1 mL de PBS durant la période J₇ au J₁₄.

Les lapereaux du lot 5 ont été traités par 1 mL/ 12 Kg par voie *per-os* de l'antibiotique (tétracycline) après 48 h de provocation d'infection.

3.4.5.6 Suivi des paramètres zootechniques et sanitaires

3.4.5.6.1 Performance de croissance

La croissance pondérale a été suivie par la pesée des animaux, une fois par semaine, jusqu'à la fin de l'expérience. En raison de l'agitation des animaux, leur pesée a nécessité l'utilisation d'un récipient pour les maintenir tranquilles sur la balance (Figure 3.I en appendice I).

- La vitesse de croissance représente le gain de poids (GP), elle a été mesurée chaque semaine selon la relation suivante :

$$GP = Poids\ final - Poids\ initial$$

- La consommation moyenne quotidienne (CMQ) représente la quantité d'aliment ingérée journalier par lapin durant toute la période d'essai, elle est exprimée en $\text{g.J}^{-1}.\text{lapin}^{-1}$. Elle a été mesurée chaque jour selon la relation suivante :

$$CMQ = Q_{te. d'aliment distribué} - Q_{te d'aliment refusé}$$

Lors du calcul de PA, on a supposé que les lapins morbides n'ont pas consommé les granules pendant les 2 jours précédant leur mort.

- La conversion alimentaire (CA) correspond à la quantité d'aliment nécessaire pour obtenir un gramme de poids vif, c'est le rapport de la consommation sur le gain du poids.

$$CA = \frac{CMQ}{GP}$$

Le GP, CMQ et la conversion alimentaire ont été corrigées pour les animaux morts.

3.4.5.6.2 Suivi de la santé

Pour l'aspect sanitaire, un contrôle de mortalité quotidien des animaux a été effectué tout au long de l'expérimentation. Lors de ce contrôle, les animaux dont la mort était récente ont été autopsiés pour décrire les symptômes et lésions au niveau du tube digestif. En fonction des lésions observées, des prélèvements ont été effectués pour des analyses chimiques, bactériologiques et histologiques.

Un contrôle de morbidité a été également effectué à l'occasion de chaque pesée des animaux, soit une fois par semaine. Ce contrôle a consisté en un examen global de l'animal (vif ou prostré), suivi par la recherche de signes cliniques caractéristiques de troubles digestifs. Parce que les signes cliniques comme la diarrhée, la constipation ou la présence de mucus dans les fèces ont été difficilement identifiables dans cette étude et aussi parce que les animaux étaient en phase de croissance, nous avons considéré comme malades les sujets qui présentaient un trouble de la croissance ponctuel, matérialisé par une croissance nulle ou une perte de poids entre deux pesées consécutives. Ce critère est d'ailleurs utilisé chez le lapin

en croissance en complément aux critères classiques de morbidité (Appendice J) [302].

Les Lapins souffrant de diarrhée et/ou avec un GP négatif ou très faible durant une période de 1 semaine ont été considérés comme morbides. Lorsque le même sujet a été enregistré avec diarrhée à plusieurs examens ultérieurs, la morbidité a été enregistrée qu'une seule fois dans le même délai [303].

3.4.5.6.3 Mesure de l'ingestion et de la digestibilité

La digestibilité a été déterminée en suivant les lignes directrices de la méthode de référence européenne de mesure de la digestibilité *in vivo* spécifique pour le lapin, selon le protocole de PEREZ *et al.* [304]. Dans cette expérimentation, 06 lapins par lot ont fait objet pour la mesure de la digestibilité pendant quatre périodes successives : 1 à 7 jours, de 8 à 14 jours, 15 à 22 jours et 23 à 28 jours d'âge. La collecte de fèces a durée 4 jours, la première collecte a été précédée d'une période d'adaptation de 7 jours. Les fèces étaient collectées, en totalité pour chaque animal et chaque jour durant quatre jours consécutifs, congelées à – 20 °C et accumulées pour chaque animal dans un même sachet plastique, conservé à – 20 °C jusqu'à analyse.

Parallèlement, les quantités d'aliment distribuées et les refus ont été pesés chaque jour. Pour le calcul des quantités d'aliment effectivement consommées par les animaux, il a été tenu compte du gaspillage d'aliment. Les mangeoires utilisées au cours de cette expérimentation ont occasionné un gaspillage important d'aliment sur les litières si bien que la pesée quotidienne de la quantité d'aliment gaspillée n'a été possible qu'après le tri de toutes les crottes.

En raison de la quantité énorme de travail, nous avons opté pour la détermination du taux de MS moyen du gaspillage de chaque animal sur 4 jours au cours de la première période de mesure. Pour cela, nous avons pour chaque lapin collecté tous les jours tout l'aliment gaspillé, cumulé sur 4 jours et déterminé le taux de MS sur ce cumul. Ces taux de MS ont été ensuite utilisés pour les différents calculs sur toute la période de l'étude.

Les pesées de l'aliment distribué, des refus et des aliments gaspillés pendant les périodes de mesure de digestibilité ont permis de déterminer l'ingestion sur ces 3 périodes de 15 jours chacune. L'indice de consommation (IC) a été également calculé sur ces périodes à partir de ces valeurs.

Pour les différents calculs de digestibilité et d'ingestion, le taux de MS a été déterminé sur les aliments et les fèces. Pour les aliments, nous avons prélevé un échantillon de chaque aliment granulé pour en déterminer la teneur en MS, sur le produit granulé tel quel, sans broyage, à partir d'un échantillon en triple essais d'au moins 10 g (à 103 °C pendant 24 h).

Pour les fèces, la totalité des crottes de chaque lapin conservées à – 20 °C a été séchée pendant 24 h à 80 °C puis pesée. La moitié a été ensuite séchée complètement à 103 °C pendant 24 h, et pesée (puis jetée). Ensuite, l'autre moitié (séchée seulement à 80°C et partiellement) a été conservée après broyage, dans des flacons étanches, pour des analyses chimiques ultérieures.

La quantité de MS des fèces est donnée par la formule :

$$QMS = (P_1 - T) \times ((P_3 - T)/(P_2 - T))$$

T = poids vide du plateau de pesée,

P₁ = poids du plateau + poids total des fèces séchés à 80 °C,

P₂ = poids du plateau + poids de la moitié des fèces séchés à 80 °C,

P₃ = poids du plateau + poids de la moitié des fèces séchés à 103 °C.

En raison de probables imprécisions sur la détermination du gaspillage, les valeurs d'ingestion donc de digestibilité obtenues dans cette expérimentation semblent avoir été surestimées.

3.4.5.7 Etude des paramètres du système digestif

Des paramètres physiques, chimiques et microbiologiques du tube digestif ont été étudiés pendant deux sacrifices. Au jour J₂₁ et J₃₀ deux lapins pour chaque lot et chaque sacrifice ont été sélectionnés au hasard pour les prélèvements. Les animaux ont été pesés puis euthanasiés le matin par saignée par la veine jugulaire.

Après avoir sacrifié le lapin, l'ensemble du tube digestif a été prélevé et pesé plein (Figure 4.I en appendice I). Ensuite, chaque compartiment (estomac, intestin grêle, caecum, côlon proximal et côlon distal) a été sectionné après avoir été ligaturé aux deux extrémités, puis pesé plein. Pour l'ensemble des compartiments digestifs, le pH a été mesuré par l'insertion d'une électrode (pH-meter *HANNA*) dans le digesta à travers une petite incision. Enfin, chaque organe a été vidé, le contenu pesé et des échantillons d'environ 60 g du contenu ont été prélevés pour la mesure du taux de MS. Pour le caecum, des échantillons ont été prélevés pour étudier les communautés bactériennes présentes.

3.4.5.7.1 Prélèvement des échantillons

Un gramme de matière fécale de chaque lapin a été prélevé et dilué dans des conditions aseptiques dans des tubes stériles de 9 mL de la solution saline à 0,9 % et mixé à l'aide d'un vortex (Figure 4.I en appendice I). Les prélèvements ont été effectués avant l'administration de la souche probiotique BHI 7 et la provocation de la gastroentérite c-à-dire au J₇ afin de déterminer les germes résidents dans le tractus intestinal et contrôler surtout la présence des bifidobactéries puis tous les 7 jours J₁₄, J₂₁ et J₂₈. Ainsi qu'à partir du contenu caecal après l'autopsie des cadavres ou des sujets sacrifiés en vue d'une analyse bactériologique et du contenu stomacal pour la détermination de la matière sèche.

Le tractus gastro-intestinal a été retiré de la carcasse, des fragments de 1 à 2 cm de trois différentes parties de l'intestin (Duodénum, jéjunum et l'iléon) ont été prélevés ainsi qu'à partir d'estomac et conservés dans un liquide de fixation (formol 10 %) (Figure 6.I en appendice I).

3.4.5.7.2 Méthodes d'analyses chimiques et microbiologiques

3.4.5.7.2.1 Analyses chimiques

Le taux de MS (24 h à 103 °C) des fèces et les contenus digestifs.

3.4.5.7.2.2 Analyses microbiologiques

Afin d'étudier l'effet des différents traitements sur la diversification de la flore intestinale et la prolifération de la souche bifide inoculée ainsi que sur la souche pathogène, des prélèvements à partir des fécès et du contenu caecal ont été

effectués sur trois lapereaux de chaque lot. Les souches suivantes ont été dénombrées : germes aérobies mésophiles sur gélose PCA, *Lactobacillus* sur gélose MRS, *Bifidobacterium* sur gélose MRS additionnée de 0,05 % de cystéine et d'acide nalidixique 2 mg/l, *Streptococcus* sur gélose M17, *Escherichia coli* sur gélose Mac Conkey, *Salmonella* sur gélose Shigella-Salmonella (SS), *Clostridium* sur gélose TSC.

Après incubation les colonies sont dénombrées sur les boîtes présentant entre 30 et 300 colonies. Après avoir réalisé une moyenne arithmétique pour chaque milieu de culture, les résultats sont rapporté au nombre d'unités formant colonies par gramme de fèces (UFC/g). Les bactéries ont été comptées toutes les semaines, avant, pendant et après traitements pendant 30 jours.

3.4.5.8 Etude histologique

Pour étudier l'impact des différents traitements sur la structure histologique de la muqueuse intestinale, nous avons disséqué les lapins après 14 jours d'inoculation avec la souche probiotique BHI 7 et 12 jours post-infection ainsi qu'après 21 jours. Deux lapins par lot ont été sacrifiés (figure 5.I en appendice I). Le tractus gastro-intestinal a été retiré de la carcasse, des fragments de 1 à 2 cm de trois différentes parties de l'intestin (Duodénum, jéjunum et l'iléon) ont été prélevés ainsi qu'à partir d'estomac et conservés dans un liquide de fixation (formol 10 %). La fixation a pour but de la conservation des structures et le durcissement des tissus. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans du liquide fixateur (formol 10 %) (Figure 6.I en appendice I).

3.4.5.8.1 Préparation des coupes histologiques

La préparation a été réalisée selon les étapes de réalisation suivantes recommandées par HOULD (1998) :

L'inclusion a pour but la réalisation de coupes histologiques. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (Leica ASP 6025) (par immersion dans des bains d'alcool), puis est immergé dans des bains de toluène (un solvant de la paraffine), puis est infiltré par la paraffine fondue par chauffage avant être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue (Figure 7.I en appendice I). Après

refroidissement, on obtient d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 2135) (Figure 8.1 en Appendice I) d'obtenir des tranches de section (coupes histologiques) de 2 à 5 micros d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

Les colorations des tissus réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour pouvoir reconnaître différents éléments du tissu. La coloration par l'hématoxyline et l'éosine.

Le montage, les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. Enfin, on passe par l'observation du tissu à l'aide d'un microscopique.

3.4.5.9 Risque sanitaire

Au cours de l'expérimentation, l'état de santé des lapins a été suivi par jour pour la détection de la morbidité et de mortalité. Les critères utilisés pour identifier la morbidité était la constatation des troubles digestifs (signes de diarrhée) et/ou des troubles graves de l'association de la prise alimentaire à un GPQ négatif ou très faible durant une période d'une semaine. À chaque période, moyenne GPQ moins deux fois l'écart était la valeur de seuil sous lequel GPQ était considéré comme minime. L'indice de risque sanitaire (SRI) est alors définie comme la somme de morbidité et de mortalité [305] pour chaque période, sachant que chaque animal a été déduit qu'une seule fois et classé soit comme mort ou morbide.

3.4.6 Analyses statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (ET). Les données ont été analysées statistiquement avec le logiciel IBM SPSS Statistique 22.0 pour Windows. L'analyse de la variance ANOVA à un facteur a été effectuée pour identifier les différences entre le contrôle et les différents tests, suivie du test de Dunnett / Tukey pour les comparaisons multiples. Les valeurs de $p = 0,05$ ont été considérées statistiquement significatives.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Résultats de l'analyse nutritionnelle de la spiruline et de la chlorelle

Les résultats obtenus de la caractérisation physicochimique des deux poudres de microalgue *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sont représentés dans le tableau 4.1.

La composition des deux microalgues étant sujette à des variations en fonction des conditions de culture et des techniques de production.

4.1.1 pH

Nous avons remarqué que le pH des poudres des deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* reconstituées est de l'ordre de $7,8 \pm 0,02$ et $7,3 \pm 0,03$, respectivement. Il s'agit d'un pH légèrement basique, étant donné que ces deux algues sont cultivées dans des milieux alcalins.

4.1.2 Acidité titrable

Nous avons observé que l'acidité titrable des poudres des deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* est de $0,11 \pm 0,01$ et $0,12 \pm 0,01$ % d'acide acétique, respectivement.

4.1.3 Teneur en eau

Nous avons observé que le taux d'humidité des poudres d'algue *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* est de $5,8 \pm 0,3$ % et $5,36 \pm 0,5$ %, respectivement. Ces teneurs sont proches de ceux trouvées par TOKUŞOĞLU Ö. *et al.* [148] qui variaient entre $3,11 \pm 0,05$ % et $4,08 \pm 0,02$ % dans la spiruline et $3,87 \pm 0,04$ % dans la chlorelle et qui sont conformes aux recommandations générales de qualité (< 10 %) [178].

Tableau 4.1 : Caractérisation nutritionnelle des deux poudres algales *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

Indices physico-chimiques	<i>S. platensis</i>	Normes	<i>C. pyrenoidosa</i>	Normes
pH à T = 22°C	7,8 ± 0,02	6,71 – 6,91 [262]	7,3 ± 0,03	-
Acidité titrable (% d'acide acétique)	0,11 ± 0,01	0,16 – 0,24 [262]	0,12 ± 0,01	-
Humidité (%)	5,8 ± 0,3	3,11 – 4,08 [148] < 10 % [178]	5,36 ± 0,5	3,87 [148] < 10 % [178]
Valeur énergétique (kJ.g ⁻¹)	1362,5 ± 0,92	1562,22 – 1582,41 [148]	1475,97 ± 0,55	1427,3 [148]
Matière grasse (g/100 g MS)	8,70 ± 0,46	7,09 - 8,03 [148]	8,98 ± 0,33	13,32 [148]
Taux de cendres (%)	6,12 ± 0,28	7,43 – 10,83 [148]	6,24 ± 0,32	6,3 [148]
Protéines (g/ 100 g)	57,7 ± 1,6	61,32- 64,43 [148]	63 ± 0,95	47,82 [148]
Glucides (g/ 100 g MS)	15,3 ± 0,7	15,09 – 15,81 [148]	13,69 ± 0,38	8,08 [148]

4.1.4 Taux de protéine

Il ressort de ces résultats que le taux de protéine des poudres d'algue *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* est de $57,7 \pm 1,6$ g / 100 g et $63 \pm 0,95$ g / 100 g de poids ses. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par TOKUŞOGLU Ö. *et al.* [148] et BECKER [306].

4.1.5 Taux de la matière grasse

Il ressort de ces résultats que le taux de la matière grasse des poudres d'algue *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* est de $8,70 \pm 0,46$ g/100 g et $8,98 \pm 0,33$ g/100 g, respectivement.

Selon TOKUŞOGLU Ö. *et al.* [148], la teneur en lipides totaux dans les trois souches de spiruline testées a variée entre 7,09 et 8,03 % alors que pour la chlorelle, la teneur été de l'ordre de 13,32 %.

Ces deux microalgues peuvent se vanter de faire partie des sources de protéines les moins grasses. Cette caractéristique lui donne l'avantage de se conserver assez aisément en étant à l'abri des phénomènes d'oxydation des lipides et de rancissement [148].

4.1.6 Taux de cendre

Il ressort de ces résultats que le taux des cendres des poudres d'algue *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* est de $6,12 \pm 0,28$ et $6,24 \pm 0,32$ %, respectivement. Ces résultats sont proches de ceux trouvés par TOKUŞOGLU Ö. *et al.* [148] qui ont reportés que les teneurs en cendres totaux variaient entre 7,43 % et 10,38 % dans la spiruline et 6,30 % dans la chlorelle. Ce pourcentage est lié fort probablement au pouvoir d'absorption des métaux par cette souche dans les milieux de culture utilisés et ce qui a été souligné par plusieurs auteurs [307, 308].

4.1.7 Taux des glucides

Nous avons observé que la teneur en glucides des poudres d'algue *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* a été de $15,3 \pm 0,7$ et $13,69 \pm 0,38$ g / 100 g de poids ses. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par TOKUŞOGLU Ö. *et al.* [148] dans la spiruline dont la teneur a variée entre 15,09 % et 15,81 % par contre dans la chlorelle, elle été de 8,08 % ce qui est inférieur à nos résultats. Cette différence peut être due aux conditions de culture.

4.1.8 Valeur calorique

Les valeurs caloriques de *S. platensis* et *C. pyrenoidosa* ont été de l'ordre de $1571,6 \pm 0,92 \text{ kJ.g}^{-1}$ (soit $369,5 \text{ kcal.g}^{-1}$), $1644,97 \pm 0,55 \text{ kJ.g}^{-1}$ (soit $387,58 \text{ kcal.g}^{-1}$), respectivement. La valeur calorique de la biomasse micro-algale dépend de la teneur en lipides. Les deux microalgues d'étude ont des faibles teneurs en lipides seulement 8,70 et 8,98 %, respectivement, ce qui était la raison de leurs faibles valeurs caloriques. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par TOKUŞOĞLU Ö. *et al.*[148] dont la valeur énergétique de la spiruline a varié entre 1562,22 et 1582,41 kJ/g tandis que pour la chlorelle a été de 1427,30 kJ/g, ce qui est plus bas de nos résultats vu à la teneur en protéine de 47,82 % ce qui est inférieur à nos résultats trouvés (tableau 4.1).

4.1.9 Teneur en éléments minérales et métaux lourds par SAA

Les résultats d'analyses de la composition minérale et les métaux lourds des poudres algales de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sont représentés dans les tableaux 4.2 et 4.3.

Tableau 4.2 : Teneur en minéraux des deux poudres algales *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

	Compositions en minéraux (mg/100 g)						
	Na	Ca	K	Mg	Cu	Fe	Zn
SP	2035,68	1816,12	4190,12	344,06	7,25	55,45	1,00
CH	500,39	1041,21	4683,49	433,84	41,65	81,39	3,78

Tableau 4.3 : Teneur en métaux lourds des deux poudres algales *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

	Compositions en métaux lourds (mg/100 g)	
	Pb	Cd
SP	0,07	0,003
CH	0,01	0,002

Il ressort de ces résultats que la teneur en minéraux (Na, Ca, K et Mg) est relativement élevée, ainsi qu'oligoélément tel que le fer 550,45 (mg/Kg) chez la spiruline et 810,39 (mg/ Kg) chez la chlorelle.

La spiruline est connue par sa richesse en fer qui peut varier entre 0,55 et 6 mg/g MS [152]. Il est aussi rapporté que le fer de la spiruline est mieux absorbé que celui de la viande [309], ce qui révèle très intéressante pour améliorer les anémies ferriprives liées aux malnutritions protéino-énergétiques.

Les teneurs en zinc pour les des poudres d'algue *S. platensis* et *C. pyrenoidosa* sont de 10 et 30,77 (mg/ Kg), respectivement, tandis que pour le cuivre sont de l'ordre de 70,25 et 410,65 (mg/ Kg), respectivement.

Concernant les deux métaux lourds (plomb et cadmium), les poudres d'algue *S. platensis* et *C. pyrenoidosa* sont à l'état de trace (tableau 4.3).

Plusieurs études ont été effectuées et ayant rapportées l'utilisation de la spiruline comme agent bio-adsorbant des métaux [310, 311].

Toutefois, les micro-algues photosynthétiques comprennent des fonctions carboxyles sulfates et d'autres fonctions ionisables qui permettent la fixation ionique ou chimique de molécules (cas de la plupart des oligo-éléments et des métaux essentiels). Mais les métaux toxiques comme le plomb et le mercure sont aussi concernés par ce phénomène de séquestration. Et c'est la raison pour laquelle il est important de réaliser un contrôle sur les teneurs en métaux lourds des microalgues destinées à l'alimentation humaine [262].

Les teneurs en minéraux de ces deux microalgues sont suffisantes pour satisfaire les apports journaliers recommandés pour un adulte. Selon USDA (Département d'Agriculture des Etats Unis) [312], l'apport journalier recommandé (AJR) pour le calcium (Ca) est de 1000 mg/jour pour un homme et femme adulte, 800 mg/jour pour un enfant (4-8 ans) alors qu'il est de 270 mg/jour pour un nourrisson (7 -12 mois). Une consommation de 55,06 g/jour et 96,04 g/jour de spiruline et de chlorelle, respectivement peut couvrir les besoins quotidiens d'un adulte.

L'AJR pour le potassium (K) est de de 2000 mg/jour pour un homme et femme adulte, 1600 mg/jour pour un enfant alors qu'il est de 500 à 700 mg/jour pour un nourrisson [312]. Une consommation de 47,73 et 42,70 g/jour de spiruline et de chlorelle, respectivement peut couvrir les besoin quotidien d'un adulte.

Une consommation de 122,07 et 96,81 g /jour de de spiruline et de chlorelle, respectivement peut couvrir les besoin quotidien d'un adulte homme (420 mg/jour), tandis qu'une femme adulte a besoin de consommer 93 g et 73,76 g/jour de de spiruline et de chlorelle, respectivement pour couvrir ses besoins (320 mg/jour) [312].

Une consommation de 18,03 g de spiruline et 12,29 g de chlorelle peut couvrir les besoins d'un adulte homme (AJR = 10 mg/jour), tandis que 21,64 g de spiruline et 14,74B g de chlorelle sont nécessaire pour couvrir les besoins d'une femme adulte (12 mg/jour) [312].

4.1.10 Résultats du profil des acides gras dans les deux poudres de microalgue

Les acides gras des extraits hexanique des deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* ont été analysé par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS). Les figures 4.1 et 4.2 ainsi que les tableaux 4.4 et 4.5 illustrent le profile et les pourcentages des composants identifiés dans chaque extrait.

Six composants ont été identifiés dans l'extrait hexanique de la spiruline (tableau 4.4). Le composant majoritaire été : l'acide palmitique (C16:0) avec 12,3% suivi par l'acide linoléique (C18 :2 $\Delta^{9,12}$) avec 6,04 % et l'acide oléique (C18:1 Δ^9) avec 4,25 %, puis l'acide stéarique (C18 :0) avec 1,22 % et l'acide α -linoléique (ALA) (C18 :3 $\Delta^{9,12,15}$) avec 1 % tandis que l'acide palmitoléique (C16 :1 Δ^9) n'a pas excédé 0,62 %. Plusieurs études ont rapportés des profils similaires à nos résultats [313].

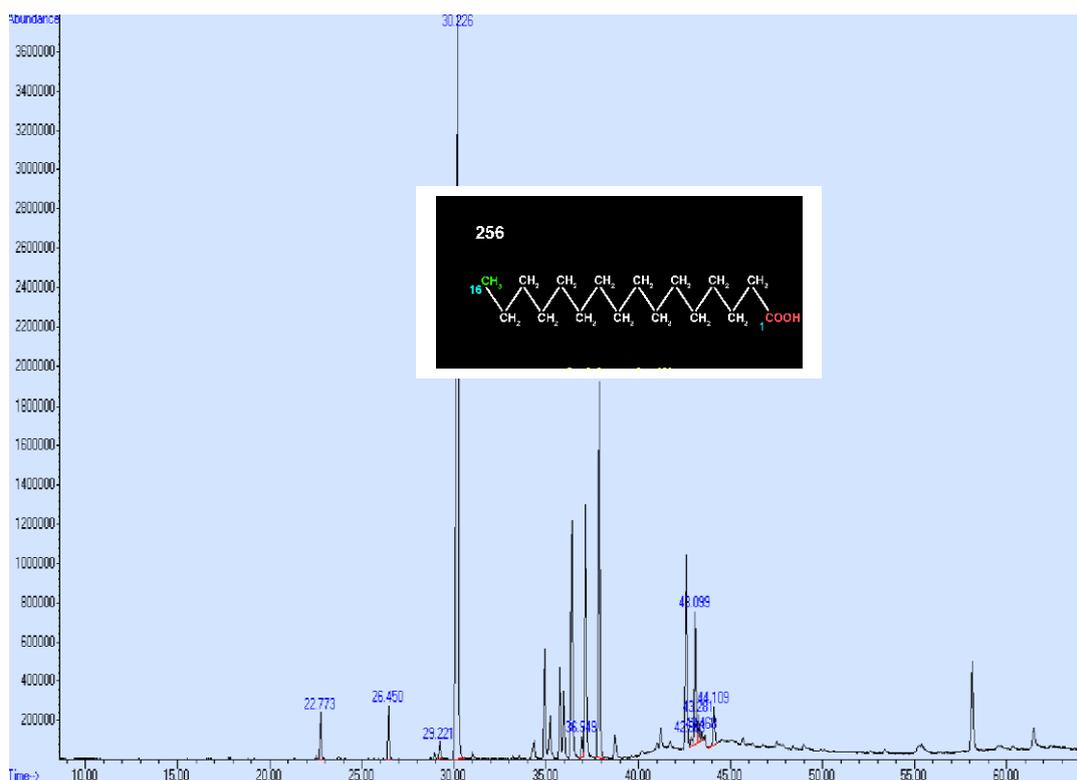


Figure 4.1 : Profile des acides gras de l'extrait hexanique de *Spirulina platensis*

Douze composants ont été identifiés dans l'extrait hexanique de la chlorelle (tableau 4.5). Le composant majoritaire été : l'acide α -linoléique (ALA) (C 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) avec 13,91 % suivi par l'acide linoléique (C 18:2 $\Delta^{9,12}$) (AL) avec 13 % et l'acide palmitique (C16:0) avec 11,83 %. Nous avons constaté aussi des teneurs importantes en 7,10 acide hexadécanoïque (C16:2) avec 4,18 %, l'acide stéarique (C18:0) avec 2,19 % et l'acide oléique (C18:1) avec 1,35 %. Ainsi que certains acide gras saturés comme : acide margarique (anteisoneptadécanoïque) (C17:0) (0,84 %), l'acide pentadécyle (C15 :0) (0,25 %), l'acide tridéconoïque (C13 :0) et l'acide laurique (C12 :0) avec 0,08 % et l'acide Lignocérique (C24 :0) et l'acide Eicosanoïque EPA avec 0,07 et 0,06 %, respectivement.

D'après nos résultats, nous avons constaté une différence significative ($p < 0,05$) dans les teneurs en acides gras dans les deux espèces.

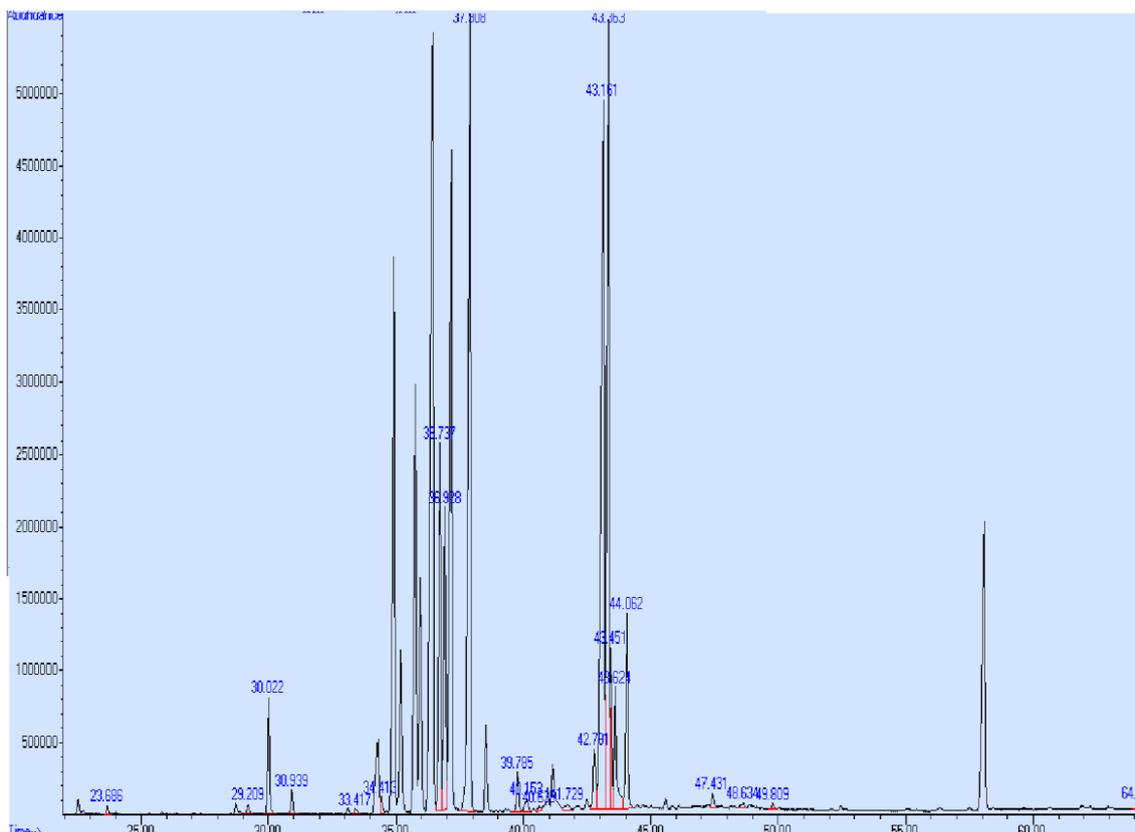


Figure 4.2 : Profile des acides gras de l'extrait hexanique de *Chlorella pyrenoidosa*

Plusieurs études antérieures ont rapportés des profils d'acide gras de *Chlorella* sp. Selon RUPESH KUMAR B. *et al.* [314], le profil des EMAG (Ester Méthylique des Acide Gras) ou FAME (Fatty Acid Methyl Ester) d'algue verte *Chlorella* sp. par GC-MS a montré que l'acide oléique, l'acide palmitique et l'acide linoléique sont les composants majoritaires avec 64,08, 14,71 et 8,33 %, respectivement. Tandis que MONIKA *et al.*, [315] ont rapporté un profil des EMAG de *C. pyrenoidosa* sous des conditions d'autotrophie dont le composant majoritaire est l'acide palmitique (14,3 %) suivi par l'acide linoléique (8,7 %).

Tableau 4.4 : Composition en ester méthylique en acide gras de l'extrait hexanique de *Spirulina platensis*

Pics	Temps de rétention	Surface (%)	Noms du composé	formule chimique	Poids Moléculaire	% de probabilité
01	36,950	0,616	Ester méthylique acide 9-Hexadécanoïque	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	268,24	98
02	37,892	12,295	Ester méthylique acide Hexadécanoïque	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,26	99
03	42,465	0,97	9,12,15- acide Octadécatriénoïque, méthyl ester, (Z,Z,Z)-	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,24	99
04	43,101	6,04	Ester méthyl 9,12- acide Octadécadiénoïque	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294,26	94
05	43,177	4,00	Ester méthyl 9- acid Octadécénoïque (Z)-,	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,27	99
06	43,466	0,25	Ester méthyl 9- acid Octadécénoïque,	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,27	99
07	44,107	1,22	Ester méthylique acide Octadécénoïque	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,29	70

Tableau 4.5 : Composition en ester méthylique en acide gras de l'extrait hexanique de *Chlorella pyrenoidosa*

Pics	Temps de rétention	Surface (%)	Noms du composé	formule chimique	Poids Moléculaire	% de probabilité
01	23,685	0,076	ester méthylique acid Dodecanoïque,	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	214,19	95
02	30,939	0,247	Ester méthylique acide Tétradécanoïque (Ester méthylique acide Myristique)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242,22	98
03	33,144	0,073	n-pentadécanoic acid methyl ester	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,24	94
04	33,421	0,079	Ester méthylique acide tridécanoïque	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,21	50
05	34,413	0,177	Ester méthylique acide pentadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,24	94
06	36,762	4,177	Ester méthylique 7,10 acide Hexadécanoïque	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	266,23	99
07	36,928	3,712	Ester méthylique 9,12,15 acide Octadécanoïque (Ester méthylique Acide linoléique)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,24	90
08	37,908	11,512	Ester méthylique acid Hexadécanoïque	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,26	99
09	39,785	0,456	Ester méthylique acide 14- méthyl Hexadécanoïque	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,27	93
10	40,153	0,227	Ester méthylique 7- acid Hexadécanoïque (Z)-	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	268,24	87
11	40,953	0,385	Ester méthylique acide 14- méthyl Hexadécanoïque	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,27	97
12	41,147	0,902	Ester méthylique butyl, 1,2- acide benzenedicarboxylique	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	236,10	64
13	42,791	0,950	Acide acétique, 3,7,11,15 –tetraméthyl-hexadécyl ester	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340,33	74
14	43,162	12,962	Ester méthylique acide 9,12-Octadécadiénoïque, (acide linoléique)	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294,26	99
15	43,362	10,060	Ester méthylique acide Linoléique (Methyl linolenate)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,24	98
16	43,451	1,354	Ester méthylique acide 9-Octadécanoïque (Z)- (acide Oleique)	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,27	99
17	43,627	1,612	3,7,11,15-tetramethyl -hexadécyl ester	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340,33	74
18	44,063	2,189	Ester méthylique acide Octadécanoïque (stéarate Méthyle)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,29	98
19	47,430	0,179	1-Hexadécane, 3,7,11,15-tetraméthyl-	C ₂₀ H ₄₂ O	298,32	60
20	48,636	0,102	Ester méthylique 9,12,15-acide Octadécatriénoïque	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,24	43
21	49,809	0,056	Ester méthylique Acide Eicosanoïque (Arachate méthyle) EPA	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326,32	60
22	64,162	0,074	Ester méthylique Acide tétracosanoïque (Lignoce=érate méthyle)	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	382,38	91

4.1.11 Résultats de l'analyse élémentaire par FRX

Les tableaux 4.6 et 4.7 résument les résultats de l'analyse de la composition chimique (pourcentages massiques en oxydes) par la technique de Fluorescence X (FRX) des deux poudres de microalgues.

Tableau 4.6 : Résultats de l'analyse par fluorescence des rayons X (FRX) de la poudre de la spiruline

N°	Eléments	Concentration massique de l'élément en %	Oxydes	Concentration massique de l'oxyde en %
1	C	25,1	CO ₂	91,8943
2	N	1,47	/	/
3	Na	1,32	Na ₂ O	1,7829
4	Mg	0,144	MgO	0,2394
5	Al	0,164	Al ₂ O ₃	0,309
6	Si	0,48	SiO ₂	1,0271
7	P	0,391	P ₂ O ₅	0,8959
8	S	0,411	SO ₃	1,0261
9	Cl	0,296	/	/
10	K	0,681	K ₂ O	0,8203
11	Ca	0,0832	CaO	0,1164
12	Ti	0,0056	TiO ₂	0,0094
13	Mn	0,0025	MnO	0,0032
14	Fe	0,0759	Fe ₂ O ₃	0,1085
15	Ni	0,0008	NiO	0,001
16	Cu	0,0001	CuO	0,0001
17	Zn	0,0002	ZnO	0,0003
18	Br	0,0026	/	/
19	Sr	0,001	SrO	0,0012
20	Y	0,0001	Y ₂ O ₃	0,0002
21	Zr	0,0005	ZrO ₂	0,0006

Tableau 4.7 : Résultats de l'analyse par fluorescence des rayons X (FRX) de la poudre de la chlorelle

N°	Eléments	Concentration massique de l'élément en %	Oxydes	Concentration massique de l'oxyde en %
1	C	25,9	CO ₂	94,8387
2	N	1,22	/	0,0596
3	Na	0,0442	Na ₂ O	0,0596
4	Mg	0,162	MgO	0,2694
5	Al	0,0022	Al ₂ O ₃	0,0042
6	Si	0,0038	SiO ₂	0,0082
7	P	0,805	P ₂ O ₅	1,8453
8	S	0,245	SO ₃	0,612
9	Cl	0,0106	/	/
10	K	0,879	K ₂ O	1,0593
11	Ca	0,0339	CaO	0,0474
12	Mn	0,0009	MnO	0,0012
13	Fe	0,0133	Fe ₂ O ₃	0,019
14	Cu	0,0005	CuO	0,0006
15	Zn	0,003	ZnO	0,0038

Selon les résultats de l'analyse élémentaire par FRX, *S. platensis* renferment vingt-un (21) éléments et dix-huit (18) oxydes (Tableau 4.6) dont l'élément majoritaire a été le carbone (C) avec 25,1 % suivi par l'azote (N) avec 1,47 %.

Na₂O, SiO₂ et SO₃ avec un pourcentage de 1,78 % et 1,02 % suivi par P₂O₅, K₂O avec un pourcentage de 0,89 % et 0,82 %, respectivement. Les autres oxydes sont à l'état de trace.

Tandis que, *C. pyrenoidosa* renferment quinze (15) éléments et treize (13) oxydes (Tableau 4.6) dont l'élément majoritaire a été le carbone (C) avec 25,9 % suivi par l'azote (N) avec 1,22 % due à la présence de protéine.

P₂O₅, K₂O avec un pourcentage de 1,84 et 1,06, respectivement suivi par SO₃ avec un pourcentage de 0,612 %. Les autres oxydes sont à l'état de trace.

La teneur en azote de ces deux microalgues est considéré importante en comparaison avec les biomasses lignocellulosique comme la canne à sucre (0,5 %), (0,3 %), (0,6 %) et *Eucalyptus grandis* (0,62 %) [316].

4.1.12 Résultats de l'analyse de l'ATG

Les résultats de l'analyse thermogravimétrique des deux échantillons de microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* dans les même conditions sont représentés dans les figures 4.3 et 4.4. Nous avons constaté que la décomposition s'est déroulée en trois stades distincts. Le premier stade représente le séchage et l'élimination des composés volatils de la biomasse algale, ou il y a eu une perte de masse de *S. platensis* de l'ordre de 6,130 % à une température de 108,18 °C après environ 10,8 min tandis que la perte de masse de *C. pyrenoidosa* était seulement de l'ordre de 3,557 % à une température de 85,49 °C après environ 8,55 min. Ce stade débute en début de chauffage et finit à température de volatilisation initiale (T_i). La température de cette zone de réaction a été inférieure à 200 °C, ce qui est en accord avec les résultats trouvaient par PENG *et al.* [317] chez *S. plantensis* and *C. prototheoides*, ainsi que BHOLA *et al.* [318] chez *C. vulgaris*.

Le deuxième stade est définit par la température (T_m), c'est la température pour laquelle il y a eu un maximum de décomposition de la matière. Ce stade est borné par T_i et T_e, cette dernière est la température de fin de décomposition de la matière. La perte de masse la plus importante de *S. platensis* qui a été enregistrée est de 53,99 % au températures 294,40 et 317,09 °C après environ 29,44 min. Tandis que la perte de masse de *C. pyrenoidosa* a été de l'ordre de 66,54 % à une température de 313,30 °C. Cette perte de masse est attribuée à la décomposition des principaux composants organiques à savoir : protéines, lipides et carbohydrates. Des résultats similaires ont été rapportés [317, 318]

Le troisième stade débute à T_e et termine jusqu'à la fin de l'analyse. A ce stade, nous avons enregistré une perte de masse de *S. platensis* de 9,149 % à une

température de 946,65 °C Tandis que pour *C. pyrenoidosa*, la perte a été de l'ordre de 5,192 % à une température de 939,09 °C. Au-delà 600 °C, la perte de masse est non significative et qui est due à la formation des carboniser et des cendres résiduels [319].

Le pourcentage de la décomposition de *C. pyrenoidosa* était nettement plus supérieur que celui de *S. platensis*, cela est probablement dû à la quantité de solide volatile que contient *C. pyrenoidosa*. En raisonnement par rapport aux solides volatiles, le pourcentage décomposé de *C. pyrenoidosa* est de 75,25 % et de 69,27 % pour *S. platensis*.

Il est important de noter que le profil de décomposition des différentes espèces d'algues diffère même si les principales composantes sont identiques. Plusieurs études ont montré que les espèces algales tel-que : *Chlorella vulgaris*, *Chlorella*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chaetoceros muelleri*, *Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, ainsi que des végétaux comme le carthame et les graines de raisin se dégradent également en plusieurs étapes [320-322].

La taille des particules peut jouer un rôle sur la décomposition de la matière volatile, notamment la forme des particules *C. pyrenoidosa* est une microalgue de forme sphérique et d'un diamètre de 2 à 10 µm. en revanche, *S. platensis* est de forme spirale, de 3 à 12 µm de diamètre. La sphéricité et la petite taille de la chlorelle ont facilité le transfert de chaleur dans la matrice [323].

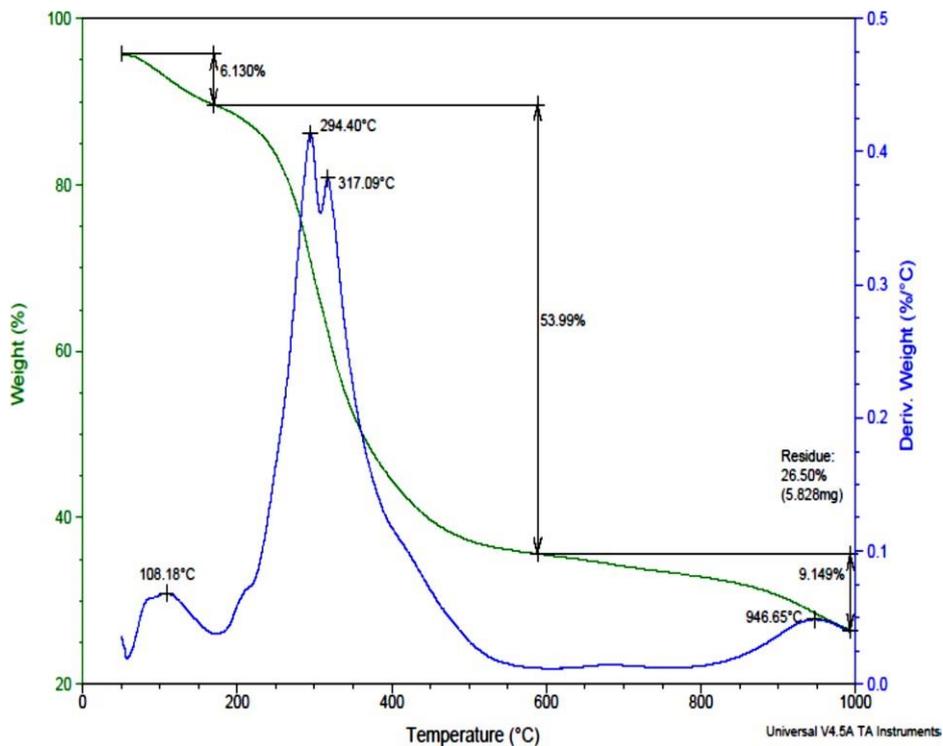


Figure 4.3 : Analyse thermogravimétrique de la poudre de la microalgue *Spirulina platensis*

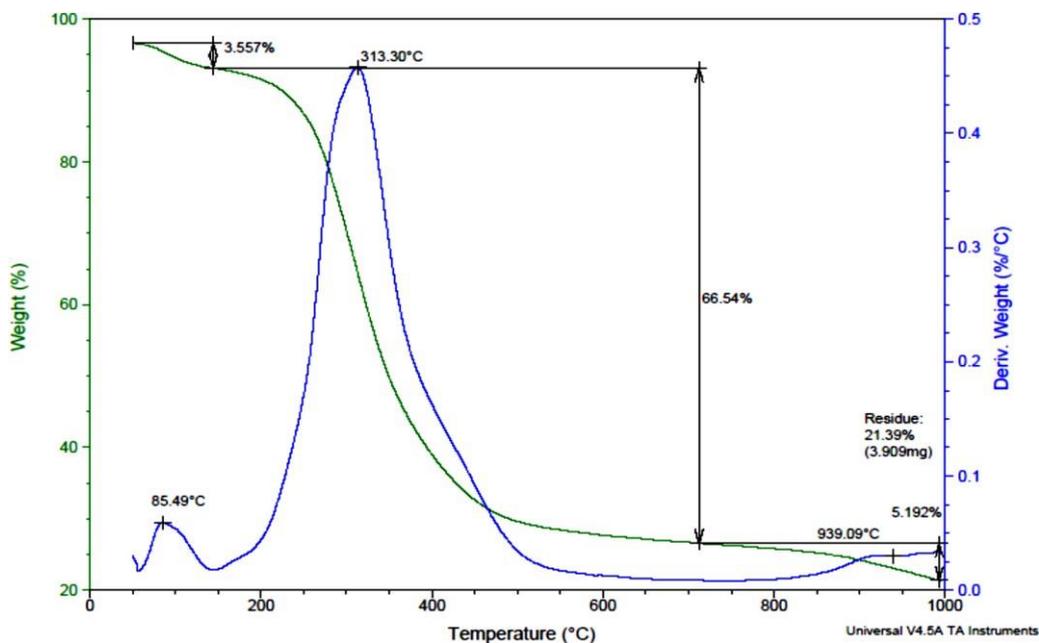


Figure 4.4 : Analyse thermogravimétrique de la poudre de la microalgue *Chlorella pyrenoidosa*.

4.2 Résultats des observations microscopiques des microalgues

Les échantillons d'algues ont été identifiés morphologiquement après une observation sous microscope optique (Fig. 4.5) ainsi qu'avec microscopie électronique à balayage (MEB) (Fig. 4.6).

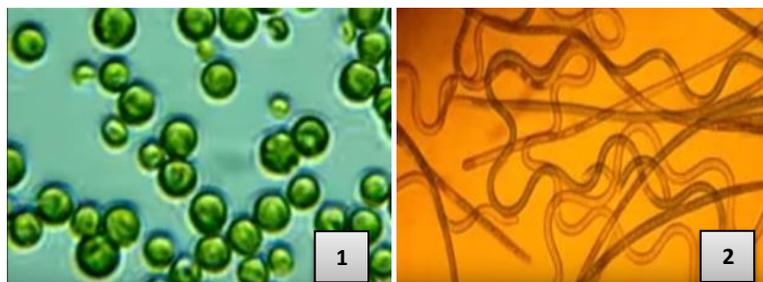


Figure 4.5 : Observation microscopique des cellules de *Chlorella pyrenoidosa* (1) et de *Spirulina platensis* (2) observée sous le microscope optique (Gr : 100 × 1,25 × 10 × 0,25)

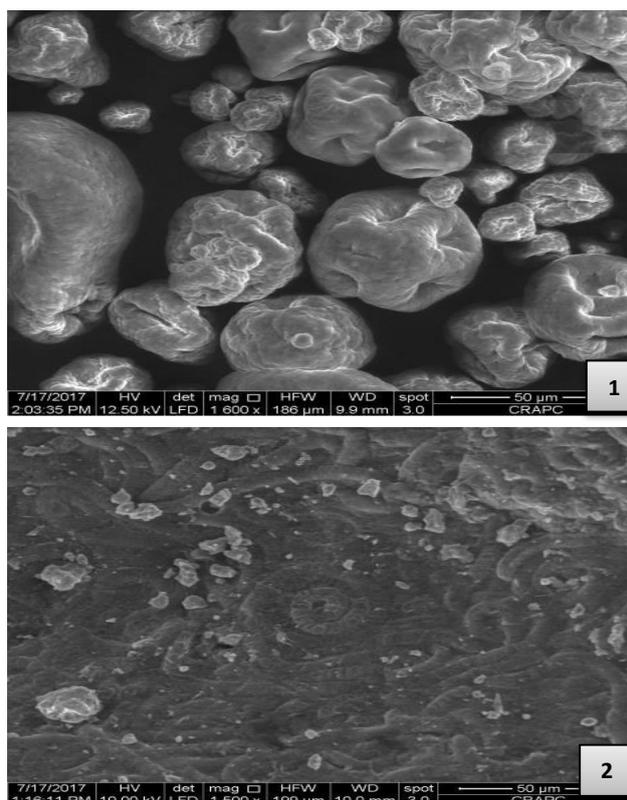


Figure 4.6 : Observation par microscope électronique à balayage (MEB) des cellules des deux microalgues séchées *Chlorella pyrenoidosa* (1) et *Spirulina platensis* (2) observés avec le MEB. Agrandissement : 1600 ×, échelle = 50 µm

4.3 Extraction et identification des différentes fractions organiques à partir de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

4.3.1 Rendements et couleurs

Nous constatons que l'extrait méthanolique de la chlorelle enregistre le rendement le plus élevé de l'ordre de 9,97 % suivi par l'extrait Hexano-éthanolique à raison de 8,98 % et 7,53 % pour l'extrait éthérique. Bien que, nous avons noté un rendement d'extraction avec le méthanol à partir de la spiruline en raison de 9,88 %, suivi par l'extrait Hexano-éthanolique à raison de 8,70 %. En ce qui concerne les autres extraits, les valeurs sont comprises entre 2,33 et 5,49 % (tableau 4.8).

Les variations des pourcentages des rendements d'extraction sont probablement liées à la polarité des solvants utilisés.

Tableau 4.8 : Couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir de la spiruline et de la chlorelle en pourcentage par rapport au poids total de la poudre de la spiruline et à l'extrait brut.

Espèces	Extraits	Couleurs	Masse (g)	Rdt (%) (g/g)
<i>Spirulina platensis</i>	Hexano-éthanolique	Caramélé	0,087	8,70
	Ethéré	Jaune	0,037	3,70
	Dichlorométhanolique	Brune	0,0233	2,33
	Acétonique	Vert foncé	0,0549	5,49
	Méthanolique	Vert-bleuâtre	0,0988	9,88
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Hexano-éthanolique	Caramélé	0,089	8,98
	Ethéré	Jaune	0,075	7,53
	Dichlorométhanolique	Brune	0,0296	2,96
	Acétonique	Vert foncé	0,734	7,34
	Méthanolique	Vert	0,099	9,97

4.3.2 Résultats d'analyse phytochimique des extraits organiques

Les résultats des analyses phytochimiques des extraits acétoniques, méthanoliques, étheriques, dichlorométhanoliques et hexaniques de la *Spirulina platensis* et de la *Chlorella pyrenoidosa* ont révélés la présence des flavonoïdes, des carbohydrates, des phénols, des terpènes. Les stéroïdes et les alcaloïdes ont été absents dans tous les extraits (Tableau 4.9).

Les tannins, les stérols, les terpénoïdes ainsi que les substances quinoniques étaient absents dans tous les extraits. Les composés phénoliques et flavonoïdes étaient présents dans tous les extraits (Tableau 4.9). Les alcaloïdes ont été présents seulement dans les extraits acétoniques et méthanoliques. Les concentrations des composés phénoliques, des flavonoïdes totaux, la phycocyanine ainsi que la chlorophylle contenue dans extraits organiques des deux algues sont présent dans la figure 4.7. La teneur la plus élevée des composés phénoliques totaux a été déterminée dans la chlorelle ($106,52 \pm 0,25$ mg/g), suivi par la spiruline ($33,57 \pm 1,11$ mg/g).

Tableau 4.9 : Analyse phytochimique préliminaire de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

Composants phytochimiques	Extraits organiques				
	Ether	Hexane	Dichloromethane	Acetone	Methanol
Composés phénoliques	+	+	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+	+	+
Tannin	ND	ND	ND	ND	ND
Stérols & terpenoïdes	ND	ND	ND	ND	ND
Substances Quinonique	ND	ND	ND	ND	ND
Alcaloïdes	ND	ND	ND	+	+

+: Présent, ND: Non détecté

En outre, la teneur la plus élevée de flavonoïdes totaux a été notée dans la chlorelle ($37,12 \pm 0,94$ mg/g) puis la spiruline ($15,35 \pm 0,54$ mg/g). La concentration la plus élevée de la phycocyanine était enregistrée dans spiruline tandis que la plus forte concentration de chlorophylle dans la chlorelle (Figure 4.7).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par ALI *et al.* [324] dans lequel ils n'ont observé que la *Chlorella* sp. et *Scenedesmus obliquus* présentés des teneurs en composés phénoliques et caroténoïdes élevées. HAJIMAHMOODI *et al.* [325] ont reporté que l'extrait aqueux de *Chlorella vulgaris* a la teneur la plus élevée en composés phénoliques parmi les douze (12) microalgues testées.

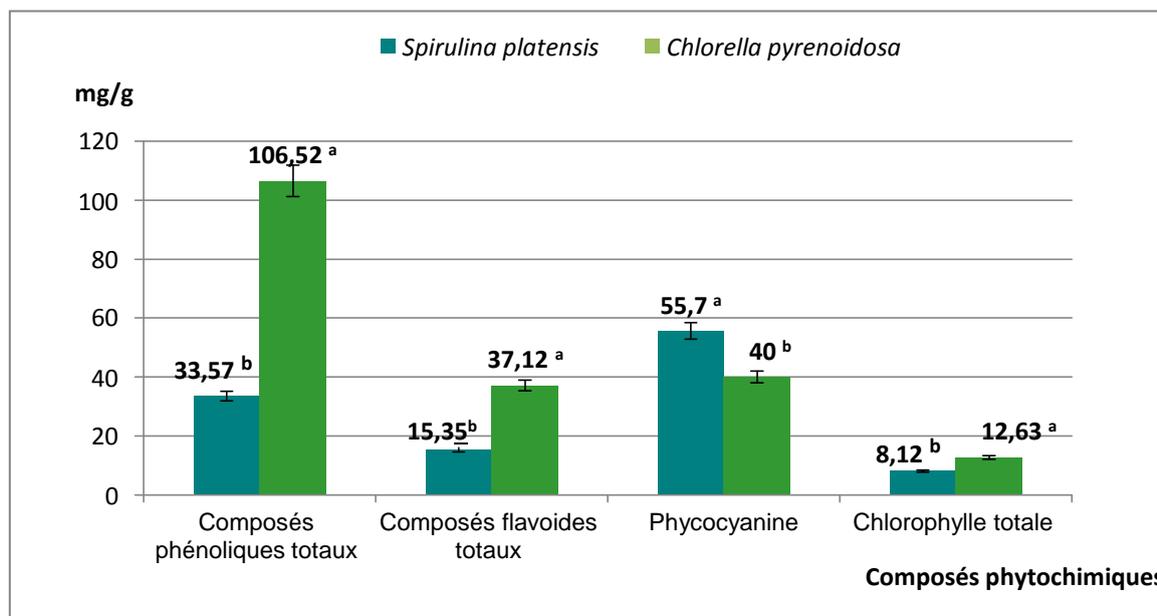


Figure 4.7 : Analyse quantitative des composés chimiques des extraits organiques de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

Les micro-algues contiennent une variété de classes phénoliques mais ils étaient très différents de beaucoup d'autres espèces de plante, comme les légumes, les fruits et les plantes médicinales. Les microalgues peuvent contenir des composés antioxydants différents par rapport à d'autres plantes [326]. La présence de flavonoïdes et des phénols dans les extraits méthanoliques peut être responsable de l'activité antiradicalaire individuel ou action synergétique.

KLEJDUS *et al.* [80] ont montré que plusieurs classes de flavonoïdes, tels que les isoflavones, flavones, flavonols et les dihydrochalcones ont été trouvés chez les microalgues et les cyanobactéries. Cela indique que les microalgues sont plus primitives que les plantes terrestres et elles sont capables de produire des polyphénols relativement complexes.

Les alcaloïdes sont communément trouvés doués des propriétés antimicrobiennes [327] contre les bactéries à Gram-positives et à Gram-négatives [328].

4.4 Résultats d'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits organiques

Les résultats de l'activité antimicrobienne de la cyanobactérie *Spirulina platensis* et l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa* contre les quatre bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Bacillus subtilis* ATCC 9372) et les quatre bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella* sp. ATCC 4352, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) ainsi que pour leur activité antifongique contre *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus* sp ATCC 16404 sont présentés dans le tableau 4.10.

Tous les extraits testés ont présentés des activités antibactériennes variables contre les micro-organismes pathogènes tests. L'extrait méthanolique brut de *C. pyrenoidosa* a montré le plus large spectre d'activités avec une zone d'inhibition de $48 \pm 7,07$ mm à une concentration de l'ordre de 0,96 mg/ml, suivi par l'extrait hexano-éthanolique avec de $47 \pm 5,66$ mm (0,96 mg/ml) contre *E. coli* ATCC 25922. Les valeurs de la CMI variant de 0,19 à 2,97 et $1,97 \text{ mg.mL}^{-1}$ à $2,67 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivement (tableau 4.11). Bien que, l'extrait méthanolique brut de la spiruline avec une concentration de 1 mg/ml a montré des zones d'inhibition d'un diamètre de $43 \pm 4,24$ mm et $27,5 \pm 0,71$ mm, contre les bactéries à Gram (-) négative *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. cereus*, respectivement, tandis que nous avons enregistré des zones d'inhibition de $31 \pm 1,41$ mm et $27,5 \pm 3,54$ mm, contre les bactéries à Gram (-) *Pseudomonas* sp. et *Klebsiella* sp, respectivement. Cependant, les valeurs de la CMI variaient entre 0,13 à $1,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ (tableau 4.12).

Nos résultats sont plus importants que ceux trouvés par USHARANI *et al.* [329] qui ont rapporté que l'extrait méthanolique brut de *S. platensis* a montré une zone d'inhibition la plus élevée ($20 \pm 0,4$ mm) contre la cocci Gram positif *Streptococcus pyogenes* suivi par *Staphylococcus aureus* ($19 \pm 0,3$ mm). Pour les bactéries à Gram

négatif, la zone d'inhibition maximale a été enregistrée avec l'extrait méthanolique brut contre *Proteus mirabilis* ($19 \pm 0,8$ mm) suivi par *Klebsiella pneumoniae* ($19 \pm 0,5$ mm). Les mêmes résultats ont été également obtenus par SUDHA *et al.* [60], VINAY *et al.* [330], KAUSHIK *et al.* (2009) [331], PARISI *et al.* [332], ASTHANA *et al.* [333] et OZDEMIR *et al.* [334].

La plus petite zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait éthérique de la chlorelle contre la majorité des souches pathogènes tests et qui a été relativement très restreinte par rapport aux autres extraits organiques testés avec des CMI variaient de 0,75 à 2,25 mg.mL⁻¹ (tableau 4.11). Les zones d'inhibition obtenues avec les extraits dichlorométhanoliques et acétoniques de *Spirulina platensis* contre *Candida albicans* sont similaires à ceux obtenus par USHARANI *et al.* [329]. Alors que avec l'extrait éthérique de la spiruline, nous avons enregistré une activité antibactérienne seulement à l'égard de *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. L'extrait hexano-éthanolique a présenté une forte activité à l'égard des bactéries à Gram positif *Bacillus cereus* ATCC 10876, suivi par la Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922. Bien que, l'extrait acétonique et dichlorométhanolique ont présenté des spectres d'activité inhibitrice de l'ordre de 23 mm à l'égard d'*E. coli* et *Staphylococcus aureus*, respectivement.

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux contrôles positifs sont présents dans le tableau 4.10. La gentamycine (10 µg) a montré une zone d'inhibition allant de 23 à 29 mm, tandis que pour celle de l'érythromycine (10 µg) a variée entre 13 à 20 mm contre *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, respectivement.

Tableau 4.10 : Activité antimicrobienne et antifongique des extraits organiques extraient à partir de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* à l'égard des bactéries pathogènes (zone d'inhibition exprimée en mm de diamètre), les données sont exprimées en moy. ± écart-type

Extraits		Diamètres des zones d'inhibition* (mm)									
		<i>E. coli</i>	<i>Sal.</i>	<i>Kb.</i>	<i>Ps.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. brosilensis</i>	<i>C. albicans</i>
<i>S. platensis</i>	Ethérique	21,5 ± 0,71 ^d	17 ± 0,71 ^d	0	11 ± 0,1 ^d	10 ± 0,1 ^e	20 ± 1,41 ^d	20,3 ± 2,12 ^c	19 ± 0,71 ^b	0	0
	Dichlorométhanolique	14,5 ± 0,71 ^f	0	0	13,5 ± 0,71 ^c	23 ± 4,24 ^b	12,5 ± 3,54 ^e	10,5 ± 0,71 ^f	12 ± 2,83 ^d	0	13 ± 1,41 ^c
	Hex-éthanolique	28 ± 2,83 ^b	21,9 ± 1,41 ^c	12 ± 1,41 ^c	10,5 ± 3,54 ^d	27 ± 2,83 ^a	40,5 ± 0,71 ^a	25 ± 2,83 ^b	0	0	0
	Acétonique	23,5 ± 2,12 ^c	0	9,5 ± 2,12 ^d	9,5 ± 0,71 ^d	11,5 ± 0,71 ^e	16,5 ± 2,12 ^e	21,5 ± 0,71 ^c	9,50 ± 0,71 ^e	0	15 ± 1,41 ^b
	MeOH	16 ± 1,41 ^e	22 ± 0,71 ^c	27,5 ± 3,54 ^a	31 ± 1,41 ^a	21 ± 1,41 ^c	27,5 ± 0,71 ^b	43 ± 4,24 ^a	0	0	0
	Ethérique	21 ± 1,41 ^d	31 ± 1,41 ^a	11,25 ± 2,47 ^c	13,75 ± 1,06 ^c	13 ± 5,66 ^d	14,5 ± 0,71 ^e	15,5 ± 4,95 ^e	15 ± 1,41 ^c	13,5 ± 0,71 ^b	13 ± 1,41 ^c
<i>C. Pyrenoidosa</i>	Dichlorométhanolique	17 ± 0,2 ^a	0	1 ± 0,15 ^e	15,36 ± 0,3 ^b	13,83 ± 2,25 ^c	8,66 ± 1,54 ^d	9,3 ± 0,3 ^d	8,83 ± 0,29 ^d	0	9,9 ± 0,97 ^d
	Hex-éthanolique	47 ± 5,66 ^a	27 ± 0,71 ^b	13,5 ± 2,12 ^c	15,5 ± 0,71 ^c	14,5 ± 3,54 ^d	19,5 ± 0,71 ^d	18 ± 2,83 ^d	22 ± 2,83 ^a	0	15,5 ± 0,71 ^b
	Acétonique	30 ± 1,3 ^a	1,3 ± 0,2 ^e	16,63 ± 1,18 ^c	11,9 ± 0,78 ^d	18 ± 1,8 ^b	18,13 ± 0,32 ^b	10,16 ± 0,66 ^d	10,23 ± 0,40 ^d	0	0
	MeOH	48 ± 7,07 ^a	28,6 ± 2,12 ^b	20,3 ± 2,12 ^b	19,3 ± 1,41 ^b	26,3 ± 2,12 ^a	23,6 ± 1,41 ^c	11,5 ± 0,71 ^e	20 ± 1,41 ^b	20 ± 1,41 ^a	21,25 ± 6,99 ^a
	antibiotiques	23	29	nt	nt	26	nt	nt	nt	nt	nt
	ERI (µg)	13	20	Nt	nt	18	nt	nt	nt	nt	nt

* Diamètres des zones d'inhibition inclus les diamètres des disques (6 mm), les résultats sont les moyennes de trois répétitions, *S. platensis* : *Spirulina platensis*, *C. pyrenoidosa*: *Chlorella pyrenoidosa*, *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Sal.*: *Salmonella typhimurium* ATCC, *Kb*: *Klebsiella* sp ATCC 4352, *Ps.*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *B. cereus*: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *B. subtilis*: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *A. brosilensis*: *Aspergillus brosilensis* ATCC 16404, *C. albicans* : *Candida albicans* ATCC 10231. GEN: Gentamycine, ERI: Erythromycine, nt: non testé

En comparaison avec les deux antibiotiques standards utilisés, nous pouvons constater que les concentrations testées de certains extraits organiques ont présentées des spectres d'inhibition plus importants que le témoin.

Lorsque nous comparons l'effet des extraits obtenus à partir de la cyanobactérie et l'algue verte avec les antibiotiques standard testés, nous avons constaté que l'effet des extraits de la chlorelle testés a été plus important que celui du contrôle positif à l'égard des deux souches *E. coli* et *Salmonella* sp. Bien que, l'effet de l'extrait méthanolique (0,96 mg/mL) sur *S. aureus* était presque équivalent au contrôle positif mais il été inférieur par rapport à la gentamycine et plus élevé à celui de l'érythromycine. Alors que, il a été constaté que l'effet des antibiotiques standard était plus important que l'extrait de la spiruline sur la Salmonelle avec la gentamycine mais il a été presque équivalent à celui de l'érythromycine. Bien que, l'effet de l'extrait hexanique (1,05 mg/mL) sur *E. coli* et *S. aureus* a été plus élevés que ceux des antibiotiques standard et à peu près égal avec l'extrait acétonique (47,8 mg/mL) sur *E. coli*, mais l'effet des autres extraits de la spiruline était inférieur à la gentamycine mais plus important à l'érythromycine.

Dans cette étude, nous avons observé que tous les extraits obtenus à partir de la cyanobactérie ainsi que l'extrait éthérique de la chlorelle n'ont exercés aucun effet antifongique vis-à-vis *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 à l'exception des extraits éthériques et méthanoliques de l'algue verte (tableau 4.10) qui ont présenté une activité de l'ordre de 13,5 et 20 mm, respectivement. Alors que, les extraits de *C. pyrenoidosa* ont montré des spectres d'activité de l'ordre de $13 \pm 1,41$ mm, $15,5 \pm 0,71$ mm et $21,25 \pm 6,99$ mm, respectivement à l'égard de *Candida albicans* mais aucune activité antifongique n'a été enregistré avec les extraits de la cyanobactérie.

D'autre part, seulement les extraits dichlorométhanolique et acétonique de *S. platensis* ont montré des activités antifongiques à l'égard de *Candidat* sp. avec des zones d'inhibition de l'ordre de $(13 \pm 1,41$ mm, $15 \pm 1,41$ mm, respectivement). Tandis que tous les extraits de la chlorelle à l'exception de l'extrait acétonique ont présentés des spectres d'inhibition à l'égard de *Candidat* sp. par contre seulement les extraits éthérique et méthanolique ont été actifs contre *Aspergillus* sp.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par ENTESAR ET AHMED [335] qui ont prouvé que toutes les espèces algales testées n'ont pas enregistré une activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus* et *Trichophyton mentagrophytes*, tandis que à l'égard de *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de $15,1 \pm 1,2$ mm. Les mêmes résultats ont été également obtenus par RANIA et al. [336] qui ont constaté que l'extrait éthanolique de la microalgue verte *Chlorella pyrenoidosa* a présenté un effet antifongique à l'égard d'*A. flavus* (30 mm), suivi par l'extrait acétonique (15 mm). Bien que l'extrait éthanolique ait donné la plus large zone d'inhibition avec les champignons testés avec 40 mm contre *A. flavus* suivi par *C. albicans* (20 mm).

D'après nos résultats, nous avons pu constater que les extraits de *Chlorella pyrenoidosa* ont présentés le spectre le plus important contre les bactéries à Gram positif et les champignons, tandis que les extraits de *Spirulina platensis* étaient plus efficaces contre les bactéries à Gram négatif. La plus forte activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la Chlorelle semble être due aux composants polaires et qui sont représentés à un grand pourcentage avec les composés polyphénoliques et des caroténoïdes.

L'effet de l'activité antimicrobienne de la Chlorelle a été documenté dans plusieurs travaux, KELLAM et WALKER [337] et ORDOG *et al.* [57] qui ont rapporté que les activités antibactériennes et antifongiques ont été observées importante pour la Chlorelle. Ainsi que, OZDEMIR *et al.* [334] ont constatés que les extraits de la spiruline obtenue par différents solvants présentaient une activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'activité antimicrobienne des extraits peut être due à la présence de divers composés qui peuvent inclure des flavonoïdes ainsi que des triterpénoïdes phénoliques qui affectent la croissance et le métabolisme des bactéries.

Tableau 4.11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI µg/ mL) des extraits de *Chlorella pyrenoidosa* à l'égard des souches pathogènes

Microorganismes	Extraits organiques (µg/ml)			Acétonique	MeOH	Gentamycine (µg)
	Ethérique	Dichlorométhanolique	Hexano-ethalonic			
<i>E. coli</i>	150 ± 0.70	<150	267 ± 0.70	<120	> 198 ± 2.12	< 100
<i>S. aureus</i>	225 ± 1.41	<150	< 178 ± 2.12	>200	>198 ± 2.12	
<i>Salmonella typhimurium</i>	750 ± 0.70	NT	< 178 ± 2.12	>1000	>198 ± 2.12	NT
<i>B. cereus</i> ATCC 10872	225 ± 1.41	> 1000	267 ± 0.70	>1000	< 198 ± 0.70	< 100
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	225 ± 1.41	> 1000	>178 ± 2.12	>1000	>495 ± 1.41	< 100
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	225 ± 1.41	> 1000	267 ± 0.70	>1000	>2970 ± 2.12	< 100
<i>Klebsiella</i> sp	187 ± 0.70	> 1000	267 ± 0.70	>200	1980 ± 0.70	< 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	225 ± 1.41	< 150	>178 ± 1.41	>1000	2970 ± 0.71	< 100
<i>Aspergillus</i> sp	225 ± 1.41	NT	NT	NT	>495 ± 1.41	< 100
<i>Candida albicans</i>	225 ± 1.41	< 1000	267 ± 0.70	NT	>495 ± 1.41	

Les données sont exprimées en moyennes de trois répétitions ± écart-type, NT : non testé

Tableau 4.12 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI µg/ mL) des extraits de *Spirulina platensis* à l'égard des souches pathogènes

Microorganismes	Extraits organiques (µg/ml)					Gentamycine (µg)
	Ethérique	Dichlorométhanolique	Hexano-ethalonic	Acétonique	MeOH	
<i>E. coli</i>	> 370	< 233	< 1740 ± 1.41	> 450 ± 0.70	1976	< 100
<i>S. aureus</i>	> 740	< 233	< 1740 ± 1.41	> 450 ± 0.70	1976	
<i>Salmonella typhimurium</i>	NT	NT	NT	NT	1976	NT
<i>B. cereus</i> ATCC 10872	> 740	> 466	< 1740 ± 1.41	> 900 ± 0.70	> 988	< 100
<i>B. subtilis</i> ATCC 9372	> 740	> 466	< 1740 ± 1.41	>1647 ± 0.70	128 ± 4,24	< 100
<i>B. Subtilis</i> ATCC 6633	> 740	> 466	< 1740 ± 1.41	>526 ± 0.70	128 ± 0,71	< 100
<i>Klebsiella</i> sp	NT	NT	NT	NT	NT	< 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NT	466	1740 ± 0.70	1647 ± 0.70	2964	< 100
<i>Candida albicans</i>	NT	466	NT	900 ± 0.70	NT	< 100

En outre, ils pourraient avoir un effet inhibiteur ou activateur sur la croissance microbienne en fonction de la composition et la concentration des composés et les groupes hydroxyles libres [338], les amides et les alcaloïdes [47]. Des études antérieures ont rapportées que les composés comme le 1-Octadecene, le 1-Heptadecane présent chez les algues et les végétaux supérieurs sont responsable de leur action anticancéreuse, antioxydante et antimicrobienne [339, 340]. Il a été suggéré que les lipides et les acides gras présents dans les souches algales pourrait également être responsable de l'activité antimicrobienne [85, 106]. Les acides gras essentiels isolés à partir de microalgues ont été connus pour présenter une activité antibactérienne [337].

Les extraits les plus actifs sont les extraits méthanoliques des deux espèces, donc les molécules les plus actives sont très certainement des molécules polaires. Ce qui semble être intéressant de les caractériser.

4.5 Identification des composés polyphénoliques par l'analyse de HPLC des extraits bruts hydro-méthanoliques de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa*

Les chromatogrammes enregistrés ont été traités et exploités par le logiciel YL-CLARITY. Les chromatogrammes illustrant les pics correspondant aux différents composés phénoliques des extraits de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sont illustrés dans les figures 4.8 et 4.9, tandis que les tableaux K.1 et K.2 (Appendice K) donnent les concentrations de composés phénoliques individuels identifiés. Dans cette étude nous avons pu identifier que dix (10) composés phénoliques pour *S. platensis* et onze (11) composés pour *C. pyrenoidosa*, plus de quarante composés n'ont pas pu être identifiés par manque des étalons de référence. Les composés phénoliques identifiés sont des acides hydroxybenzoïques tels que l'acide gallique et des acides hydrocinnamiques tels que acide coumarique et férulique, flavan-3-ols comme la catéchine, les flavonols comme la quercétine.

La majorité des composés phénoliques identifiés dans l'extrait de *S. platensis* sont en quantités mineures sauf l'acide gallique et le résorcinol (tableau K.1), tandis que l'extrait méthanolique de la chlorelle contient plus d'acide gallique que la spiruline (tableau K.2).

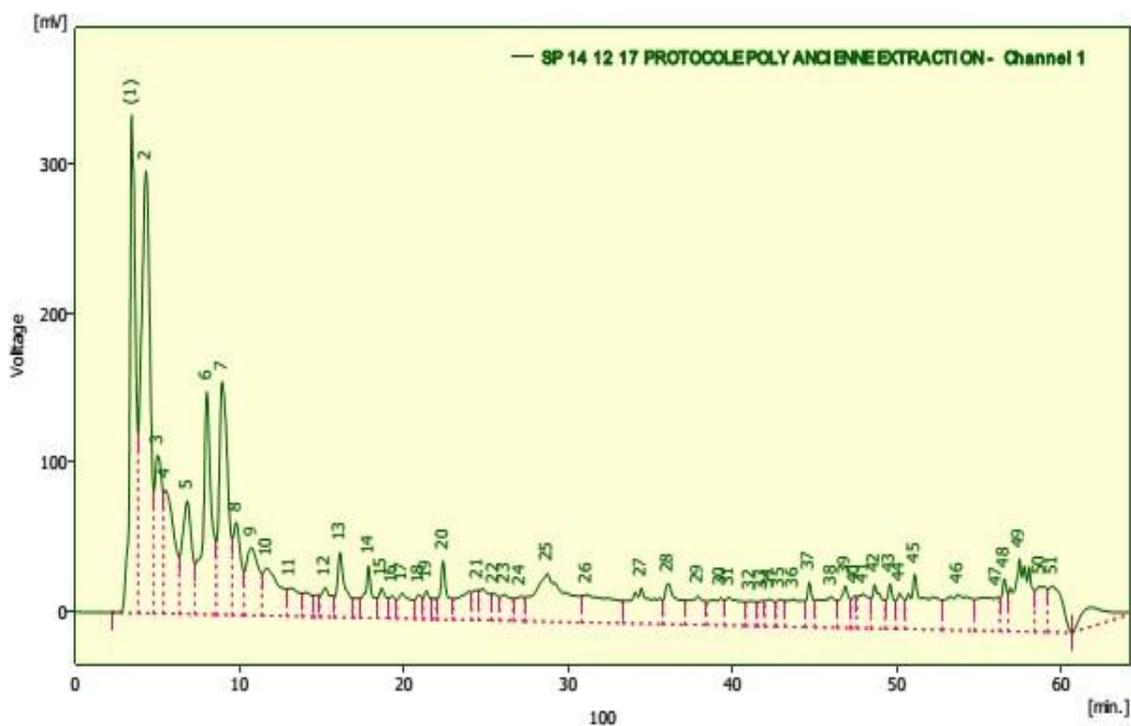


Figure 4.8 : Chromatogramme de l'extrait brut hydro-méthanolique de *Spirulina platensis*

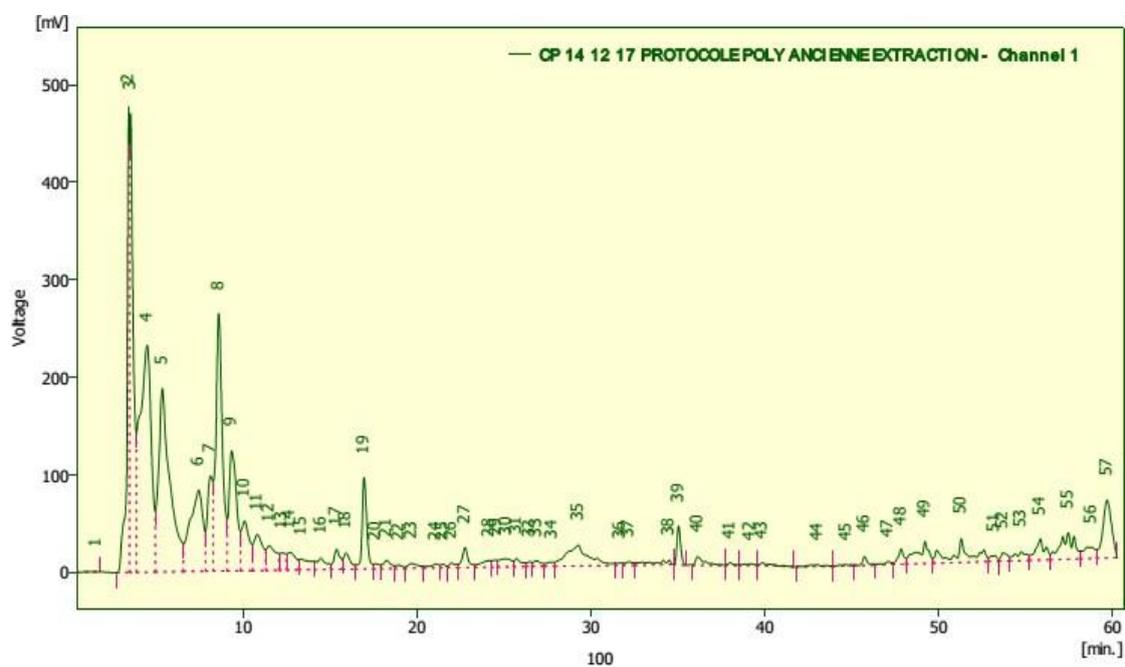


Figure 4.9 : Chromatogramme de l'extrait hydro-méthanolique de *Chlorella pyrenoidosa*

En outre, des études antérieures ont montré la présence de : acide *p*-hydroxybenzoïque, acide protocatéchuique, acide vanillique, acide syringique, acide cafféique et l'acide chlorogénique, ainsi que 4-hydroxybenzaldéhyde et 3,4-dihydroxybenzaldéhyde chez certaines microalgues tel que les cyanobactérie (*S. platensis*, *A. doliolum*, *Cylindrospermum* sp. et *Nostoc* sp.) [320, 341]. SHALABY and SHANAB [321] ont pu constater des concentrations élevées en acide protocatéchuique dans les extraits hydrométhanolique de *S. platensis*. SINGH *et al.* [322] ont identifiés et quantifiés certains composés phénoliques chez la cyanobactérie *Plectonema boryanum* comme composants majoritaires : résorcinol, acide vanillique et acide syringique (81,3, 21,7 et 13,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivement). Dans *Phormidium* sp. l'acide cafféique et l'acide benzoïque ont été identifiés comme composants majoritaires avec (28,2 et 17,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivement). Dans *Oscillatoria* sp. l'acide salicylique et l'acide salicylique acétyle (23,5 et 13,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivement) ont été identifiés comme composants majoritaires. Tandis que l'acide tannique a été identifié comme composant majoritaire chez *Nostoc* sp. avec 75.0 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Dans une étude très récente, des composés phénoliques ont été identifiés par UPLC-MS/MS comme les phénols simples et les acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide *p*-coumarique) dans les espèces suivantes : *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Diacronema lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica* et *Porphyridium purpureum* [342].

SAFAFAR *et al.* [343] ont pu identifier des acides phénoliques simples comme : acide gallique, 2,5-dihydroxy acide benzoïques, 3,4-dihydroxy acide benzoïque, acide cafféique, acide férulique, acide *p*-coumarique, acide salicylique et acide cinnamique ainsi que des acides hydroxy-cinnamique chez les algues vertes *Chlorella sorokiniana*.

4.6 Analyse spectrale des extraits sélectionnés de *S. platensis* et *C. pyrenoidosa*

Les extraits méthanoliques de *S. platensis* et *C. pyrenoidosa* sélectionnés les plus actifs vis-à-vis les souches pathogènes ont été caractérisés par spectroscopie UV et IR.

4.6.1 Spectroscopie UV

Le spectre UV de *S. platensis* a montré quatre maxima d'absorption à 503, 538, 609 et 664 nm. Tandis que celui de *C. pyrenoidosa* a montré seulement trois maxima d'absorption à 540, 608 et 644 nm. Ce qui correspondant aux absorptions des caroténoïdes.

4.6.2 Spectroscopie IR

Les deux microalgues *S. platensis* et *C. pyrenoidosa* ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge dans une gamme comprise entre 400 et 4000 cm^{-1} . Les spectres infra-rouge des deux algues (Figure 4.10) ont indiqué la présence des mêmes groupements suivants:

- ✓ Une bande à 3317 cm^{-1} due à la vibration d'allongement N-H du groupement amine secondaire ;
- ✓ Deux bandes à 2944 cm^{-1} et 2832 cm^{-1} relatives à la vibration de valence (C-H) des groupes -CH₃ et -CH₂- de la chaîne méthylique aliphatique
- ✓ Une bande à 1659 cm^{-1} correspondant à la vibration de valence (C=O) d'une fonction amide;
- ✓ Une déformation à 1449 cm^{-1} de -CH₂- des chaînes alcanes ;
- ✓ Une bande à 1413 cm^{-1} due à la vibration d'allongement C-N une fonction amine due au symétrique de COO- ;
- ✓ Une bande à 1113 cm^{-1} due à la vibration de la valence C-O d'une fonction alcool tertiaire ;
- ✓ Une bande intense à 1020 cm^{-1} attribuable à la vibration à la valence C-C et C-O;
- ✓ Une bande de déformation à 618 cm^{-1} des alcynes (\equiv C-H).

Des spectres FT-IR similaires dans des études antérieurs ont été observés et qui ont révélés la présence des groupes amide, ester et carboxyles ainsi que des carbohydrates [344-346].

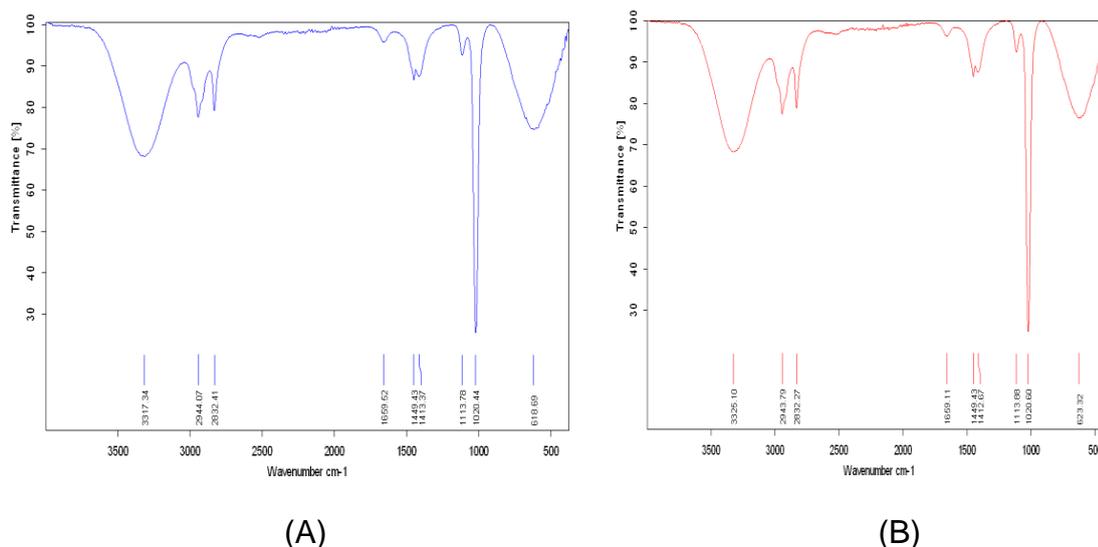


Figure 4.10 : Spectres IR des extraits méthanoliques de *S. platensis* (A) et *C. pyrenoidosa* (B).

4.7 Résultats de la caractérisation et du criblage des souches lactiques et pseudolactique à potentiel probiotique isolées de différents biotopes

4.7.1 Résultats de l'identification des bactéries lactiques et pseudolactiques

Des souches ont été isolées à partir de différents biotopes et qui ont été développées sur les géloses MRS, M17, Columbia et MRSc. Après observation macroscopique, les colonies ont apparues, petites, de forme circulaire ou plus allongée, lenticulaire ronde avec un contour régulier, de couleur blanchâtre et crème avec des diamètres variables (Fig. 4.11 A).

Après la coloration de Gram et une observation microscopique, les isolats étaient des cellules à Gram-positives avec des formes bacilles et cocci et des modes de regroupement différents d'une espèce à une autre : cocci en chainettes (*Streptococcus* sp.) (Fig. 4.12 A), cocci en diplocoques et des tétrades (*Pediococcus* sp.) (Fig. 4.12 B), longue bacilles en paire ou en chaîne (*Lactobacillus* sp.) (Fig. 4.12 C), cocci en amas (*Lactococcus* sp.) (Fig. 4.12 D), cocci en paire (*Enterococcus* sp.) (Fig. 4.12 E) ou des petites bacilles incurvés (*Bifidobacterium* sp.) (Fig. 4.12 F).

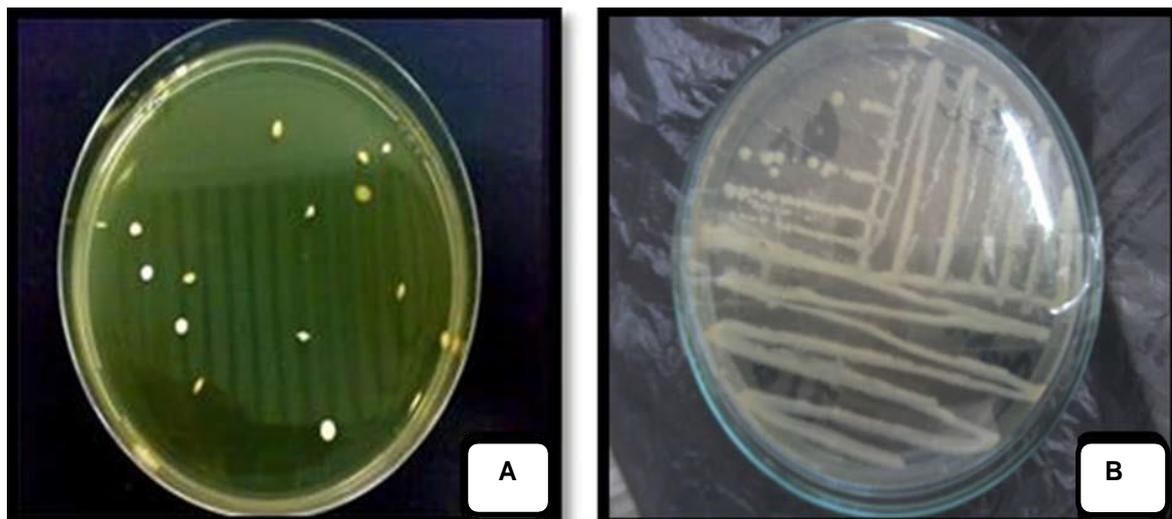


Figure 4.11 : Observation macroscopique des colonies des isolats de bactéries lactiques (A) et souches purifiées (B) sur agar.

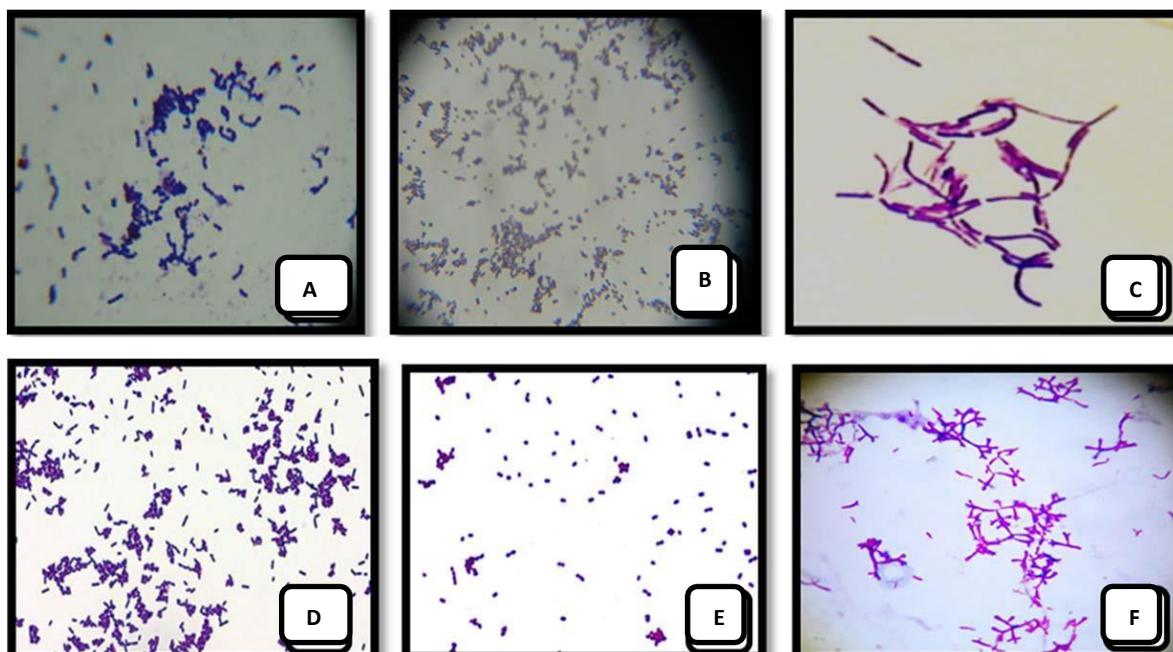


Figure 4.11 : Souches lactiques et *Bifidobacterium* isolées à partir de lait de vache, de chamelle et des fèces de nourrisson. (A): *Streptococcus thermophilus*; (B) : *Pediococcus cerevisiae*; (C): *Lactobacillus bulgaricus*; (D) : *Lactococcus lactis*; (E): *Enterococcus faecalis*; (F) : *Bifidobacterium bifidum* (1000 x).

Les souches purifiées ont été toutes des bactéries à Gram positives, catalase (-) et oxydase (-), non mobile, non sporulés. Ces caractéristiques sont typiques des souches lactiques et *Bifidobacterium*.

Les résultats de l'identification biochimique des souches isolées à partir du lait et en comparaison avec les travaux rapportés par DESMAZEAUD et al. [347] et GUIRAND [348] ont montrés que les quatorze souches purifiées appartiennent aux espèces citées dans le tableau 4.13.

Bien que, les souches isolées à partir des fèces des nouveaux nés sont des gélatinase (-), sans production d'indole et qu'elles résistent jusqu'à 2 % de sels biliaires, des citrates perméase (+), nitrate réductase (-), aucune production de gaz après fermentation du glucose, croient en anaérobiose à l'exception des souches BHI 10, 23-25, 27-30, 36-41 (tableau 4.14). Basons sur les tests cités précédemment, nous avons supposé que ces isolats choisis étaient susceptibles d'appartenir au genre *Bifidobacterium*. Les résultats ont montré que toutes les souches fermentent certains sucres (glucose, fructose, maltose et lactose).

L'identification des espèces a été complétée avec l'étude de la fermentation des carbohydrates par l'utilisation des galeries API (tableau 4.15, figures F.1, F.2 et F.3 en Appendice F) et les résultats ont été comparés à la littérature [349].

Par conséquent, toutes les souches isolées et identifiées comme des souches lactiques et *Bifidobacterium* ont fait l'objet d'un criblage selon leurs tolérances aux sels biliaires et les conditions acides en vue de sélectionner les meilleures souches.

Tableau 4.13 : Caractérisation biochimique et physiologique des souches lactiques isolées à partir du lait de vache et de chamelle

Caractéristiques biochimiques	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
production d'indole	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate perméase	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
ODC	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Fermentation des carbohydrates														
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	±	+	-	+	-	+	-	-	-	±	+	±	+	+
Mannitol	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Production de H ₂ S	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de CO ₂ à partir de glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résistance aux sels biliaires (02 %)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caractéristiques physiques														
Test de thermorésistance 65 °C	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH = 3.2	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Croissance à pH = 4	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 9.6	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en présence de NaCl 4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance en présence de NaCl 6.5 %	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Croissance à T 30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à T 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à T 45 °C	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Espèces	Lc 01 <i>Lc. Lactis</i>	Ec 01 <i>Ec. faecium</i>	Lc 02 <i>Lc. cremoris</i>	Ec 02 <i>Ec. Faecalis</i>	Pc 01 <i>Pc. cerevisiae</i>	Pc 02 <i>Pc. acidilactici</i>	Lb 01 <i>Lb. bulgaricus</i>	Lb 02 <i>Lb. Lactis</i>	Lc 03 <i>Lc. Lactis</i>	Sc 01 <i>Sc. boris</i>	Sc 02 <i>Sc. Thermophilus</i>	Sc 03 <i>Sc. Agalactiae</i>	Lb 03 <i>Lb. bulgaricus</i>	Lb 04 <i>Lb. lactis</i>

(+) : Réaction positive ; (-) : Réaction négative; (±) : variable,

Tableau 4.14 : Caractérisation biochimique et physiologique des souches isolées à partir des fèces de nourrisson.

Caractérisation biochimique	BHI 01	BHI 02	BHI 03	BHI 04	BHI 05	BHI 06	BHI 07	BHI 08	BHI 09	BHI 10	BHI 11	BHI 12	BHI 13	BHI 14	BHI 15	BHI 16	BHI 17	BHI 18	BHI 19	BHI 20
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
production d'indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate perméase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Production de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Production de CO ₂ à partir glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Résistance aux sels biliaires (02 %)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caractérisation physiologique																				
Test de Thermorésistance 46.5 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH = 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Croissance à pH = 8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en présence de NaCl 4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance en présence de NaCl 6.5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à T 30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à T 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à T 45 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Réaction positive ; (-) : Réaction négative; (±) : variable,

Tableau 4.14 : Caractérisation biochimique et physiologique des souches isolées à partir des fèces de nourrisson (suite).

Caractérisation biochimique	BHI 21	BHI 22	BHI 23	BHI 24	BHI 25	BHI 26	BHI 27	BHI 28	BHI 29	BHI 30	BHI 31	BHI 32	BHI 33	BHI 34	BHI 35	BHI 36	BHI 37	BHI 38	BHI 39	BHI 40
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
production d'indole	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Gélatinase	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate perméase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de CO ₂ à partir glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Résistance aux sels biliaires (02 %)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caractérisation physiologique																				
Test de Thermorésistance 46.5 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à pH = 6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance en présence de NaCl 4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance en présence de NaCl 6.5 %	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Croissance à T 30 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à T 37 °C	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Croissance à T 45 °C	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

(+) : Réaction positive ; (-) : Réaction négative; (±) : variable,

Tableau 4.14 : Caractérisation biochimique et physiologique des souches isolées à partir des fèces de nourrisson (suite).

Caractérisation biochimique	BHI 41	BHI 42	BHI 43	BHI 44	BHI 45
Catalase	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	+	-
production d'indole	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-
Citrate perméase	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+
RM	+	+	+	+	+
ADH	+	+	-	+	+
LDC	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+
Production de H ₂ S	+	+	+	+	+
Production de CO ₂ à partir glucose	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+
Résistance aux sels biliaires (02 %)	+	+	+	+	+
Caractérisation physiologique					
Test de Thermorésistance 46.5 °C	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 4	-	-	-	-	+
Croissance à pH = 6.5	+	+	+	+	+
Croissance à pH = 8.5	-	-	-	-	-
Croissance en présence de NaCl 4 %	+	+	+	+	+
Croissance en présence de NaCl 6.5 %	-	-	-	-	-
Croissance à T 30 °C	+	+	+	+	+
Croissance à T 37 °C	+	+	+	+	+
Croissance à T 45 °C	+	+	+	+	+

(+) : Réaction positive ; (-) : Réaction négative; (±) : variable,

Tableau 4.15: Fermentation des carbohydrates des souches bifides isolées à partir des selles de nourrisson

Fermentation of sugars	BHI 01	BHI 02	BHI 03	BHI 04	BHI 05	BHI 06	BHI 07	BHI 08	BHI 09	BHI 11	BHI 12	BHI 13	BHI 14	BHI 15	BHI 16	BHI 17	BHI 18
L-Arabinose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Xylose	-	±	±	+	±	±	-	-	±	-	±	-	±	+	±	±	±
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	±	±	±	±	±	-	-	±	+	±	-	±	±	±	±	±
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	±	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-
D-Sorbitol	±	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-
Salicine	+	-	-	+	-	-	-	±	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Cellobiose	±	-	-	+	-	-	-	±	-	±	-	-	-	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
D-Trehalose	±	-	-	±	-	-	-	±	-	±	-	-	-	±	-	-	-
Inuline	±	-	±	±	-	±	-	±	±	±	-	-	±	±	±	-	±
D-Mélézitose	±	+	-	+	+	-	-	±	-	±	+	-	-	+	-	+	-
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gluconate	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Species	<i>breve</i>	<i>longum</i>	<i>infantis</i>	<i>Adolescentis</i>	<i>longum</i>	<i>infantis</i>	<i>bifidum</i>	<i>thermophilum</i>	<i>infantis</i>	<i>breve</i>	<i>longum</i>	<i>bifidum</i>	<i>infantis</i>	<i>Adolescentis</i>	<i>Infantis</i>	<i>longum</i>	<i>infantis</i>

(+) : Réaction positive ; (-) : Réaction négative; (±) : variable,

Tableau 4.15 : Fermentation des carbohydrates des souches bifides isolées à partir des selles de nourrisson

Fermentation of sugars	BHI 19	BHI 20	BHI 21	BHI 22	BHI 26	BHI 31	BHI 32	BHI 33	BHI 34	BHI 35	BHI 42	BHI 43	BHI 44	BHI 45
L-Arabinose	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
D-Ribose	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Xylose	-	-	±	±	+	±	-	+	-	±	-	-	±	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	-	±	±	±	±	-	±	+	±	-	+	±	±
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	±	-	±
D-Sorbitol	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	±	-	±
Salicine	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Cellobiose	±	-	-	-	+	-	-	-	±	-	-	±	-	+
Maltose	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	+
D-Saccharose	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	+
D-Trehalose	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	±	-	±
Inuline	±	-	-	±	±	±	-	-	±	-	-	±	±	±
D-Mélézitose	±	-	+	-	+	-	-	-	±	+	-	±	-	+
D-Raffinose	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Amidon	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gluconate	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Species	<i>breve</i>	<i>bifidum</i>	<i>longum</i>	<i>infantis</i>	<i>Adolescentis</i>	<i>infantis</i>	<i>bifidum</i>	<i>suis</i>	<i>breve</i>	<i>longum</i>	<i>bifidum*</i>	<i>breve</i>	<i>infantis</i>	<i>Adolescentis</i>

(+) : Réaction positive ; (-) : Réaction négative; (±) : variable,

4.7.2 Résultats d'évaluation des propriétés probiotiques des souches lactiques et pseudolactiques

Selon les suggestions de la FAO/OMS [350], l'évaluation du potentiel de survie des souches probiotiques durant leur passage dans le tractus gastro-intestinal [351] est très important ainsi que leur effet promotionnel pour la santé en tant que cellules viables métaboliquement actives lorsqu'elles arrivent au niveau du côlon [352].

4.7.2.1 Résultats de la tolérance aux faibles pH

Dans cette étude, la tolérance de quatorze (14) souches lactiques et trente-un (31) souches bifides à des faibles pH (pH 2,0, 3,0 et 5,0) a été évaluée, afin de sélectionner les souches résistantes aux conditions acides. Seulement onze (11) souches lactiques et sept (7) souches bifides ont été sélectionnées.

Le taux de survie des isolats a varié durant l'incubation (Figure 4.13 et 4.14). Toutes les souches lactiques et des bifidobactérie ont survie à pH 3 et 5, par contre les souches BHI 21, 43, 42, 15 et 22 ont été les plus sensibles aux conditions acides après 4 h d'incubation parmi toutes les souches testées. Cependant, à pH 2,0, les souches Ec 01, BHI 34, 43, 32, 42, 22, 44, 16 et 9 ont perdues leurs viabilité après 3 h d'incubation, tandis que les souches Pc 01 et Pc 02 après 2 h d'incubation. Alors que, les souches Sc 01, Sc 02, Sc 03 après 1 h. KIM et al. [353] ont reporté que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *lactis* isolées à partir de lait ont perdu leur viabilité à pH 2.

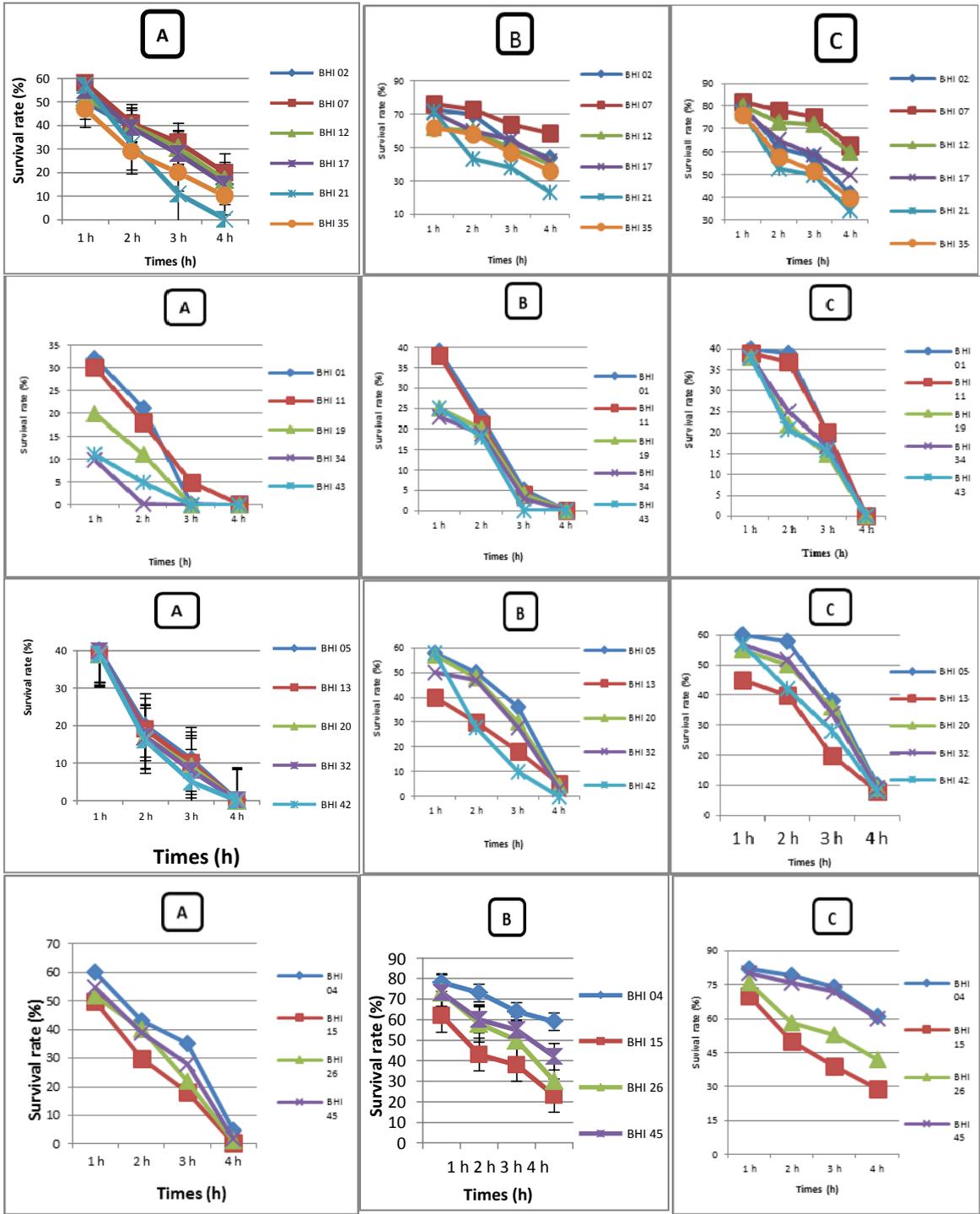
La souche *Bf. bifidum* (BHI 07) a montré le taux de survie (SR = 63 %) le plus élevé significativement ($P < 0,05$), après 4 h d'incubation que les autres isolats et suivi par *Bf. adolescentis* (BHI 04), *Bf. infantis* (BHI 03), *Bf. thermophilum* (BHI 08), *Bf. suis* (BHI 33). Cependant, les souches lactiques ont montrées des taux de survie plus élevés avec 73 % pour la souche *Lc. cremoris* (Lc 03) suivi par Pc 01, Lb 01, Sc 02 et EC 02.

Lorsque nous comparons nos résultats avec ceux rapportés par XANTHOPOULOS et al. [354] et qui y ont montrés que les souches *Lactobacillus* sp. (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* et *L. reuteri*) à partir des selles de nourrisson, leurs tolérance de survie aux faibles pH (pH 3,0) variaient entre 0,01 % - 68,3 %. Tandis que, nos souches ont montrées une très bonne performance.

Toutes les souches lactiques et pseudolactiques à l'exception de *Pediococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bf. bifidum* (BHI07), *Bf. breve* (BHI01), *Bf. longum* (BHI 05), *Bf. adolescentis* (BHI 04) et *Bf. infantis* (BHI 03) étaient les souches les plus acido-tolérants avec une viabilité qui a variée entre 20 à 50 % à pH 2 et après 2h d'incubation. Des études similaires qui ont été réalisées par AL-SALEH et al. [355] ont rapporté que *Streptococcus thermophilus* DSM 20617 et *Bifidobacterium infantis* DSM 20088 ont été les plus sensibles aux conditions acide parmi toutes les souches bactériennes testées. Ces souches ont perdues leur viabilité à pH 2 et après 1,5 h d'incubation, mais à un pH = 3, la tolérance des souches à l'acidité a été améliorée à l'exception de *Streptococcus thermophilus*.

4.7.2.2 Résultats de la tolérance aux sels biliaires

Un autre facteur qui influe la viabilité des micro-organismes dans l'estomac est la présence des sels biliaires. La tolérance des souches lactiques ainsi que les bifidobactéries aux sels biliaires a été évaluée. Les résultats ont montrés que toutes les souches ont préservées leurs viabilités en présence d'une concentration de 0,3 % (w/v) de sels biliaires, avec un taux de survie maximum et qui a varié de 9 à 32 % (Fig. 4.15 et 4.16). En comparaison avec le contrôle négatif, il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$). Les souches bifides BHI 34, 43, 20, 42 et 15 n'ont pas pu se développer en présence de 1 % après 3 h d'incubation. La souche *Bf. bifidum* (BHI 07) a montré un maximum de tolérance à 1,0 % alors que les souches *Bf. longum* (BHI 02, 12, 17, 35) et *Bf. infantis* (BHI 03, 06, 14, 18) ont montrées une forte tolérance aux sels biliaires.



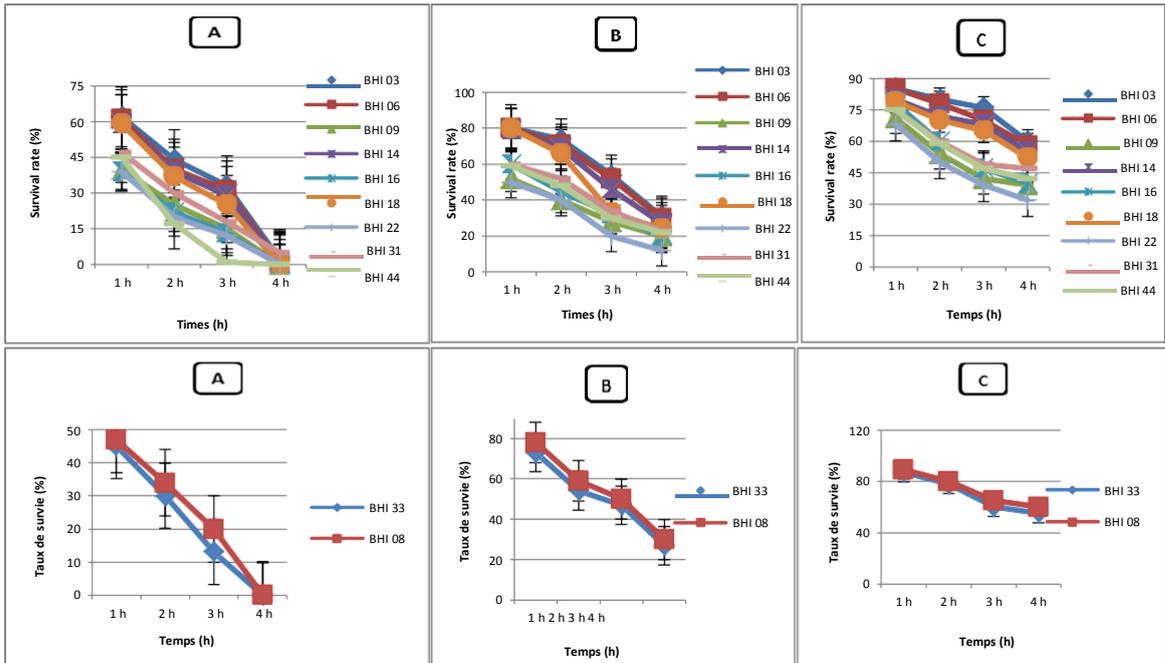


Figure 4.13 : Taux de survie des *Bf. longum* (BHI 02, BHI 05, BHI 12, BHI 17, BHI 21, BHI 35), *Bf. breve* (BHI 01, BHI 11, BHI 19, BHI 34, BHI 43), *Bf. bifidum* (BHI 07, BHI 13, BHI 20, BHI 32, BHI 42), *Bf. adolescentis* (BHI 04, BHI 15, BHI 26, BHI 45); *Bf. infantis* (BHI 03, BHI 06, BHI 09, BHI 14, BHI 16, BHI 18, BHI 22, BHI 31, BHI 44); *Bf. suis* (BHI 33); *Bf. thermophilum* (BHI 08), à pH 2 (A); pH 3 (B) ; pH 5 (C) après 4 h d'incubation à 37 °C. Les barres représentent les erreurs types des moyennes

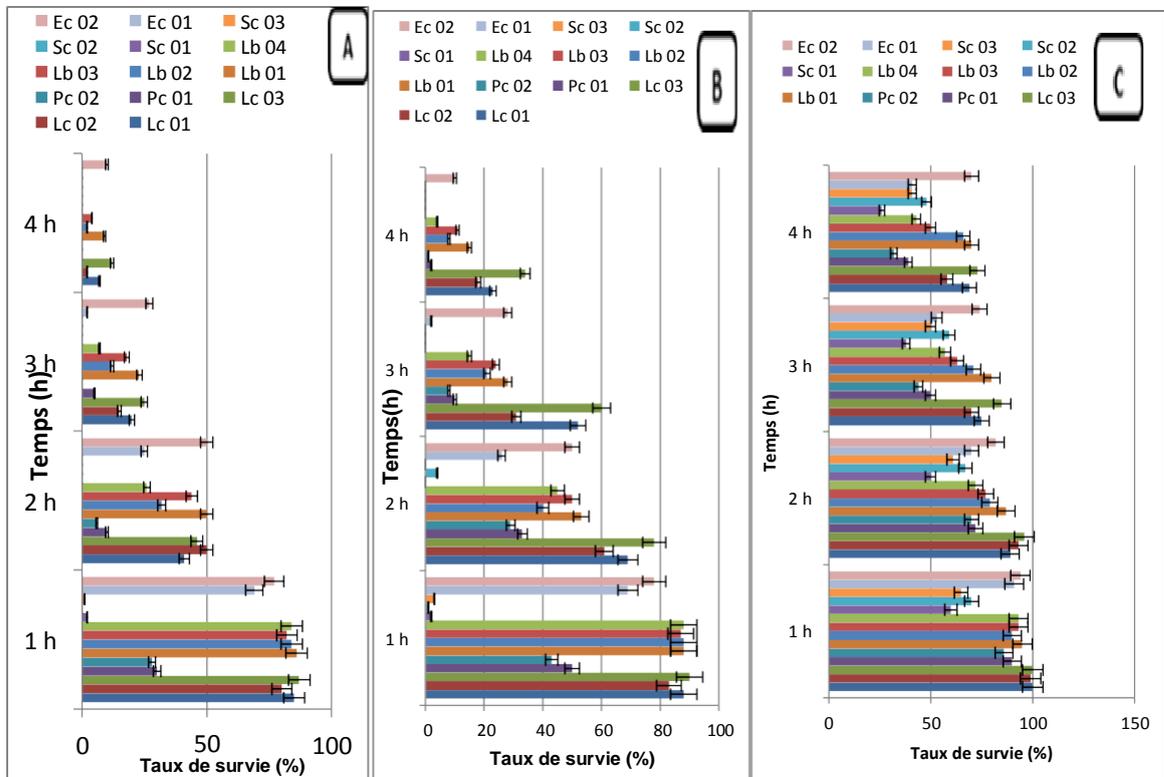
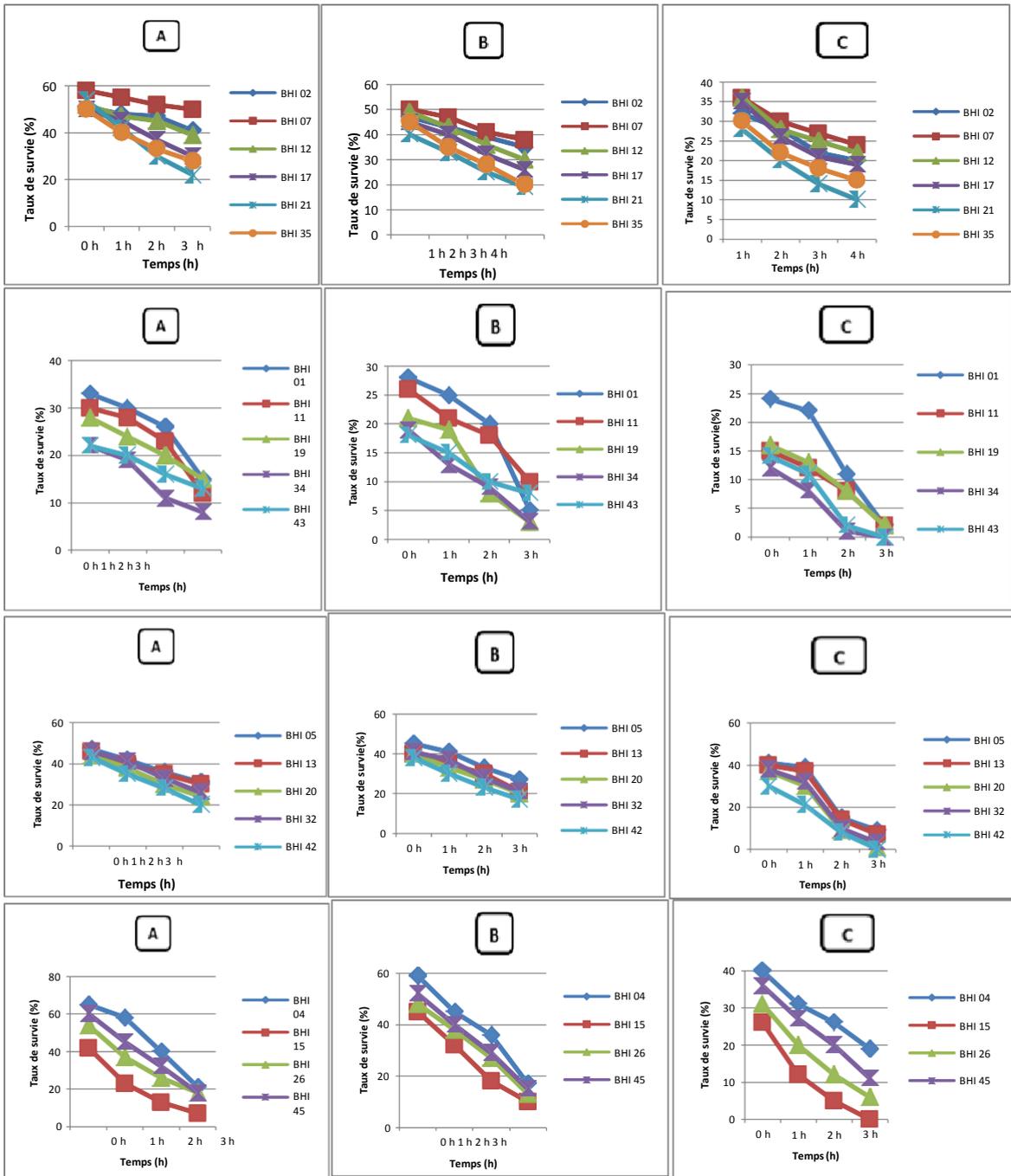


Figure 4.14 : Taux de survie des souches lactiques sous les conditions acides à pH 2 (A); pH 3 (B); pH 5 (C) après 4 h d'incubation à 37 °C. Les barres représentent les erreurs types des moyennes



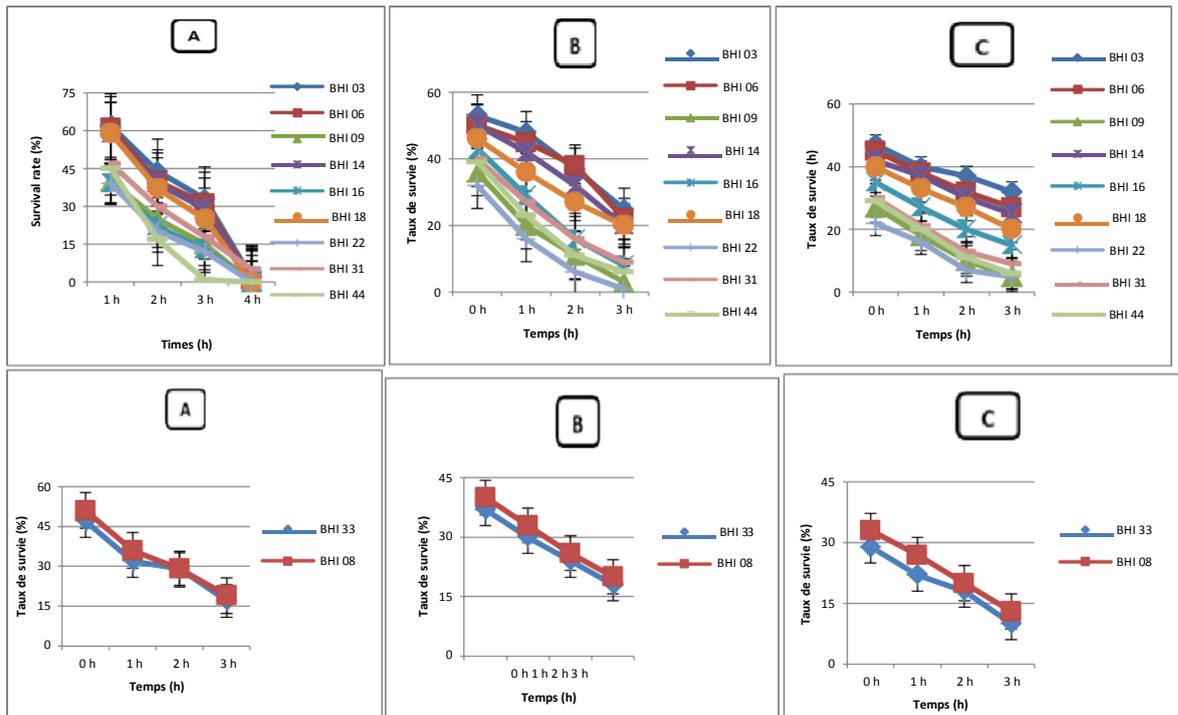


Figure 4.15 : Taux de survie de *Bf. longum* (BHI 02, BHI 05, BHI 12, BHI 17, BHI 21, BHI 35), *Bf. breve* (BHI 01, BHI 11, BHI 19, BHI 34, BHI 43), *Bf. bifidum* (BHI 07, BHI 13, BHI 20, BHI 32, BHI 42), *Bf. adolescentis* (BHI 04, BHI 15, BHI 26, BHI 45); *Bf. infantis* (BHI 03, BHI 06, BHI 09, BHI 14, BHI 16, BHI 18, BHI 22, BHI 31, BHI 44); *Bf. suis* (BHI 33); *Bf. thermophilum* (BHI 33), à 0,3 % (A), 0,5 % (B), 01 % (C) de sels biliaries (n = 3). Les barres représentent les erreurs types des moyennes

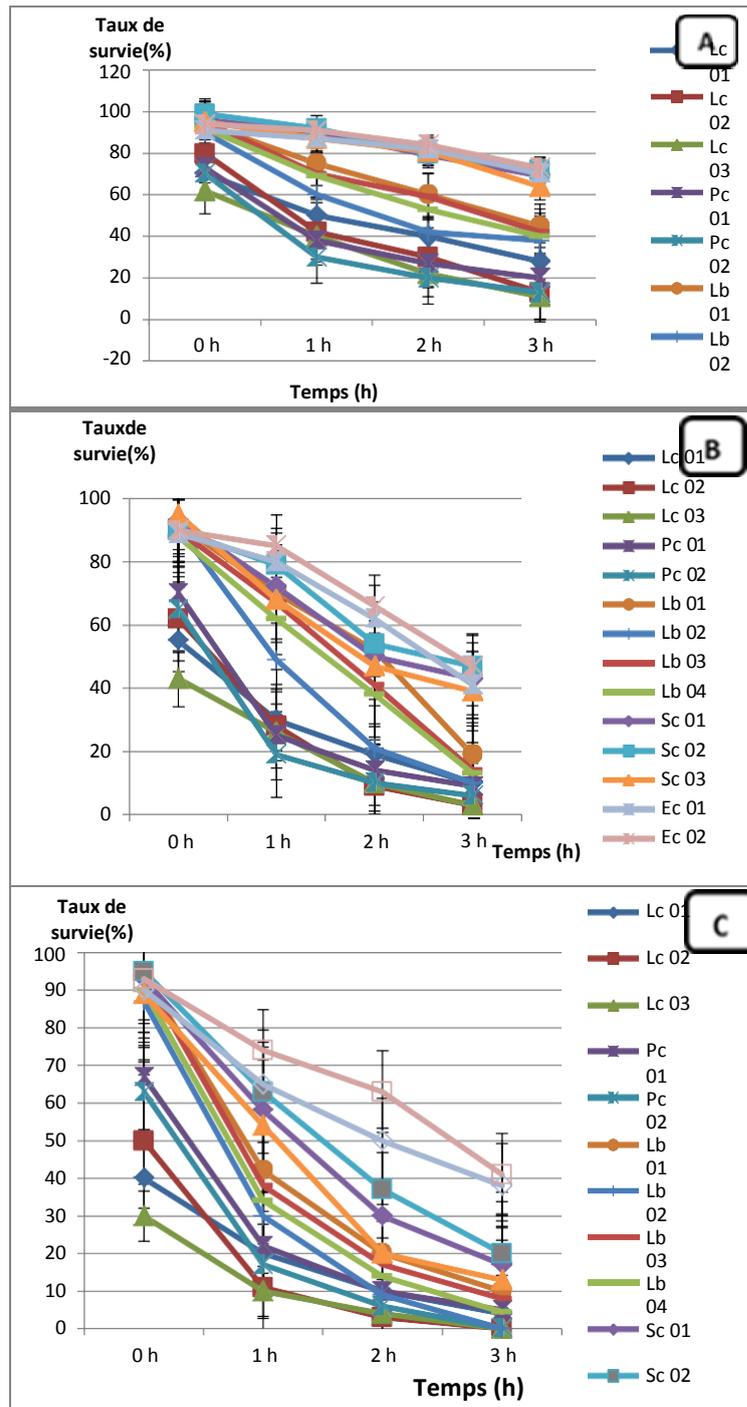


Figure 4.16 : Taux de Survie à 0,3 % (A), 0,5 % (B), 01 % (C) de sels biliars des souches LAB : (♦) *Lc. lactis* (Lc 01), (■) Lc 02, (▲) Lc 03, (◇), (×) Pc 01, (*) Pc 02, (●) Lb 01, (I) Lb 02, (+) Lb 03, (-) Lb 04, (_) Sc 01, () Sc 02, (◇) Ec 01, (□) Ec 02. Les barres représentent l'erreur-type des moyennes de trois essais.

Afin de survivre et de s'adapter au TGI, certaines propriétés probiotiques sont souhaitables tel-que la capacité de résister à l'acidité (pH 2,5 - pH 3,5) de l'estomac [356] et l'exposition à la bile dans la partie supérieure de l'intestin. GILLILAND et al. [357] et GOLDIN et al. [358] ont rapporté qu'une concentration de 0,3 % de sels biliaries est appropriée pour la sélection des probiotiques. Dans cette étude, l'exposition à pH 2 était un facteur très important pour la sélection des souches probiotiques, donc nous avons pu sélectionner trois (3) bactéries lactiques (Lc 03, LB 01 et Ec 02) parmi les quatorze (14) testées et cinq (5) souches bifides (*Bf. longum* (BHI 07, 12, 17, 02 et 35)) parmi les trente-un (31) testées et qui y ont survie après 4 h d'exposition. Ces souches ont également été potentielles dans les tests d'acide et de bile, ce qui suggère leurs survies dans l'estomac et dans l'intestin humain.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouver par PYOUNG IL KIM *et al.* [359] et CHEN Li-Shui et al. [360] qui ont rapporté qu'un écart significatif de la survie des souches dans le suc gastrique et leurs croissance dans un milieu contenant 0,3 % (w/v) de la bile. XANTHOPOULOS et al. [354] ont rapporté que les souches de *Lactobacillus* sp. (*Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. reuteri*) isolées à partir des fèces de nourrisson ont été testées pour leurs aptitudes à résister à des faibles pH (pH 3,0) et aux sels biliaries. Le taux de survie des souches testées a varié entre 0,01 % - 68,3 % à pH 3,0 et 10,3 % - 57,4 %, en présence de 0,15 % de sels biliaries. Une autre étude a montrée que toutes les cellules de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* ont perdus leurs viabilités à pH 2,0 et en présence de 0,2 % de sels biliaries [361]. Lorsque nous comparons nos résultats avec ces résultats rapportés, nous pouvons constater que, nos souches ont présentées des bonnes aptitudes à des faibles pH ainsi qu'une bonne tolérance aux sels biliaries.

Trois (3) souches lactiques et vingt-quatre (24) souches bifides ont été exclues dans cette étude, on se base sur ces critères et seulement onze (11) souches lactiques et cinq (5) souches bifides ont été sélectionnées pour être l'objet de des analyses ultérieures. Si on prend en considération, les deux critères ensemble la tolérance au suc gastrique et à la bile, il semble que la souche *Bf. bifidum* (BHI 07) a l'aptitude le plus élevé significativement de survivre pendant le transit gastro-

intestinal ($P < 0,05$). Par conséquent, elle peut être potentiellement utilisée comme une souche probiotique.

4.7.3 Résultats des propriétés technologiques

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques, elle demeure l'une de leurs propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière.

4.7.3.1 Résultats du pouvoir acidifiant

Le pouvoir acidifiant des dix-huit (18) souches sélectionnées précédemment a été évalué. Parmi les onze (11) souches lactiques et sept (7) souches bifides examinées, seulement cinq (5) souches lactiques et une autre souche bifide ont été avérées fortement acidifiantes avec une production d'acide lactique, qui a été accompagnée avec un abaissement de pH du milieu. Ces résultats sont illustrés dans Figure L.1 (en Appendice L).

Les valeurs d'acidité trouvées présentent des variations plus ou moins importantes entre les différentes espèces ($p < 0,05$). Ils variaient entre 1,5 et 2,8 g d'acide lactique/ 100 mL à T_0 , après 6 h d'incubation, l'acidité a augmentée progressivement ($p < 0,05$) et a variée entre 1,9 et 3,8 g d'acide lactique/ 100 mL Figure L.2 (en Appendice L).

Après 48 h d'incubation, le pH du milieu de culture a diminué jusqu'à des valeurs inférieures à 3,94 et l'acidité a atteint une valeur de 10 g d'acide lactique/ 100 mL pour la souche Lb 02. Bien que, la souche Pc 02 a présentée le pouvoir acidifiant le plus significatif avec $\Delta \text{pH} = 2,58$ ($p < 0,05$) suivi par Lb 02 ($\Delta \text{pH} = 2,36$) (Tableau I.3 en Appendice I). Bien que les souches *Sc. thermophilus* (Sc 02) et *Sc. agalactiae* (Sc 03) ont été les plus faiblement acidifiants avec un $\Delta \text{pH} = 1,05$ et 1,08 respectivement, avec une acidité de 3,4 et 3,1 g d'acide lactique/ 100 mL.

Pour les sept (7) souches de *Bifidobacterium*, durant la fermentation et après 48 h d'incubation, les valeurs de pH ont variées entre 6,41 et 4,86 avec un Δ pH = 0,38 et 1,84, respectivement (Tableau L.3 en Appendice L). Les souches *Bf. longum* (BHI 05) et *Bf. bifidum* (BHI 07) ont présentées le pouvoir acidifiant le plus important avec un Δ pH = 1,90 et 1,84, respectivement, et qui correspond au taux de croissance le plus élevé ($\mu = 6,58 \text{ h}^{-1}$) (alors que *Bf. suis* (BHI 33)) ont montré la plus faible croissance avec $\mu = 0,53 \text{ h}^{-1}$ (Tableau L.5 en Appendice L). Une faible acidification a été observée pour les souches *Bf. adolescentis* (BHI 04) et *Bf. suis* (BHI 33) avec un pH de 6,35 et 6,41, respectivement, après 48 h de fermentation. Nos résultats ont montrés qu'il existe une corrélation positive ($r = 0,98$ pour la souche *Bf. bifidum* et $r = 0,97$ pour la souche *Bf. adolescentis*) entre le pouvoir acidifiant et le taux d'accroissement des souches.

Les résultats d'évaluation des propriétés technologiques des souches lactiques et de *Bifidobacterium* obtenus sont plus importants que ceux trouvés par HERREROS et al. [362] et qui y ont rapporté que la souche *L. lactis* subsp. *lactis* a montrée le pouvoir acidifiant le plus important avec une acidité de 0,40 g d'acide lactique.100 mL⁻¹ après 6 h de fermentation et 0,65 - 0,70 g d'acide lactique.100 mL⁻¹ après 12 h de fermentation.

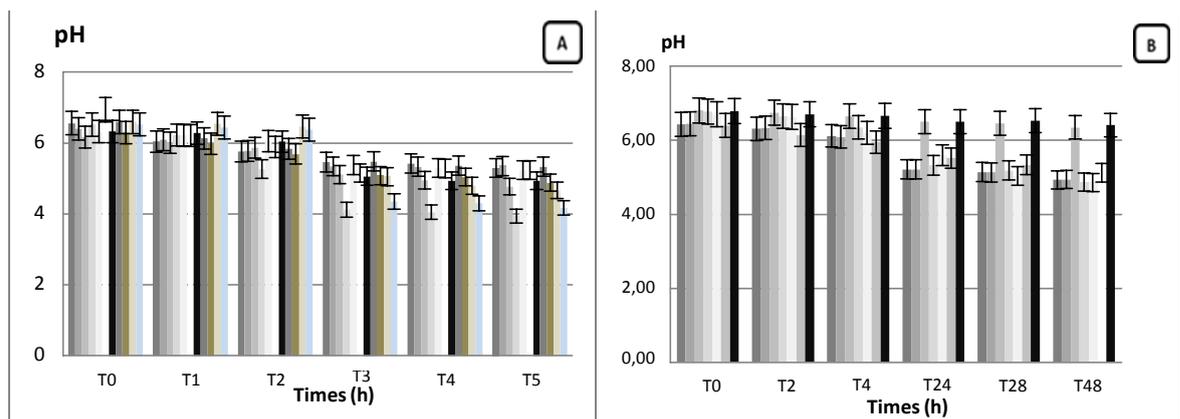


Figure 4.17 : Pouvoir acidifiant des souches lactiques et bifidobactéries. (A) souches lactiques : ■ *Lc. cremoris* (Lc 02), ■ *Lc. lactis* (Lc 03), ■ *Pc. cerevisiae* (Pc 01), ■ *Pc. acidilactici* (Pc 02), □ *Sc. boris* (Sc 01), ■ *Sc. thermophilus* (Sc 02), ■ *Sc. agalactiae* (Sc 03), ■ *Ec. faecium* (Ec 01), ■ *Ec. faecalis* (Ec 02), ■ *Lb. bulgaricus* (Lb 01), ■ *Lb. lactis* (Lb 02). (B) : souches bifidobactéries, ■ *Bf. breve* (BHI 01), ■ *Bf. infantis* (BHI 03), ■ *Bf. adolescentis* (BHI 04), ■ *Bf. bifidum* (BHI 05), ■ *Bf. longum* (BHI 07), □ *Bf. thermophilum* (BHI 08), ■ *Bf. suis* (BHI 33).

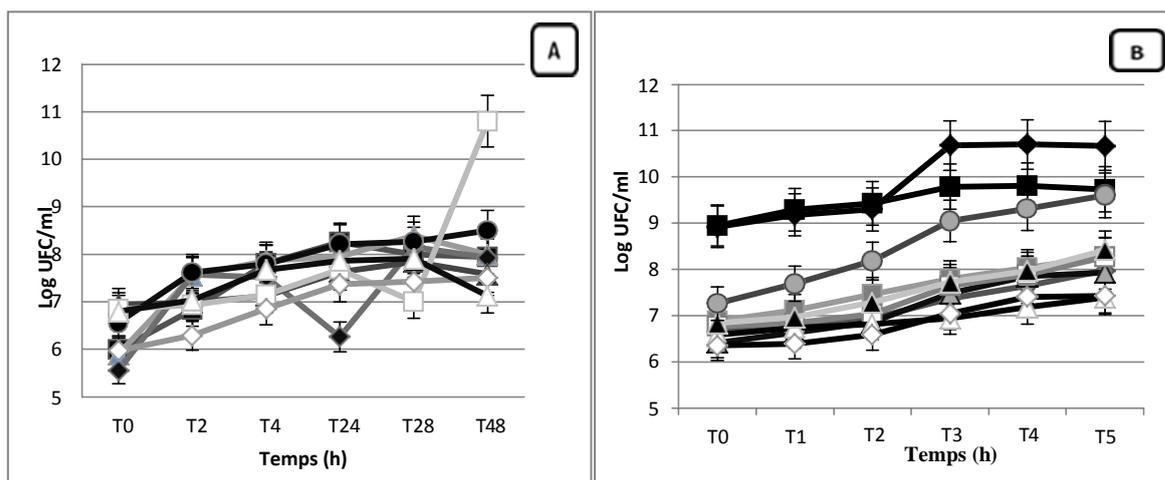


Figure 4.18 : Cinétique de croissance (Log UFC/ ml) des souches de bifidobactérie (A) et des bactéries lactique (B) cultivées sur le lait à 37 °C: (■) *Bf. breve* (BHI 01), (◆) *Bf. infantis* (BHI 03), (▲) *Bf. adolescentis* (BHI 04), (●) *Bf. bifidum* (BHI 05), (□) *Bf. longum* (BHI 07), (◇) *Bf. thermophilum* (BHI 08), (Δ) *Bf. suis* (BHI 33). (B) souches lactiques: (●) *Lc. cremoris* (Lc 02), (▲) *Lc. lactis* (Lc 03), (●) *Pc. cerevisiae* (Pc 01), (◆) *Pc. acidilactici* (Pc 02), (□) *Sc. boris* (Sc 01), (Δ) *Sc. thermophilus* (Sc 02), (◇) *Sc. agalactiae* (Sc 03), (▲) *Ec. faecium* (Ec 01), (□) *Ec. faecalis* (Ec 02), (◆) *Lb. bulgaricus* (Lb 01), (■) *Lb. lactis* (Lb 02). Les barres verticales représentent les écarts-types de la moyenne.

4.7.4 Résultats de la résistance des bactéries lactiques aux antibiotiques

Les souches ont été classées comme sensible (S) ou résistante (R) toute en se basons sur la zone d'inhibition à l'égard des antibiotiques tests et en tenant compte des directives rapportés par FEEDAP [363]. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.16. La sensibilité des souches a été évaluée selon la méthode de diffusion en gélose Muller-Hinton à l'égard de onze antibiotiques.

Dans la présente étude, il a été constaté que les sept (7) souches de *Bifidobacterium* étaient sensibles à l'ampicilline, l'acide fusidique, l'érythromycine, l'oxacilline, la chloramphénicol, la pénicilline, l'amoxicilline, la gentamicine, la streptomycine et la céfoxitine à l'exception des souches *Bf. breve*, *Bf. adolescentis* qu'elles étaient résistantes à la céfoxitine alors que les souches *Bf. longum*, *Bf. thermophilus*, *Bf. suis* étaient résistantes à l'oxacilline. Alors que la souche *Bf. bifidum* était résistante à trois antibiotiques (la Pénicilline, l'oxacilline et la céfoxitine) et aussi elle a été intermédiaire à trois antibiotiques (l'amoxicilline, la gentamicine et la céfoxitine).

Tableau 4.16 : Résistance des bactéries lactiques et bifides aux antibiotiques

Inhibition zone											
Symbol	AM	FA	E	OX	C	P	FOX	AX	CN	S	CE
µg/disc	10 µg	10 µg	15 µg	1 µg	30 µg	¹⁰ U	30 µg	25 µg	10 µg	10 µg	30 µg
<i>Lc. lactis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
<i>Pc. acidilactici</i>	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	I
<i>Sc. boris</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I
<i>Ec. faecalis</i>	S	I	I	R	I	R	R	R	S	S	S
<i>Lb. Lactis</i>	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S
<i>Bf. breve</i>	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	I
<i>Bf. infantis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bf. adolescentis</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I
<i>Bf. bifidum</i>	S	S	S	R	S	R	R	I	I	S	I
<i>Bf. longum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Bf. thermophilus</i>	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I
<i>Bf. suis</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	S		-	-	S	-	I	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	S		S	S	I	I	I	S	S	S	S

R: résistante, I : intermédiaire, and S : sensible; AM, Ampicilline; FA, Acide Fusidique; E, Erythromycine; OX, Oxacilline; C, Chloramphénicol; P : Pénicilline; FOX, Cefoxitine; AX, Amoxicilline, CN, Gentamicine, S, Streptomycine; CE, Cefotaxime.

Des études récentes ont rapportés que parmi les différentes espèces de bifidobactéries, la souche *Bf. breve* possède un potentiel élevé de résistance vis-à-vis plusieurs antibiotiques que d'autres espèces de *Bifidobacterium* [364].

Des études antérieures ont rapportées que les bifidobactéries sont hautement résistantes à la kanamycine, la gentamicine, l'acide fusidique, la streptomycine, la polymyxine B, l'acide nalidixique, la paromomycine, la néomycine et sensibles à la pénicilline G [365-367], la métronidazole, la tétracycline, l'aztréoname, le céphalotine, la bacitracine, la rifampicine et la bacitracine [368].

Bien que, les souches *Lc. lactis*, *Pc. acidilactici*, *Sc. boris* étaient résistantes à huit antibiotiques testés (l'ampicilline, l'acide fusidique, l'érythromycine, l'oxacilline, la chloramphénicol, la pénicilline, l'amoxicilline) mais ils y étaient sensibles aux trois antibiotiques (la gentamicine, la streptomycine et la céfoxitine). DELGADO et al. [369] ont rapporté que les espèces *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* ont montrées une résistance à une teneur élevée de la céfoxitine (CMI $\geq 30 \mu\text{g.ml}^{-1}$), alors que les espèces de *Bifidobacterium* ont été très

sensibles. Toutefois, les souches résistantes à ces agents ont été identifiées également [369, 370], ainsi que plusieurs gènes qui ont prouvés leurs résistances ont été étudiés tel-que : le gène *cat* résistant à la chloramphénicol a été trouvé chez *Lactobacillus reuteri* [371] et *Lactobacillus plantarum* [372] ; différents gènes résistants à l'érythromycine (ERM) ont été trouvés dans de nombreuses espèces [373], et de nombreux gènes de résistance à la tétracycline-tet (K, M, O, Q, S, W, 36) [374]. Bien que, d'autres études ont rapportées que la souche *Lc. lactis* a montrée une résistance à la clindamycine, le chloramphénicol, la streptomycine, la tétracycline et l'érythromycine [375].et qu'elle possède trois différents plasmides de résistance aux antibiotiques (pour la tétracycline (tet (S)) [376], la chloramphénicol et la streptomycine (tet (M)) [377].

Le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques constitue une problématique importante qui doit être explorée. En fait, l'une des définitions essentielles des micro-organismes qui peuvent être utilisés dans les préparations alimentaires (par ex. les souches probiotiques *Bf. lactis*, *Bf. breve*, et *Bf. bifidum*) ne doivent pas présenter un gène de transfert de résistances aux antibiotiques. Bien qu'il est clair que l'application simultanée des probiotiques sensibles avec des antibiotiques consommés par voie orale est généralement insignifiant, et qu'il sera très intéressant d'utiliser des probiotiques résistantes en combinaison avec des antibiotiques appropriés lors d'une infection microbienne [378].

Les bifidobactéries sont de plus en plus employées dans la production d'aliments fonctionnels, seulement quelques études [367, 379] ont été réalisées dans le but de définir la résistance/sensibilité aux antibiotiques des bactéries bifides. La résistance aux antibiotiques n'est pas un point commun chez les souches lactiques et bifides des espèces laitières et intestinales. Cependant, plusieurs souches ont été considérées comme résistantes à certains antibiotiques, et l'on croyait acquis des gènes de résistance [380]. Selon la Commission européenne, il peut être conclu que les souches n'ayant pas de gènes de résistance et peuvent être utilisées en tant que des levains. L'hypothèse de la banque de gènes de résistance suggère que les populations bactériennes bénéfiques et commensales peuvent jouer un rôle dans le transfert de la résistance aux antibiotiques à des bactéries pathogènes et opportunistes [381, 382].

4.7.5 Activité antimicrobienne des souches d'intérêt

L'activité antimicrobienne est un critère très important pour la sélection des levains à potentiel antagoniste contre les bactéries pathogènes provoquant de la diarrhée ou d'autres maladies intestinales et des cultures probiotiques [369].

La capacité d'inhibition des surnageants de la souche bifide BHI 07 (*Bf. bifidum*) et les cinq souches lactiques (*Lc. lactis*, *Pc. acidilactici*, *Sc. boris*, *Ec. faecalis*, *Lb. lactis*) sélectionnées comme les plus acidifiants avec un taux de survie le plus important et aussi pour leur résistance aux conditions acides et aux sels biliaire a été déterminée à l'égard de quatre souches pathogènes à savoir : *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 selon la méthode de diffusion sur gélose.

Toutes les souches lactiques et bifidobactéries ont présentées des larges spectres d'activité antibactérienne contre les souches pathogènes testées (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876) mais vis-à-vis la souche pathogène *Salmonella typhimurium* ATCC 14012, les souches en culture seule à savoir : *Bf. bifidum*, *Lc. lactis*, *Sc. boris*, *Ec. faecalis* en ainsi que la souche *Bf. bifidum* en culture mixte avec *Sc. boris* ont présentées un spectre d'inhibition très restreint (tableau 4.17). Les souches qui présentent des zones d'inhibition supérieure à 2 mm sont considérées comme producteurs de substances antibactériennes [383].

La souche *E. coli* ATCC 25922 a été plus sensible à la souche *Bf. bifidum* en culture mixte avec *Ec. faecalis* avec une zone inhibition d'un diamètre de $35 \pm 0,83$ mm suivi par la souche *Bf. bifidum* en culture mixte avec *Lc. lactis* ($31 \pm 1,12$ mm) mais cette souche en culture seule a présentée un spectre d'inhibition moins important ($25 \pm 1,83$ mm) qu'en culture mixte avec les souches lactique. Alors que, la souche *Sc. boris* en en culture seule a montrée le plus faible spectre d'inhibition ($9 \pm 0,8$ mm) (tableau 4.17).

La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a été la plus sensible à la souche *Bf. bifidum* en culture mixte avec *Lc. lactis* ($37 \pm 1,54$ mm) suivi par *E. coli* ATCC 25922 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 en présence de *Bf. bifidum* en culture mixte avec *Ec. faecalis* ($35 \pm 0,83$ mm, $34,5 \pm 0,45$, respectivement). Mais l'effet inhibiteur de la souche *Bf. bifidum* en culture seule à l'égard de ces trois bactéries pathogènes a été moins important qu'en culture mixte. Le contrôle positif (tétracycline) a présenté une zone d'inhibition à l'égard de tous les agents pathogènes avec un diamètre qui a varié entre 14 et 29 mm.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par JUVEN et al. [384] et JIN et al. [385], ainsi que la souche *Bf. bifidum* en culture mixte était plus active qu'en culture seule, ces résultats ont été trouvés aussi par KHEDKAR et al. [386] et qui ont rapporté une activité antibactérienne remarquable de la souche *Bf. longum* DSM 20097 à l'égard des deux souches pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Tandis que, lorsque cette souche est cultivée en culture mixte avec *Lb. paracasei* et *Lb. acidophilus* ou *Lb. plantarum*, il a été semblé qu'elle a été plus actif à l'égard des souches indicatrices.

L'activité antimicrobienne des bifidobactéries a été rapportée pour la première fois par TISSIER [387] et qui a décrit divers types d'effet antagoniste de *Bf. bifidum* contre *E. coli*. De nombreuses activités antagonistes des bifidobactéries ont été documentées et qu'elles étaient induite en grande partie à la production d'acide lactique et d'acide acétique ou aux bactériocines [231, 388, 389]. YILDIRIM et al. [231] ont décrit une bactériocine (bifidocin B) produite par *Bf. bifidum* NCFB 1454, qui s'est révélée actif contre certaines bactéries comme *Listeria sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.* et *Leuconostoc sp.* et qu'elle est codée par un plasmide de 8,4 kb.

Tableau 4.17 : Effet antagoniste de la souche pseudolactique *Bf. bifidum* et des souches lactiques en culture seule et en co-culture à l'égard des souches pathogènes

Souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
Cultures seules				
<i>Bf. bifidum</i>	25 ± 1,83	24 ± 1,23	21 ± 1,49	1,2 ± 0,45
<i>Lc. lactis</i>	17,5 ± 0,9	19 ± 0,09	13 ± 1,36	0,8 ± 0,5
<i>Pc. acidilactici</i>	21 ± 1,2	23 ± 0,05	19 ± 0,02	3,78 ± 0,14
<i>Sc. boris</i>	09 ± 0,8	14 ± 1,03	10 ± 0,09	0,3 ± 0,91
<i>Ec. faecalis</i>	18 ± 1,05	22 ± 0,17	20 ± 1,06	0,9 ± 0,67
<i>Lb. factis</i>	20 ± 1,53	18 ± 1,4	23 ± 0,38	3,5 ± 0,65
Cultures Mixtes				
<i>Bf. bifidum/ Lc. lactis</i>	31 ± 1,12	37 ± 1,54	27 ± 0,16	2,5 ± 0,34
<i>Bf. bifidum/ Pc. acidilactici</i>	28 ± 0,71	28 ± 0,48	25 ± 0,69	4 ± 0,12
<i>Bf. bifidum/ Sc. boris</i>	29 ± 1,41	29,5 ± 0,15	22 ± 1,50	1,7 ± 0,39
<i>Bf. bifidum/ Ec. laecalis</i>	35 ± 0,83	32 ± 1,67	34,5 ± 0,45	2,5 ± 0,78
<i>Bf. bifidum/ Lb. lactis</i>	27 ± 0,21	33 ± 0,31	32 ± 1,18	3,7 ± 1,3

Les souches examinées comprennent les souches qui ont survécues à une exposition à pH 2 et à une concentration de 0,3 % de sels biliaires pendant au moins une heure. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type de trois essais.

Dans cette étude la souche BHI 7 *Bf. bifidum* a été retenue comme étant la meilleure souche à propriétés technologiques et probiotiques pour faire l'objet de l'étude *in vitro* et *in vivo*.

4.8 Etude, *in vitro*, de l'activité antagoniste de la spiruline et de la chlorelle à l'égard des espèces du microbiote intestinal

4.8.1 Résultats d'isolement et identification des espèces intestinales

4.8.1.1 *E. coli*

Après observation macroscopique, les colonies sur gélose Mac conkey ont été de forme lenticulaire, de couleur rouge à contour régulier, de 1 à 2 mm de diamètre (Figure 4.19). Les examens microscopiques après la coloration de Gram ont révélées que les cellules ont été des Gram négatif, de forme bacille de 0,5 µm environ avec des extrémités arrondies, mobile, catalase positive et oxydase négative.

4.8.1.2 *Lactobacillus sp.*

Après observation macroscopique, les colonies sur gélose MRS ont été de forme plus allongée de couleur crémeuse (Figure 4.19). Les examens microscopiques après la coloration de Gram, ont révélées que les cellules ont été

des Gram positif, de forme bacille 0,5 à 2 μm environ en chaînette, non mobile, catalase négative, oxydase négative.

4.8.1.3 Bactéroides

Après observation macroscopique, les colonies sur gélose BBE ont été de forme lenticulaire, de couleur grise cernées d'un halo marron à noir avec un contour régulier et d'un diamètre de 1 à 1,5 mm (Figure 4.19). Les examens microscopiques après la coloration de Gram, ont révélées que les cellules ont été des Gram négatif, de forme bacille avec extrémités arrondies, immobile, catalase négative, oxydase négative.

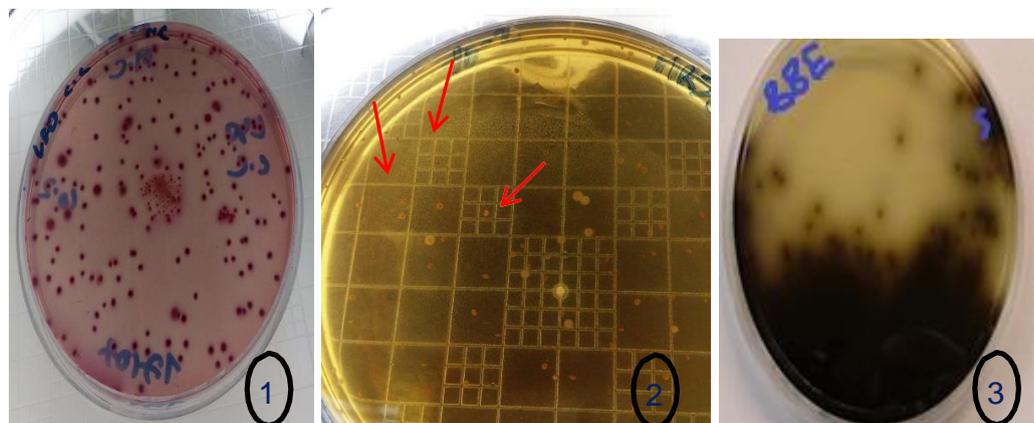


Figure 4.19 : Photos des observations macroscopiques des colonies de *E. coli* (1), *Lactobacillus* (2) et bactéroides (3) sur gélose.

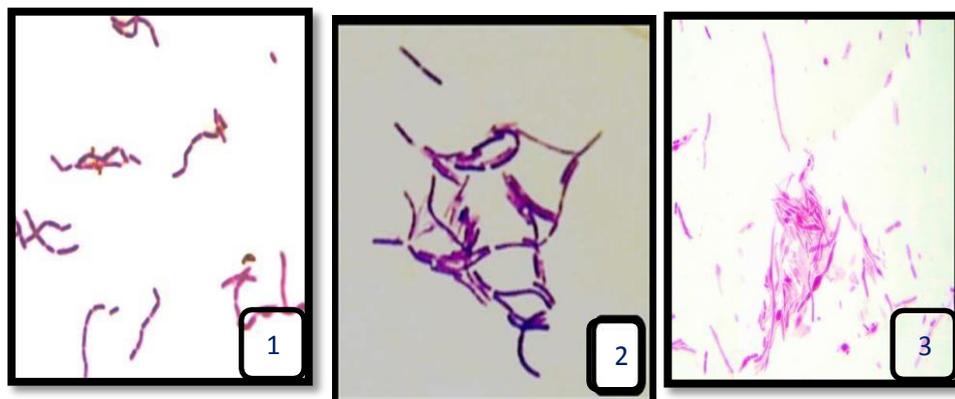


Figure 4.20 : Observation microscopique après coloration de Gram (1) *E. coli*, (2) *Lactobacillus* sp., (3) *Bacteroide* sp. (1000 x).

Les résultats de l'identification biochimique des souches isolées par la galerie API 20 E sont représentés dans le tableau 4.18.

Tableau 4.18 : Résultats d'identification biochimique des souches isolées sur gélose Mac conkey, MRS et BBE par API 20 E

Test	Souches		
	<i>E. coli</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterobacter</i>
ONPG	+	-	-
<u>ADH</u>	-	-	-
<u>LDC</u>	+	+	+
<u>ODC</u>	+	+	+
<u>CIT</u>	-	-	+
<u>H₂S</u>	-	-	-
<u>URE</u>	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	+	-	-
<u>VP</u>	-	+	+
<u>GEL</u>	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	+	+	+
SOR	+	+	+
RHA	+	+	+
SAC	+	+	+
MEL	+	+	+
AMY	+	+	+
ARA	+	+	+

ONPG : Ortho-nitrophenylgalactoside, ADH : Arginine, LDC : Lysine, ODC: Ornithine, CIT : Citrate de sodium, H₂S : Thiosulfate de sodium, URE : Urée, TDA : Tryptophane, VP : Pyruvate de sodium, GEL : Gélatine, GLU : Glucose, MAN : Mannitol, INO : Inositol, SOR : Sorbitol, RHA : Rhamnose, SAC : Saccharose, MEL : melibiose, AMY : amygdaline, ARA : Arabinose.

D'après les résultats d'identification morphologique et biochimique et après trois repiquages, nous pouvons dire que trois souches isolées à partir de la flore intestinale résidente appartiennent aux espèces suivantes : *E. coli*, *Bacterioide* sp. et *Lactobacillus* sp. ont été retenues pour faire l'objet des études *in vitro* ultérieurs.

4.8.2 Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sur le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance de la souche *Bf. bifidum*

Un suivi de pH, d'acidité du milieu inoculé avec la souche pseudolactique *Bf. bifidum* BHI 7 ainsi que la cinétique de croissance de cette souche a été effectuée dans le but d'évaluer l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues *S. platensis* et *C. pyrenoidosa* à différentes concentrations (1, 3, 5 et 10 % (g/v)) seule et en combinaison.

4.8.2.1 Résultats du pouvoir acidifiant

D'après les résultats, il ressort que la supplémentation avec les quatre concentrations testées avec les deux microalgues la cyanobactérie et l'algue verte ont influencées positivement sur le taux de survie de la souche expérimentale *Bf. bifidum*. Nous avons constaté une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'acidité titrable accompagnée d'un abaissement de pH du milieu réactionnel enrichi entre 4 h à 48 h de fermentation en comparaison avec le contrôle (tableaux 4.19 et 4.20). Cela est dû probablement à l'effet promoteur de la biomasse algale de la croissance bactérienne.

Le pH initial (à 0 h) du milieu réactionnel enrichi avec la plus forte concentration d'algue (10 %) a été plus élevé que celui des autres concentrations ainsi que le témoin (tableaux 4.19 et 4.20). Cela est dû au caractère alcalin (une solution aqueuse de 40 mg/mL de spiruline et de chlorelle a un pH de 8) de la microalgue et qu'elle possède également une grande capacité tampon.

Un pouvoir acidifiant de la souche BHI 7 significativement le plus faible ($p < 0,05$) a été observé dans le milieu réactionnel avec un enrichissement de 1 % de chaque algue seule ou la combinaison des deux. Bien que, avec une concentration de 10 % de spiruline et de chlorelle, nous avons observé un fort pouvoir acidifiant avec un Δ pH de (0,3 et 2,74, respectivement) et un temps maximum d'abaissement de pH ($t_{\max-\text{pH-D}}$) de 120 min (tableau 4.19) tandis que, dans le milieu réactionnel contenant la combinaison des deux biomasses, ce temps a été de 120-240 min (tableau 4.19). Cependant, il a été de 240 min à 1440 min avec les concentrations (5 %, 3 % et 1 %), respectivement.

Tableau 4.19 : Résultat du suivi du pouvoir acidifiant de *Bf. bifidum* BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en spiruline

	pH ₀	pH _f	pH _{max}	t _{max-pHmax}	Δ pH	P value	mpH-DR (pH/min)	t _{max-A-D} (min-min)	Initial Acidity (°D)	Final acidity (°D)	mA-IR (°D/min)	P value
Control	6.41	5.03	5.87	150	1.38		0.00048 ^e	150	10	35	0,0087 ^e	
lait enrichi en spiruline (01 %) inoculé avec BHI 07	6.29	4.75	5.49	150	1.54		0.00053 ^d	150	22	58	0,0125 ^d	
lait enrichi en spiruline (03 %) inoculé avec BHI 07	6.30	4.69	5.93	150	1.61	<0,05	0.00056 ^c	150	20	60	0,0139 ^c	<0,05
lait enrichi en spiruline (05 %) inoculé avec BHI 07	6.33	4.02	4.95	120	2.31		0.00080 ^b	120	15	65	0,0174 ^b	
lait enrichi en spiruline (10 %) inoculé avec BHI 07	6.45	3.71	4.35	120	2.74		0.00095 ^a	120	12	70	0,0201 ^a	

Les moyennes de la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). pH₀ = pH moyen initial, pH_f = pH moyen final, pH_{max} = pH moyen maximal, mpH-DR = taux moyen de chute du pH, mA-IR = taux moyen augmentation de l'acidité, t_{max-pH-D} = temps de chute maximale du pH, t_{max-A-I} = temps de hausse maximale de l'acidité titrable.

Tableau 4.20 : Résultat du suivi du pouvoir acidifiant de *Bf. bifidum* BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en chlorelle

	pH ₀	pH _f	pH _{max}	t _{max-pHmax}	Δ pH	P value	mpH-DR (pH/min)	t _{max-A-D} (min-min)	Initial Acidity (°D)	Final acidity (°D)	mA-IR (°D/min)	P value
Control	6.07	4.50	5,43	150	1.67		0,00058 ^e	150	13	43	0,0104 ^e	
lait enrichi en chlorelle (01 %) inoculé avec BHI 07	5.83	4,27	5,23	150	1.56		0,00054 ^d	150	30	63	0,0115 ^d	
lait enrichi en chlorelle (03 %) inoculé avec BHI 07	5.85	4,22	5,46	150	1.63	<0,05	0,00057 ^c	150	37	85	0,0167 ^c	<0,05
lait enrichi en chlorelle (05 %) inoculé avec BHI 07	5.90	3,7	4,52	120	2.20		0,00076 ^b	120	41	97	0,0194 ^b	
lait enrichi en chlorelle (10 %) inoculé avec BHI 07	6.00	3,00	3,90	120	3.00		0,00104 ^a	120	46	85	0,0205 ^a	

Les moyennes de la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) pH₀ = pH moyen initial, pH_f = pH moyen final, pH_{max} = pH moyen maximal, mpH-DR = taux moyen de chute du pH, mA-IR = taux moyen augmentation de l'acidité, t_{max-pH-D} = temps de chute maximale du pH, t_{max-A-I} = temps de hausse maximale de l'acidité titrable.

Un pouvoir acidifiant de la souche BHI 7 significativement le plus faible ($p < 0,05$) a été observé dans le milieu réactionnel avec un enrichissement de 1 % de chaque algue seule ou la combinaison des deux. Bien que, avec une concentration de 10 % de spiruline et de chlorelle, nous avons observé un fort pouvoir acidifiant avec un Δ pH de (03 et 2,74, respectivement) et un temps maximum d'abaissement de pH (t_{max-pH-D}) de 120 min (tableau 4.19) tandis que, dans le milieu réactionnel contenant la combinaison des deux biomasses, ce temps a été de 120-240 min (tableau 4.19). Cependant, il a été de 240 min à 1440 min avec les concentrations (5 %, 3 % et 1 %), respectivement.

Les données relatives à l'abaissement du pH sont en accord avec celles de l'acidité titrable. La vitesse d'acidification la plus importante (0,0011 pH/min) a été enregistrée avec la concentration (10 %) de la combinaison des deux biomasses (tableaux 4.19 et 4.20), tandis qu'avec la même concentration mais en présence de chaque biomasse seule (*C. pyrenoidosa*, *A. platensis*), nous avons enregistré (0,0010 pH/min et 0,0009 pH/min, respectivement).

Tableau 4.21 : Résultats du suivi du pH et d'acidité titrable du lait écrémé seul et enrichi en combinaison de la spiruline et la chlorelle durant la fermentation avec *Bf. bifidum* BHI 07

	pH ₀	pH _f	pH tma x	t _{max- pHmax}	Δ pH	P value	mpH-DR (pH/min)	t _{max-A- D} (min- min)	Initial acidity (°D)	Final acidity (°D)	mA-IR (°D/min)	P value
Control	6,07	4,50	5,43	150	1,67		0,00058 ^e	150	13	43	0,0104 ^e	
lait enrichi en combinaison S. + C. (01%) inoculé avec BHI 07	6,00	4,40	5,26	150	1,60		0,00056 ^d	150	21	55	0,0118 ^d	
lait enrichi en combinaison S. + C. (03 %) inoculé avec BHI 07	6,10	4,02	5,31	150	2,08	<0,05	0,00072 ^c	150	22	66	0,0153 ^c	<0,05
lait enrichi combinaison S. + C. (05 %) inoculé avec BHI 07	6,20	3,97	4,80	120	2,23		0,00077 ^b	120	17	70	0,0184 ^b	
lait enrichi en combinaison S. + C. (10 %) inoculé avec BHI 07	6,30	3,12	4,13	120	3,18		0,00110^a	120	15	70	0,0191 ^a	

Les moyennes de la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) pH₀ = pH moyen initial, pH_f = pH moyen final, pH_{max} = pH moyen maximal, mpH-DR = taux moyen de chute du pH, mA-IR = taux moyen augmentation de l'acidité, t_{max-pH-D} = temps de chute maximale du pH, t_{max-A-I} = temps de hausse maximale de l'acidité titrable.

4.8.2.2 Résultats de suivi de la cinétique de croissance

Les résultats du suivi de la cinétique de croissance de la souche pseudolactique *Bf. bifidum* BHI 7 sur le milieu lait enrichi en spiruline et en chlorelle ainsi que la combinaison des deux ont montré que la viabilité de cette souche test a été augmentée significativement ($p < 0,05$) avec une concentration de 10 %. Cependant, après 6 h de fermentation, tous les milieux enrichis ont contribué significativement ($p < 0,05$) à la cinétique de croissance de la souche test.

Nous avons constaté, une différence significative ($P < 0,05$) dans le taux de croissance de la souche BHI 7 dans les différents lots de traitements (1, 3, 5 et 10 %) en comparaison avec le contrôle (sans addition).

Après 24 h de fermentation, le taux de viabilité de la souche diminue par rapport au témoin cela est peut-être dû à la diminution du pH (pH = 4,62 et 4,6) (tableaux 4.22, 4.23 et 4.24) donc le milieu devient défavorable à la survie des souches bifides.

Tableau 4.22 : Résultat du suivi de la croissance de *Bf. bifidum* BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en spiruline

	Initial population (Log ufc/ml)	Final population (Log ufc/ml)	G (h)	μ (h ⁻¹)
Control	5,13	6,86	0,35 ^b	2,883 ^b
lait enrichi en spiruline (01 %) inoculé avec BHI 07	5,06	6,45	0,43 ^c	2,317 ^c
lait enrichi en spiruline (03 %) inoculé avec BHI 07	5,06	6,21	0,52 ^e	1,917^e
lait enrichi en spiruline (05 %) inoculé avec BHI 07	5,06	6,44	0,43 ^d	2,300 ^d
lait enrichi en spiruline (10 %) inoculé avec BHI 07	5,06	6,94	0,32 ^a	3,133 ^a

Tableau 4.23 : Résultat du suivi de la croissance de *Bf. bifidum* BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en chlorelle

	Initial population (Log ufc/ml)	Final population (Log ufc/ml)	G (h)	μ (h ⁻¹)
Control	5,36	6,94	0,38 ^b	2,633 ^b
lait enrichi en chlorelle (01 %) inoculé avec BHI 07	4,96	6,9	0,31 ^c	3,233 ^c
lait enrichi en chlorelle (03 %) inoculé avec BHI 07	4,94	6,94	0,30 ^e	3,333 ^e
lait enrichi en chlorelle (05 %) inoculé avec BHI 07	4,94	7,28	0,26 ^d	3,900 ^d
lait enrichi en chlorelle (10 %) inoculé avec BHI 07	4,95	7,49	0,24 ^a	4,233 ^a

Tableau 4.24 : Résultat du suivi de la croissance de *Bf. Bifidum* BHI 07 dans le lait écrémé seul et enrichi en combinaison en spiruline et chlorelle

	Initial population (Log ufc/ml)	Final population (Log ufc/ml)	G (h)	μ (h ⁻¹)
Control	5,36	6,94	0,38 ^b	2,63 ^b
lait enrichi en combinaison S. + C. (01 %) inoculé avec BHI 07	5,3	7,15	0,32 ^c	3,083 ^c
lait enrichi en combinaison S. + C. (03 %) inoculé avec BHI 07	5,3	7,97	0,22 ^e	4,45 ^e
lait enrichi en combinaison S. + C. (05 %) inoculé avec BHI 07	5,3	8,27	0,20 ^d	4,95 ^d
lait enrichi en combinaison S. + C. (10 %) inoculé avec BHI 07	5,3	7,74	0,25 ^a	4,067 ^a

Cela peut être expliqué, par le fait que ces biomasses ont un caractère alcalin et qui est capable d'augmenter la production d'acide et la croissance des levains au cours de la fermentation des produits laitiers. Des études similaires ont pu prouver que l'ajout de la spiruline accentue la croissance des bactéries expérimentales dans le yaourt, le lait fermenté et le fromage blanc [390, 391]. Les micro-algues favorisent la croissance microbienne en raison de sa composition chimique tel que des acides aminés, peptides, acides nucléiques (ADN et ARN), de vitamines dont la vitamine B qui est un promoteur très connu pour les bactéries probiotiques, des minéraux, des polysaccharides, des pigments naturels, des glycoprotéines, des β -glucanes et des acides gras essentiels en particulier l'acide γ -linoléique [392]. Les résultats de la caractérisation nutritionnelle de nos deux microalgues d'étude confirment ce qui a été rapporté par la littérature.

4.8.3 Etude de l'antagoniste des de la souche *Bf. bifidum* BHI 7 sur les trois souches de la flore intestinale

L'effet antagoniste de la souche BHI 7 a été évalué à l'égard des trois souches de la flore intestinale : *E. coli*, *Bacteroide* sp. et *Lactobacillus* sp selon la méthode de diffusion sur agar.

Après 24 h d'incubation des boîtes Pétri ensemencées, les zones claires autour des disques ont été mesurées. Les résultats sont représentés dans le tableau 4.25.

Tableau 4.25 : Activité antagoniste de la souche *Bf. bifidum* BHI 7 à l'égard des trois souches *E. coli*, *Bacteroide* sp. et *Lactobacillus* sp.

Souches tests	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)*
<i>E. coli</i>	25,25 \pm 3,30
<i>Bacteroide</i> sp.	33,25 \pm 2,49
<i>Lactobacillus</i> sp.	10 \pm 0,82

* Diamètre des puits est inclus (6 mm). Les résultats sont la moyenne de quatre répétitions \pm écart-type.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que la souche BHI7 a présentée le spectre le plus important à l'égard de la souche bactéroïde ($33,25 \pm 2,49$ mm), suivi par *E. coli* avec un diamètre d'inhibition de $25,25 \pm 3,30$ mm, alors que le spectre le moins important a été révélé à l'égard de la souche *Lactobacillus* sp. avec un diamètre d'inhibition de $10 \pm 0,82$ mm.

KHEADR [393] a rapporté l'activité antimicrobienne des deux souches lactique *Bf. longum* et *Lb. plantarum* en culture seules et en association à l'égard des deux souche pathogènes *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* en utilisant la méthode de diffusion en puit. Parmi les cultures simples, le surnageant neutralisé de *B. longum* était la seule culture qui a produit des effets inhibiteurs contre les deux organismes d'indicateur, et ce qui a confirmé son étude en 2001 [394]ou il a démontré qu'une forte activité antimicrobienne de *B. longum* DSM 20097 à l'égard de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* a été révélée lorsque cette souche a été cultivée en co-culture avec *Lb. paracasei*, *Lb. acidophilus* ou *Lb. plantarum*. L'effet inhibiteur des souches bifides peut être attribué à son pouvoir acidifiant et/ ou son pouvoir de produire des agents antimicrobiens de nature protéique.

FREESE *et al.* a démontré que les acides neutralisés pourraient avoir un effet antibactérien et aussi que les formes non dissociées d'acétate neutralisé et de lactate peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne à travers la membrane cytoplasmique, et que les acides se dissociés et forment des protons qui pourraient inhiber beaucoup d'appareil de métabolisme cellulaires. A l'heure actuelle, la bactériocine bifidocin B produite par *B. bifidum* NCFB 1454 est la seule bactériocine qui a été purifiée et caractérisée [231].

4.8.4 Etude de l'activité inhibitrice de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* vis-à-vis les souches du microbiote intestinal

Le pouvoir antagoniste des deux microalgues *Spiruline platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* a été testé à l'égard des quatre souches *E. coli*, *Bacteroide* sp. *Lactobacillus* sp et *Bf. bifidum* BHI 7 selon la méthode de diffusion en puit. Les résultats sont représentés dans le tableau 4.26.

Tableau 4.26 : Effet antagoniste de *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* à l'égard de *E. coli*, *Bacteroide* sp. *Lactobacillus* sp et *Bf. bifidum* BHI 7

	Diamètres de la zone d'inhibition (mm)							
	<i>Spirulina platensis</i>				<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			
	1 %	3 %	5 %	10 %	1 %	3 %	5 %	10 %
<i>E. coli</i>	11,38 ± 0,95	18,25 ± 1,5	20,88 ± 0,86	32,95 ± 1,46	11,88 ± 0,63	19,12 ± 0,63	21,4 ± 1,25	33,5 ± 1,3
<i>Bacteroide</i> sp.	-	7,88 ± 1,44	11 ± 0,82	24,12 ± 1,55	--	7,63 ± 1,70	13,62 ± ,46	25,34 ± 0,48
<i>Lactobacillus</i> sp.	-	-	6,25 ± 0,05	8 ± 0,13	-	-	--	6,35 ± 0,50
<i>Bf. bifidum</i>	-	-	-	6,5 ± 0,58	-	--	--	6 ± 0,82

* Diamètre des puits est inclus (6 mm). Les résultats sont la moyenne de quatre répétitions ± écart-type.

D'après nos résultats, nous avons noté le spectre antimicrobien le plus important de chacune des deux microalgues avec la concentration la plus élevée (10 %). La zone d'inhibition la plus large a constatée à l'égard de la souche pathogène *E. coli* avec 32,95 ± 1,46 mm suivi par *Bacteroide* sp. 24,12 ± 1,55 mm pour la souche *Spirulina* et 33,5 ± 1,3 mm et 25,34 ± 0,48 mm pour la *Chlorella*, respectivement. Tandis que, à l'égard des deux souches lactiques, des faibles zones ont été constatées (tableau 4.26).

Mais aucun effet n'a été révélé avec les concentrations 1 %, 3 % et 5 %. Ce qui nous semble que, l'utilisation de ces microalgues comme des suppléments dans les produits fermentés est très motivante pour la croissance des ferments au détriment des pathogènes mais à des concentrations qui ne doivent pas excédées à 10 %.

4.8.5 Etude de l'effet de la supplémentation avec les deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* sur l'interaction des espèces isolées de la flore intestinale résidente

D'après les résultats de l'analyse antagoniste, nous avons sélectionné seulement les deux concentrations (5 % et 10 %) qui ont révélées les spectres antimicrobiens les plus importants à l'égard des souches de la flore intestinale. Le suivi de l'interaction des quatre souches a été évalué par la méthode de co-culture pendant 144 h.

D'après nos résultats, nous avons constaté une diminution de Log UFC/mL d'*E. Coli* de 2,58 après 144 h, en culture mixte lorsque le milieu est supplémenté avec 5 % de spiruline. Tandis qu'avec une concentration de 10 %, le Log UFC/mL a diminué avec 6,37 après 144 h.

Mais avec une supplémentation de 5 % en chlorelle, nous avons enregistré une diminution de Log UFC/mL de 3,04 après 144 h et une destruction totale avec une concentration de 10 %.

Pour les bactéroïdes, nous avons noté une diminution de Log UFC/mL de 1,25 après 144 h en présence d'une concentration de 5 % de spiruline tandis qu'avec une concentration de 10%, un décroissement de Log UFC/mL de 3,36 après 144 h a été révélé. En présence des concentrations de 5 % et 10 % de chlorelle, nous avons noté une diminution de Log UFC/mL de 1,61 et 4,17 après 144 h, respectivement.

Pour les *Lactobacillus* sp., nous avons révélé une augmentation de Log UFC/mL de 3,08 après 144 h, mais avec une concentration de 10 %, un décroissement de 0,4 % du Log UFC/mL a été noté. Tandis que, en présence de 5 % et 10 de chlorelle, une augmentation du Log UFC/mL de 3,32 et 1,39 %, respectivement a été notée.

Pour les *Bifidobacterium* sp., une augmentation de 3,14 de Log UFC/ml a été révélée en présence de 5 % de spiruline et de 0,4 % en présence de 10 %. Alors qu'en présence de la chlorelle, une augmentation de Log UFC/mL de 3,40 avec une concentration de 5 % et de 1,32 avec 10 %.

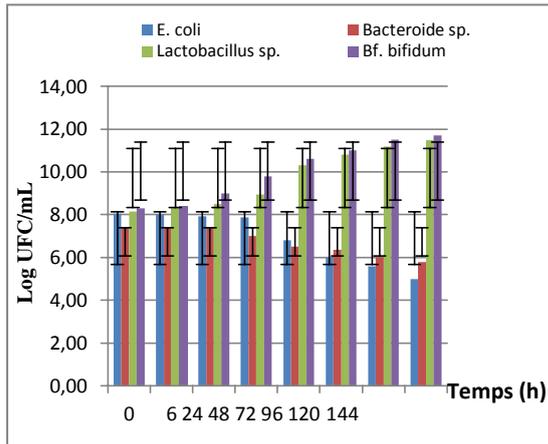


Figure 4.21 : Suivi de l'effet de *Chlorella pyrenoidosa* (5 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale.

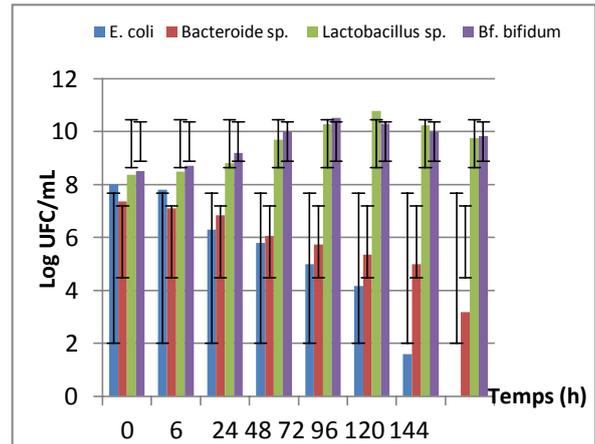


Figure 4.22 : Suivi de l'effet de *Chlorella pyrenoidosa* (10 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale.

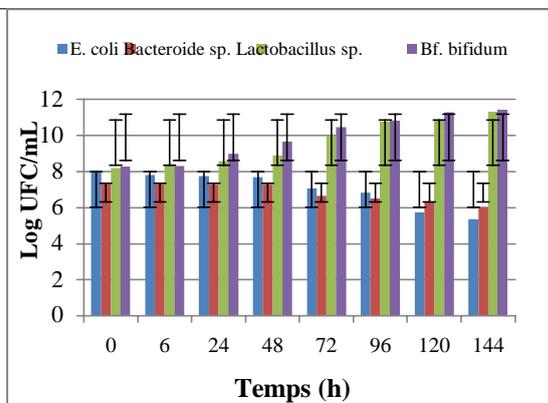


Figure 4.23 : Suivi de l'effet de *Spirulina platensis* (5 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale

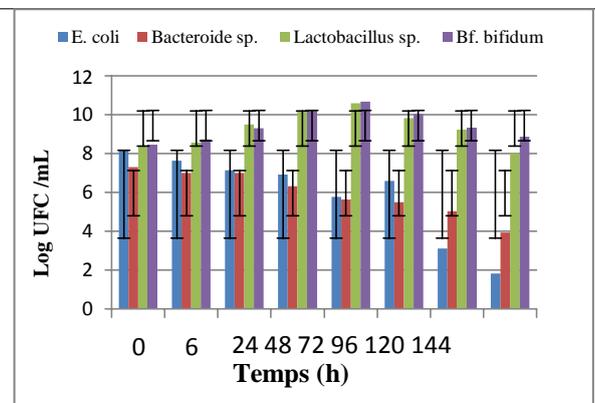


Figure 4.24 : Suivi de l'effet de *Spirulina platensis* (10 %) sur la l'intéraction des souches isolées de la flore intestinale

Vu que la concentration 10 % de spiruline a montrée un effet inhibiteur à l'égard de *Lactobacillus* sp. après 144 h et qu'avec la concentration 5 %, un accroissement important a été noté. Donc c'est cette concentration qui a été sélectionnée pour l'étude *in vivo*.

4.9 Etude, *in vivo*, de l'influence de la spiruline et de la chlorelle seule et en association sur la prolifération et la diversification de la flore intestinale

Cette partie présente les résultats de l'état de santé, l'évolution dans le temps des performances de croissance, de l'ingestion, de l'IC et de la digestibilité des nutriments en fonction du type d'aliment, ainsi que l'effet de traitement d'entérite gastrique provoquée expérimentalement par les microalgues en comparaison à une antibiothérapie.

Après sept (7) jours d'adaptation, les lapereaux des lots 2, 3, 4, 5 et 6 ont reçu par voie per-os, 1 mL d'inoculum de la souche probiotique BHI7 (10^8 UFC/mL) au 8^{ème} jour (J8) et durant 7 jours. Au 9^{ème} jour (J9), nous avons provoqué une infection gastro-entérite chez les lapereaux des lots 2, 3, 4, 5 et 6 par administration par per-os, 1 mL d'inoculum de la souche pathogène *E. coli* ATCC 22925.

Les paramètres suivants ont été contrôlés à savoir : le gain du poids et la prise alimentaire. Les tableaux M.1 (en appendice M) et les figures 4.25 et 4.26 représente les résultats de ces paramètres.

4.9.1 Résultats d'évaluation de l'efficacité nutritionnelle des différents régimes

Après 28 jours de consommation des régimes supplémentés en spiruline et en chlorelle seule et en combinaison, nous avons révélé un gain du poids chez les lapins des lots 3 (CH) et 4 (SCH) et qui a été supérieur à celui du lot 1 (régime de base) mais une différence significative a été notée en comparaison avec le lot 06 (régime de base, lapins traités par antibiotique) (Figure 4.25, tableau M.1 en appendice M).

La nourriture ingérée lors de cette expérimentation est 1,31 fois plus faibles chez les lapins des lots 2 et 4 en comparaison avec le lot 6. Alors qu'elle est plus faible encore dans le reste des lots (1, 4 et 5) (figure 4.26, tableau M.2 en Appendice M).

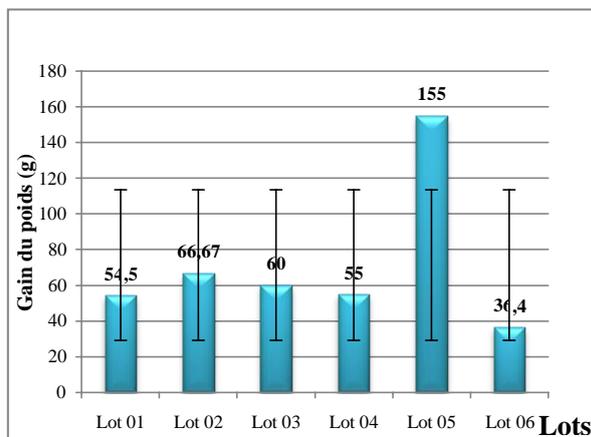


Figure 4.25 : Gain du poids corporel des lapins

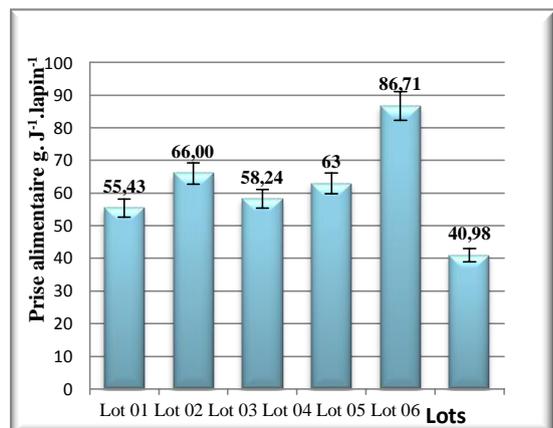


Figure 4.26 : Consommation alimentaire

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES de six lapins par lot. Le lot 01: (C) : groupe de contrôle, lot 02 (S) : régime de base supplémenté en 5 % de spiruline, lot 03 (SCH) : régime de base supplémenté de la combinaison de 2,5 % de spiruline et 2,5 % de chlorelle, lot 04 (CH) : régime de base supplémenté en 5 % de Chlorelle, lot 05 (C) : régime de base les sujets sont sous antibiotique, lot 06 (C) : sujets infectés non traités.

La spiruline et la chlorelle contiennent divers nutriments, surtout les vitamines, les minéraux, les acides gras essentiels, les acides aminés [395], ainsi que des polysaccharides, des substances phénoliques et des composés aromatiques et d'autres nutriments qui peuvent promouvoir une croissance plus rapide des animaux [396]. Dans les études on a suggéré que les microalgues contiennent des substances prometteuses comme le complexe peptidique S-nucléotide adénostyle qui peut influencer la performance de la croissance et la digestibilité des animaux [397]. Auparavant, on a démontré des changements dans la composition de la communauté bactérienne [398]. Plusieurs études ont démontré des améliorations dans les performances de croissance des bétails [399], des ovins [395], des lapins [400] après une supplémentation des régimes expérimentaux avec la spiruline, tandis que pour la supplémentation avec la chlorelle, il y a très peu d'étude, nous citons : une supplémentation des régimes de poulet pondant [401] et des cochons [402].

Dans le lot 05 (lapins traités avec un antibiotique), nous avons révélé le gain de poids le plus significativement important (155 g/ 28 jours). Plusieurs études sont similaires à nos résultats et qui ont rapportées aussi une amélioration dans les performances de croissance avec les supplémentations en antibiotiques [401, 403] et qui ont suggéré que l'augmentation des performances de croissance peut être due probablement à une augmentation de la digestibilité des nutriments et ce qui a été confirmé au sein de notre étude. YAN *et al.* [401] ont supposé qu'une telle supplémentation diminue le taux des bactéries pathogènes dans l'intestin et par la suite augmente la digestibilité des nutriments. NAGY & FEKETE [404] ont aussi suggéré que la présence d'*E. coli* dans l'intestin diminue la digestibilité des nutriments et les performances des animaux d'élevage.

4.9.2 Résultats des autopsies et diagnostic des causes de morbidité et de mortalité

Durant cette étude, les troubles digestifs ont été très importants pendant la première semaine d'expérimentation et avant la provocation d'infection par *E. coli* ATCC 25922. Toutefois, un examen clinique (Appendice J (fiche de diagnostic)) a été fait tous les matins avant la distribution d'aliment. Les lapins morbides ont

présentés une anorexie avec une chute de poids, des ballonnements abdominaux, constipation (absence de fèces sur la litière) et des décès en 24 à 48 h.

Par ailleurs, des autopsies ont été réalisées sur les sujets morts dans chaque lot et une analyse bactériologique des crottes et des contenus caecaux. Ces examens ont révélés une entérite hémorragique caractérisée par présence d'un liquide hémorragique à l'intérieur de la cavité abdominale ainsi que plusieurs organes ont présenté des anomalies : un foie parasité et parfois bicolore, présence très important de gaz dans le caecum et l'intestin grêle avec un contenu presque vide (Fig. 4.27), avec une très forte odeur apparait lors de la dissection et un gonflement.

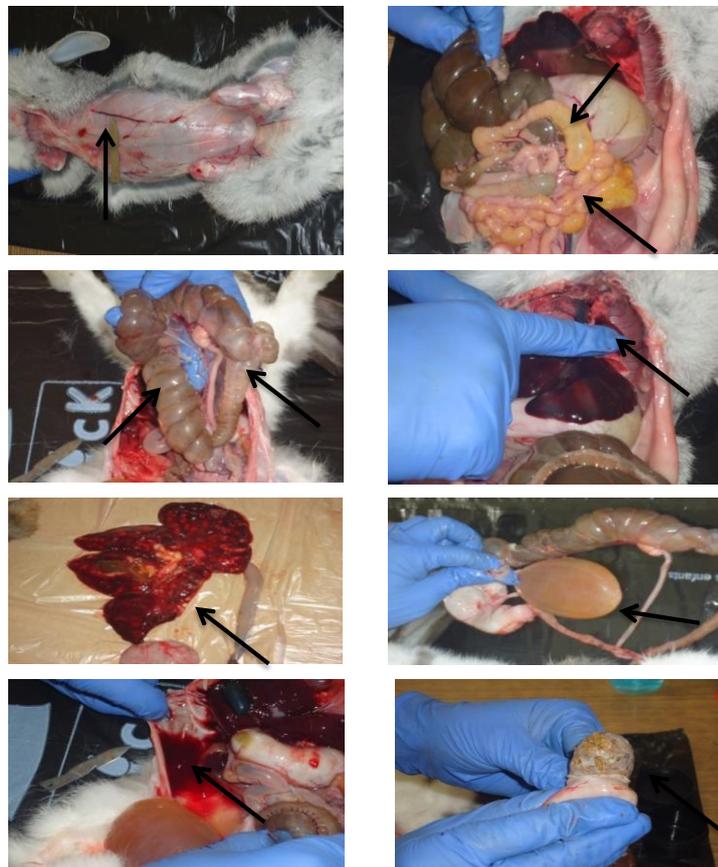


Figure 4.27 : Photos des autopsies d'un lapin mort

A : Entérite hémorragique ; B et C : présence de gaz dans l'intestin grêle et le caecum avec un contenu presque vide ; D : poumon bicolore, E : poumon parasité, F : vissé pleine ; G : présence d'un liquide hémorragique ; H : détachement de la paroi d'estomac.

Après 4 jours de provocation d'infection par *E. coli* ATCC 25922, le taux de mortalité été de l'ordre de 16,67 % dans le lot 2 (régime supplémenté avec spiruline) et de 33,33 % dans le lot 6 (infecté non traité) (tableau 4.27).

Tableau 4.27 : Mortalité observée pour les 6 lots expérimentaux

	Lot 01	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05	Lot 06
0 – 7 jours	00	16,67 %	00	00	00	00
8 – 14 jours	00	16,67 %	00	00	16,67 %	33,33 %
15 – 21 jours	16,67 %	00	00	00	00	00
22 – 28 jours	00	00	00	00	00	00

4.9.3 Résultats d'anatomie descriptive des compartiments digestifs

La figure 4.28 présente une vue d'ensemble du tube digestif d'un lapereau de 40 jours d'âge.

L'estomac de lapin est allongée, cylindroïde, rétréci circulairement en son milieu, constituée de deux parties : la partie la plus volumineuse correspond au fundus et la moins volumineuse, rattachée à l'intestin grêle, correspond à l'antrum. L'intestin grêle représente la partie la plus longue du tube digestif. Le caecum est volumineux et qui comprend deux parties : une large base, un corps avec des haustrations (17 à 25 spires) qui se termine avec un appendice vermiforme (ou ampoule caecale). Le caecum est caractérisé par une muqueuse tapissée de nodules lymphatiques (véritable tonsille caecale). La réduction du diamètre de la base marque le début du côlon qui se divise en deux parties : le côlon proximal et le côlon distal. Le côlon distal se différencie du côlon proximal par la présence de matières fécales dures qui forment des bosselures.

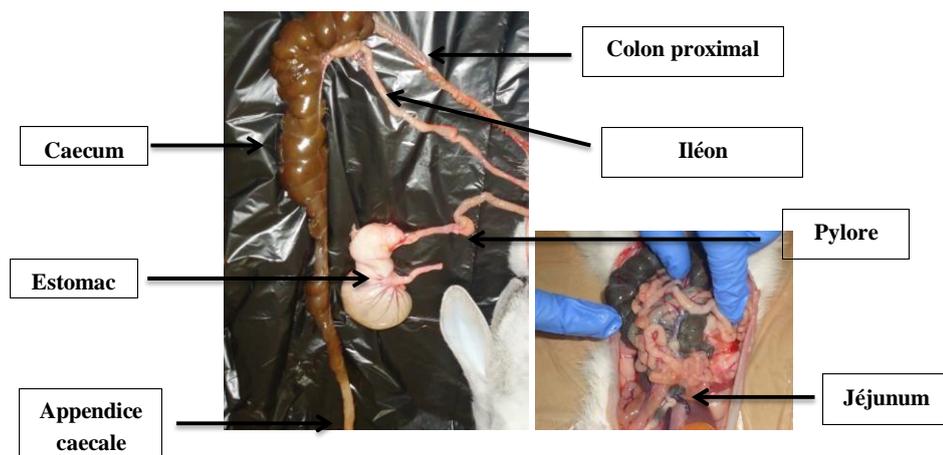


Figure 4.28 : Photo d'une vue du tube digestif d'un lapin en croissance (61 jours)

4.9.4 Résultats de l'étude des paramètres physico--chimiques du tube digestif des lapereaux

Les paramètres physico-chimiques des lapereaux sous différents régimes alimentaires sont comparés entre eux (tableau 4.28). Le poids moyen du caecum des lapins des lots sous régimes supplémentés en microalgues (lot 02, 03 et 04) après 21 jours de consommation d'aliment a varié entre 93,5 et 103,9 g et ce qu'il n'était pas différent des deux autres lots (01 et 06), mais nous avons révélé une augmentation de ce poids dans le lot 04. Par contre 7 jours après, nous avons constaté une augmentation du poids dans les lots 02, 03 et 04 de 1,4, 1,38 et 1,6 %, respectivement en comparaison avec les deux autres lots 5 et 6 (0,72 et 1,16 %, respectivement). Cette augmentation du poids de caecum peut être due à une augmentation de l'âge des lapereaux ainsi que la différence entre les lots expérimentaux peut être cohérent avec la consommation alimentaire.

Concernant la longueur moyenne du caecum, nous avons constaté qu'aucun effet de type d'alimentation n'a été soulevé sur ce paramètre, vu que cette longueur n'était pas différente entre les différents lots et entre les 1^{er} et le 2^{ème} sacrifice. La même remarque a été soulevée pour le pH du caecum. Aucune différence n'a été révélée entre les différents expérimentaux et entre les deux périodes de sacrifice (1^{er} et 2^{ème}). Le pH du contenu caecal a été légèrement acide et qui n'a pas varié significativement avec le régime. Il a été compris entre 6,03 et 6,34 au J₂₁ et entre 6,04 et 6,53 au J₂₈. Le type d'alimentation n'a aucun effet sur le pH du caecum. Le poids moyen d'estomac a varié entre les lots sous régimes supplémentés (lot 2, 3 et 4) et les lots 5 et 6, ainsi que entre le 1^{er} et le 2^{ème} sacrifice. Cette différence est cohérente avec la consommation alimentaire.

Le pH du contenu stomacal est très acide par rapport aux contenus des autres segments du tube digestif [405] et ce qui va empêcher les fermentations microbiennes, ce qui suggère que la digestion dans l'estomac est essentiellement assurée par les enzymes sécrétées par les glandes gastriques telles que la pepsine [406]. L'acidité du digesta de l'estomac est ensuite neutralisée au niveau du duodénum avant le transit dans l'intestin grêle. La neutralisation de l'acidité du chyme stomacal est assurée par les sécrétions alcalines des glandes de Brunner situées dans la sous-muqueuse du duodénum [405]. Le pH du caecum est proche de la neutralité, ce qui est favorable à la fois aux activités enzymatiques et aux fermentations microbiennes.

Tableau 4.28 : Etude de l'influence du traitement sur les paramètres physico-chimiques des compartiments digestifs

1^{er} Sacrifice J 21	Lot 01	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05	Lot 06
<u>Caecum</u>						
Longueur (cm)	31,5 ± 4,95	33,5 ± 2,12	40 ± 1,41	31 ± 4,24	32,5 ± 3,54	34,74 ± 6,72
Poids (g)	113,75 ± 1,17	103,9 ± 1,56	93,5 ± 9,19	100,1 ± 14	140,5 ± 4,95	114,31 ± 5,73
pH (Entrée, milieu, sortie)	6,04 ± 0,09	6,24 ± 0,24	6,20 ± 0,12	6,22 ± 0,07	6,03 ± 0,12	6,34 ± 0,05
<u>Estomac</u>						
Poids (g)	50,3 ± 1,84	63,45 ± 3,46	55,8 ± 3,39	61,8 ± 2,69	72,3 ± 5,23	89,2 ± 1,98
pH antrum	1,35 ± 0,01	1,75 ± 0,23	0,96 ± 0,04	1,46 ± 0,02	0,79 ± 0,25	1,24 ± 0,25
pH fundus	1,04 ± 0,03	1,26 ± 0,06	1,33 ± 0,04	1,32 ± 0,03	1,06 ± 0,01	1,01 ± 0,02
2^{eme} Sacrifice J28	Lot 01	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05	Lot 06
<u>Caecum</u>						
Longueur (cm)	33,45 ± 0,78	32,75 ± 3,89	31,25 ± 5,30	34,9 ± 2,69	28,5 ± 2,12	33 ± 1,41
Poids (g)	158,30 ± 3,11	143,75 ± 1,77	150,2 ± 24,61	146,95 ± 5,30	100,75 ± 50,84	132,85 ± 1,48
pH (Entrée, milieu, sortie)	6,04 ± 0,10	6,18 ± 0,03	6,28 ± 0,23	6,5 ± 0,28	6,05 ± 0,31	6,53 ± 0,46
<u>Estomac</u>						
Poids (g)	109 ± 8,49	56,8 ± 2,55	69,75 ± 17,75	66,4 ± 8,63	82,4 ± 0,08	98,95 ± 2,47
pH antrum	1,46 ± 0,57	2,02 ± 1,08	2,01 ± 1,57	2,07 ± 0,04	1,53 ± 0,21	1,53 ± 0,46
pH fundus	0,98 ± 0,11	1,64 ± 0,02	1,52 ± 6,94	1 ± 0,08	1,37 ± 0,16	1,47 ± 0,07

4.9.5 Résultats de l'analyse bactériologique de la flore fécale et caecale des lapins

Avant l'administration de la souche probiotique *Bifidobacterium bifidum* BHI 07 au jour J₇, des prélèvements des crottes ont été effectués à partir de trois lapins de chaque lot, les germes mésophiles, *E. coli*, *Salmonella* sp., sulfito-réducteur, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. et *Streptococcus* sp. ont été dénombrés selon la méthode de comptage sur gélose. Les résultats des analyses bactériologiques de la microflore fécale des lapins de chaque lot sont représentés dans les figure 4.29 et tableau N.1 en Appendice N.

Avant inoculation des lapins expérimentaux avec la souche probiotique BHI 7 (J₇), des analyses des fécés ont été effectuées en vue d'un dénombrement de la charge microbienne. Les résultats de ces analyses ont révélés la présence des germes aérobies mésophiles, *E. coli*, streptocoques, lactobacilles, bifidobactéries et les anaérobies sulfito-réducteurs. Ce qui explique l'appartenance de ces bactéries à la flore colique normale des lapins. Par ailleurs l'absence de *Salmonella* et *Shigella* montre que les conditions d'élevage semblent bonnes sur le plan hygiénique.

Le log₁₀ UFC/g d'*E. coli* a varié entre 6,07 et 7,68 dans les 6 lots expérimentaux. Pour les streptocoques, le log₁₀ UFC/g a varié entre 5,93 et 7,88. Pour les lactobacilles, il a varié entre 5,34 et 7,44. Concernant, les bifidobactéries le log₁₀ UFC/g a varié entre 3,54 et 5,1 (Tableau N.2 en Appendice N et figure 4.29).

Tandis que, après 7, 14 et 21 jours d'inoculation avec la souche BHI 7 soit 5, 12 et 19 jours post infection, nous avons constaté, un log₁₀ UFC/g d'*E. coli* de l'ordre de 9 (Tableau N.5 en appendice N), soit un taux d'accroissement de 18,86 %, ce qui est significativement élevé par rapport au lots 2, 3 et 4 sous régime supplémenté en microalgue, ainsi que le lot traité par antibiotique (Lot 6).

En comparaison avec le lot 01 (témoin), le log₁₀ UFC/g est significativement différent (p<0,05) avec un taux d'accroissement de 0,29 %. Cela est dû à l'effet probiotique qui a exercé la souche BHI7 inoculée 48 h avant la provocation d'infection et ce qui a induit à la production des acides organiques et une diminution du pH du tractus gastro-intestinal et par conséquence une inhibition de la prolifération de la souche entérique ainsi qu'à la présence des substances antimicrobiennes (bactériocines) produites par cette souche probiotique.

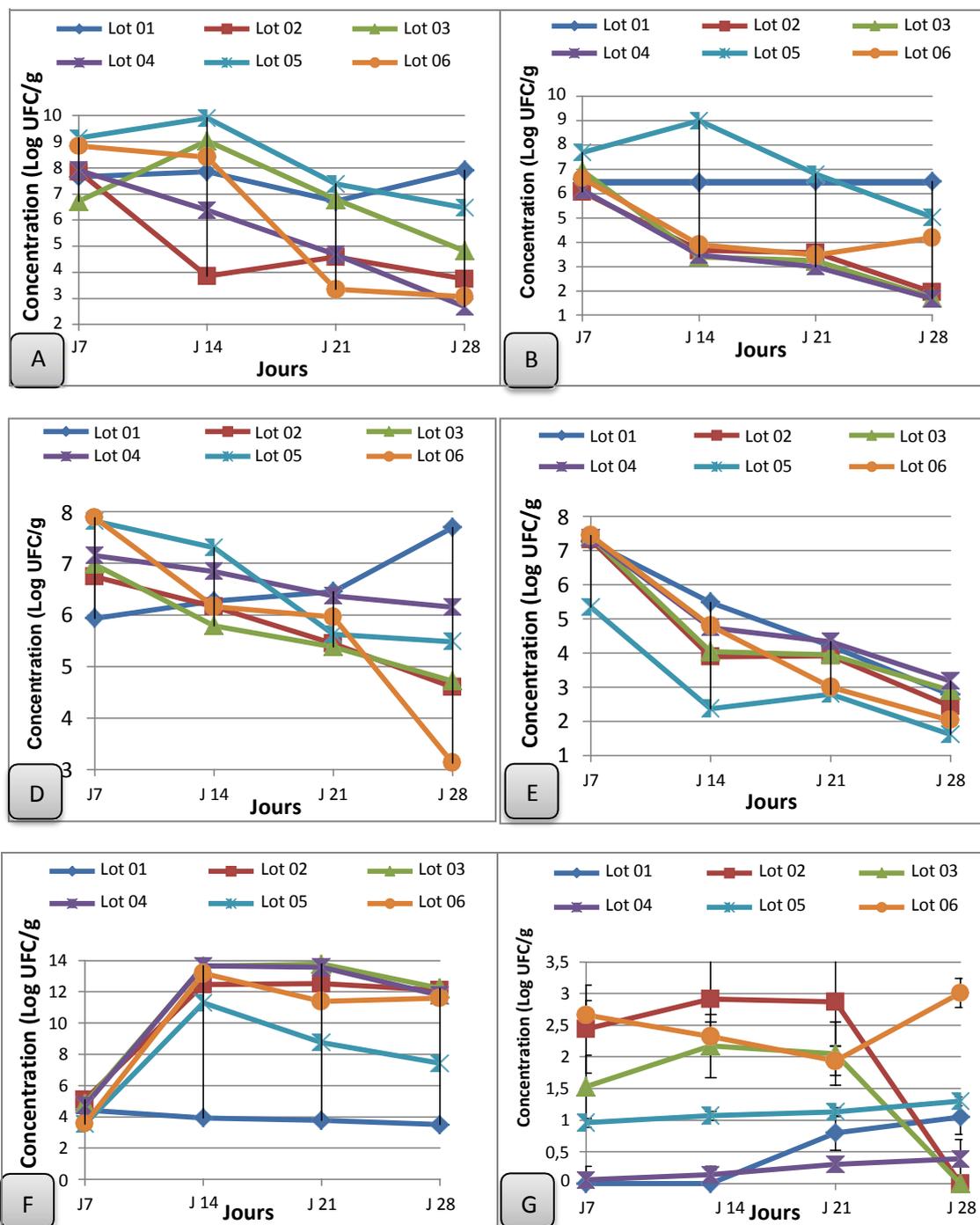


Figure 4.29 : Evolution de la population microbienne fécale (log₁₀ UFC/g) dans les six lots expérimentaux des lapins durant les 28 jours. Chaque valeur représente la moyenne ± ET de trois lapins par lot. (A) : flore mésophile, (B) : *E. coli*, (C) : *Salmonella* sp., (D) : *Streptococcus* sp., (E) : *Lactobacillus* sp., (F) : *Bifidobacterium* sp., (G) : Aérobie sulfito-réducteurs. Lot 1 : Témoin, lot 2 : traité avec 5 % de *Spirulina*, lot 3 : traité avec 2,5 % de *Spirulina* sp. + 2,5 % de *Chlorella* sp., lot 4 : traité avec 5 % de *Chlorella* sp., lot 5 : non traité, lot 6 : traité avec un antibiotique.

En observons, les résultats des lots 2, 3 et 4, nous pouvons constater à une diminution significative ($p < 0,05$) de \log_{10} UFC/g avec des taux de viabilité qui ont variés entre 39,54, 50,94 et 43,41 %, respectivement. Dans le lot 6, le taux de viabilité a été de l'ordre de 41,18 % et ce qui est comparable aux lots 2 et 4. Mais la différence été significative avec le lot 3.

Après 12 jours post infection (J_{21}), nous avons constaté à une diminution de \log_{10} UFC/g d'*E. coli* dans le lot 5 avec un taux de viabilité de 11,46 %, en comparaison avec le lot 01 (Témoin) où nous avons enregistré une légère augmentation avec un taux d'accroissement de 0,43 %. Pour les lots 2, 3 et 4, nous avons enregistré des taux de survie de 58,65, 46,90 et 48,78 %, respectivement. Alors que, pour le lot 6 (traité par antibiotique), nous avons enregistré un taux de survie de 52,49 %.

Mais après 19 jours post infection (J_{28}), nous avons révélé un taux de survie de 65,49 % soit un taux de viabilité de 34,51 % dans le lot 5 (non traité), ce qui est significativement élevé par rapport au lot 1 (Témoin) où nous avons enregistré un taux de survie de 101,09 %,., soit un taux d'accroissement 0,5 %. Tandis que, pour les lots 2, 3 et 4, nous avons enregistré des taux de survie de 32,29, 24,82 et 27,32 %, respectivement. Alors que, pour le lot 6 (traité par antibiotique), nous avons enregistré un taux de survie de 63,05 % et ce qui été proche du lot 5 (non traité) avec un taux de survie de 65,49 %.

Pour les bifidobactéries, après 7 jours d'inoculation avec la souche probiotique BHI 7, le \log_{10} UFC/g a augmenté significativement dans les lots 2, 3, 4, 5 et 6 en comparaison avec le lot 1 (Témoin), il a varié entre 11,28 et 13,65 (tableau N.5 en appendice N).

Après 12 jours post infection (J_{21}), nous avons révélé que dans le lot 5 (non traité), le \log_{10} UFC/g a diminué significativement ($p < 0,05$) avec 2,53 log UFC/g en comparaison avec le lot 6 (traité par antibiotique) ou nous avons enregistré une diminution de 1,8 log UFC/g, tandis que dans le lot 1 (témoin), la diminution a été de 0,16 log UFC/g. ce qui signifier que l'administration d'un antibiotique chez le lapins du lot 6 a influencé sur la prolifération de la souche probiotique bifide et la même remarque a été soulevée avec les lactobacilles.

Par contre, dans les lots 2,3 et 4, nous avons constaté une augmentation de log UFC/g (tableau N.4 en Appendice N). Le taux d'accroissement le plus bas a été enregistré dans le lot 5 (non traité) (37,21 %) et ce qui est différent significativement en comparaison avec les autres lots expérimentaux (inoculés avec la souche BHI7). Il a varié entre 53 % et 64,07 %.

Alors qu'après 19 jours post infection (J_{28}), le taux d'accroissement le plus bas a été révélé dans le lot 5 (non traité) (18,4 %) et il a varié entre 33,29 et 35,10 dans les lots 2, 3 et 4.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que le type d'alimentation (challenge d'aliment) a influencé significativement sur la gravité de l'infection entérocolite toute en diminuant la charge des deux bactéries (*E. coli* et *Clostridium* sp.) responsable de diarrhées chez les lapins [407], ainsi que sur la capacité et l'aptitude probiotique de la souche bifide BHI 7 administré par voie per os et qui a résister au passage gastro-intestinale et qu'elle s'est proliférée au niveau intestinale.

Une étude réalisé par DESMAZEAUD [408] a montré que les effets de la prolifération de certaines souches pathogènes peuvent être inhibés par l'ingestion de ferments lactiques, selon les mécanismes suivants : les sécrétions de certaines substances antimicrobiennes par les bifidobactéries (H_2O_2 , Acide lactique, Acide acétique); l'abaissement du pH par les acides produits, la prévention de la synthèse d'amines toxiques, l'effet d'une barrière par compétition métabolique ou l'empêchement de la colonisation de pathogènes par la fixation sur le tube digestif et la dégradation des entéro-toxines par une détoxification.

En plus de la production des acides organiques et des molécules antimicrobiennes, d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans les rapports *in vivo*, dont ont mis l'accent sur la modulation immunitaire et les preuves rapportent que les probiotiques influence locale ou systématiquement sur la réponse immunitaire de manière souche-dépendante [409].

Selon BALAKRISHNAN et FLOCH [410], les probiotiques pourraient promouvoir l'immunomodulation en se fixant au tissu épithélial de l'intestin, en interagissant avec le système immunitaire et en produisant des substances antimicrobiennes.

Plusieurs études ont adressé la quantification de survivance probiotique pendant le transit de gastro-intestinal et ont montré que les espèces de bifidobacteria, en incluant *B. animalis* subsp. *lactis*, survécu aux conditions gastro-intestinal, en colonisant dans les grands nombres les deux points. Il a été conclu dans d'autres études que la microflore gastro-intestinale est hautement associée aux performances zootechniques [401, 403].

D'après nos résultats, nous avons révélé que la microflore fécale et caecale contient la flore microbienne totale, *E. coli*, les bactéries lactiques : *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., ainsi que les anaérobies sulfite-réducteurs. Des études récentes qui ont été menées sur la caractérisation de la flore fécale de lapins, ils ont démontrées que cette flore est représentée par des Firmicutes (93 %) et Bacteroides (4 %) suite à une analyse moléculaire [407] et qui sont essentiellement : des Bacteroides, *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., and *Prevotella* sp, YS2/Cyanobacteria, *Streptococcus* sp. et des sulfite-réducteurs [411].

Nous avons pu constater que les régimes supplémentés en microalgue (S, SCH, CH) ont influence significativement sur la microflore caecal des lapins (tableaux N.1, N.2, N.3, N.4, N.5, N.6 en Appendice N). Nos résultats ont confirmés des études antérieures qui ont été menées [402]. Plusieurs auteurs ont démontrés l'effet de la supplémentation en spiruline [395] et en chlorelle [401, 412, 413] sur la charge de la microflore fécale et caecale. Ces deux microalgues ont fait l'objet de supplémentation des aliments de certains animaux, et ils étaient utilisés comme des alternatives aux antibiotiques, notamment chez le poulet [4, 414, 415].

GRUZAUSKAS *et al.* [416] ont rapportés que la spiruline améliore l'absorption des minéraux, protège contre la diarrhée et optimise le process de digestion des nutriments. Une autre étude qui a été menée par MARIEY *et al.* [417] qui ont rapportés que la spiruline améliore l'absorption des vitamines au niveau intestinale.

L'effet antibactérien de ces deux microalgues, que nous avons démontré dans les deux études *in vitro* et *in vivo* confirme les résultats de plusieurs auteurs. Rania *et al.* [336] ont prouvés que les extraits des microalgues ont des larges spectres antibactériens et antifongiques, notamment à l'égard de *E. coli* et qui sont dus essentiellement à la présence des alcaloïdes et des polysaccharides. Et cela

confirme notre hypothèse que la richesse de ces deux microalgues en molécules bioactives est en corrélation positive avec leurs effets antimicrobiens. Et aussi prouve son effet prébiotique, du fait qu'elles représentent un bon substrat pour la fermentation et la croissance du microbiote.

4.9.6 Résultats de l'influence du régime alimentaire sur l'infection et la structure histologique de l'intestin grêle des lapereaux

4.9.6.1 Observation générale des lapins et des autopsies des cadavres

Après 02 jours de provocation d'infection et 05 jours d'administration d'antibiotique, la mortalité été de l'ordre de 02 sujets sur 06 lapins (33,33 %) dans le lot 05 (infecté non traité) et de l'ordre de 16,67 % dans le lot 2 (régime supplémenté en spiruline 5%) et le lot 6 (traité par antibiotique) (tableau 4.27), les autres lapins (lot 2, 3, 4 et 6) avaient un bon été physique avec une prise de poids et une prise alimentaire presque stable.

Tandis que les lapins du lot 5 ont demeurés un peu inquiétant, ils ne mangeaient pas bien, activité physique diminuée, début de gonflement abdominale et présence de diarrhée. Après 72 h post infection, il y avait deux cas de décès. Des autopsies ont été effectuées sur les cadavres (Figure 4.30).



Figure 4.30 : Photos de l'autopsie des lapins cadavres.

(A) : Lot 05, (B) : Lot 2, (C) : Lot 06. Les flèches représentent les anomalies observées : ballonnement des abdomens, caecum plein et présence de gaz et des contenus vides de l'intestin grêle, cœur et poumon bicolore, poumon parasité, présence d'un liquide hémorragique.

4.9.6.2 Structure histologique de l'intestin grêle après 72 h post infection

D'après l'analyse de la structure histologique des trois fragments de l'intestin grêle, nous avons constaté chez le cadavre du lot 5 (infecté non traité), une atrophie au niveau de la muqueuse à un stade avancé ou nous avons révélé une déformation de l'épithélium et des cryptes (Figure 4.31.C.1) au niveau du duodénum, et un début d'ouverture des cryptes de l'iléon et le jéjunum avec un des ruptures au niveau de la musculature et présence d'un grand nombre des lymphocytes qui sont colorés en bleu (Figure 4.31.2).

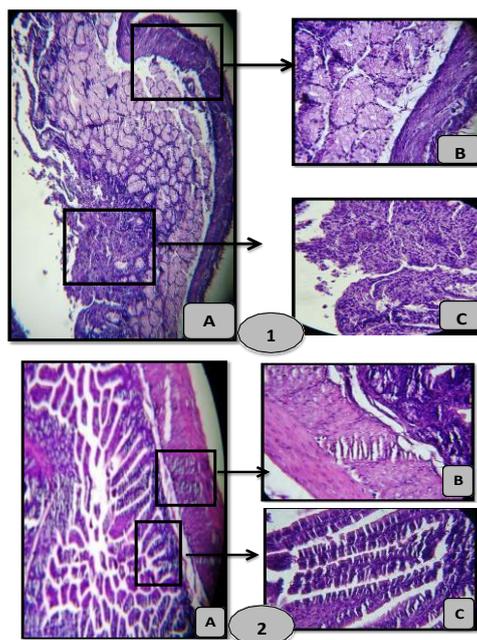


Figure 4.31 : Coupes histologiques des fragments de l'intestin grêle d'un lapin du lot 5. (1) : Duodénum A : muqueuse + sous-muqueuse (G \times 10) ; B et C : sous muqueuse (G \times 40), D : Cryptes (G \times 100). (2) : Iléon A : muqueuse + sous-muqueuse (G \times 10) ; B : Cryptes (G \times 100). (3) : Jéjunum A : muqueuse + sous-muqueuse (G \times 10) ; B : Cryptes (G \times 100).

L'analyse de la structure histologique des trois fragments de l'intestin grêle du lapin du lot 2 (régime supplémenté en spiruline), nous avons constaté un taux élevé des lymphocytes (coloré en bleu) avec la présence de toutes les couches, seulement des débuts d'ouverture des villosités (figure 4.32).

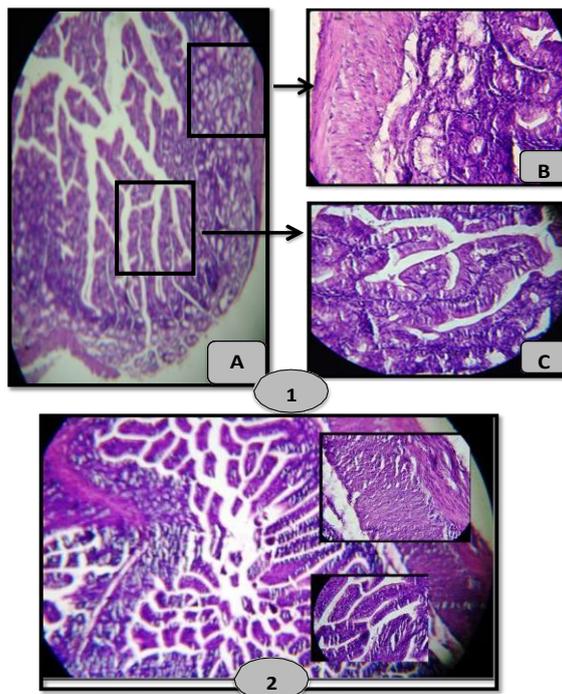


Figure 4.32 : Coupes histologiques des fragments de l'intestin grêle d'un lapin du lot 2. (1) : Duodénum A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B et C : sous muqueuse (Gx 40), D : Cryptes (Gx100). (2) : Iléon A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B : Cryptes (Gx100). (3) : Jéjunum A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B : Cryptes (Gx100).

Après 12 jours de provocation d'une entérite, les lapins avaient un bon état physique avec une prise de poids (tableau 1.M en Appendice M, Figure 4.25). Après sacrifice des lapins des lots : 2,3, 4, 6 et en comparaison avec ceux du lot 1 (Témoin), nous avons révélé, des caecums avec des contenus plein, ainsi que des organes sans aucunes anomalies (Figure 4.33).

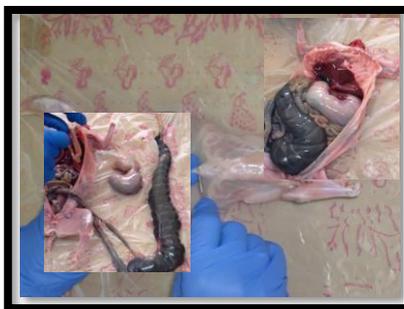


Figure 4.33 : Photo du tube digestif d'un lapin du lot 2 (Régime supplémenté en spiruline) après 21 jours d'expérimentation

L'analyse de la structure histologique de l'intestin des lapins sous régimes supplémentés en microalgues et en comparaison avec le lot 1 (témoin) et le lot 5 (infecté non traité) a montré que la paroi duodénale est formée d'une muqueuse qui se caractérise par son aspect vilieux (Figure 4.34 A et B.1). La sous-muqueuse contient les glandes tubuleuses (Brunner) qui sont à la base des cryptes glandulaires (Figure 4.34 C.1). Les extrémités des cryptes étaient intactes (Figure 4.34.D). Aucune anomalie n'a été révélée au niveau de la structure histologique de l'iléon (Figure 4.34.2) et le jéjunum (Figure 4.34.3). Donc aucune anomalie n'a été révélée.

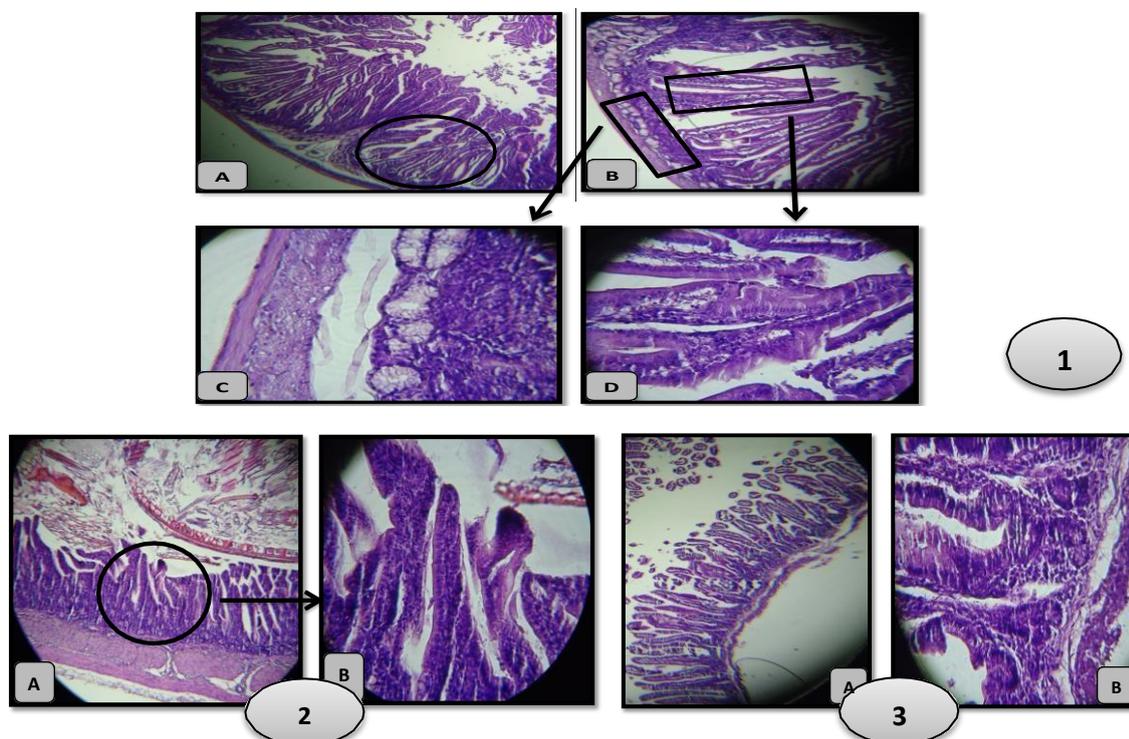


Figure 4.34 : Coupe histologique des fragments de l'intestin grêle. (1) : Duodénum A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B et C : sous muqueuse (Gx 40), D : Cryptes (Gx100). (2) : Iléon A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B : Cryptes (Gx100). (3) : Jéjunum A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B : Cryptes (Gx100).

D'après les autopsies des lapins sacrifiés du lot 5 (infecté non traité), nous avons constaté, des caecums avec des contenus vides, présence de gaz dans l'intestin grêle (Figure 4.35).

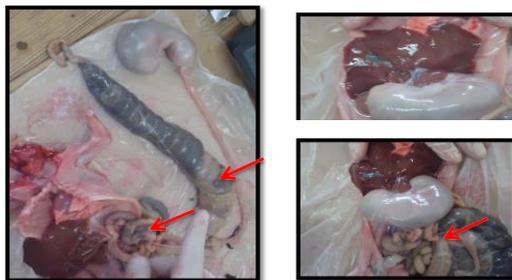


Figure 4.35 : Photos d'autopsie d'un lapin sacrifié du lot 5 (infecté non traité) au J21

D'après l'analyse de la structure des coupes histologiques des lapins infectés non traités sacrifiés au J21, nous avons révélé à une reconstruction de la de la sous-muqueuse ainsi des villosités de la muqueuse (figure 4.36).

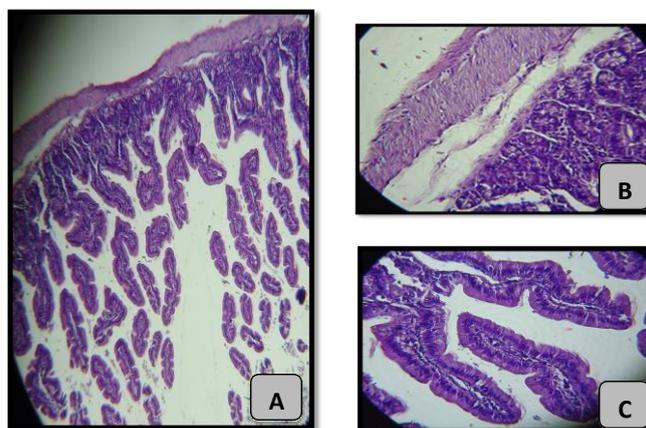


Figure 4.36 : Coupe histologique des fragments de l'intestin grêle d'un lapin du lot 05. A : muqueuse + sous-muqueuse (G x10) ; B : sous muqueuse (Gx 40), C : Cryptes (Gx100).

Après 19 jours post infections post infection, les mêmes observations ont été révélées, aucune anomalie n'a été enregistrée dans les lots 2, 3, 4 et 6, et aussi aucun cas de décès n'a été révélé.

D'après les résultats de l'analyse bactériologique des fécès et des contenus caecaux des lapins des cinq lots expérimentaux et en comparaison avec le lot 01 (Témoin), nous avons révélé un accroissement dans le taux des bifidobactéries durant les 28 jours d'expérimentation, après une administration cette souche probiotique au J7.

Ce qui signifie qu'elle a pu résister au passage du tractus gastro-intestinal. Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par MAHMOUDI *et al.* [282] et qui ont rapporté le survie de la souche *B. bifidum* dans le tractus gastro-intestinal jusqu'au cinquième jour après que l'ingestion était suffisante pour *B. bifidum* pour exercer son effet de probiotique.

Les résultats de dénombrement des bifidobactéries après 21 jours d'administration de la souche probiotique BHI 7 et après 19 jours de provocation d'infection et que la charge de cette souche est $> 10^{10}$ UFC/mL dans les lots 5 lots expérimentaux et en comparaison avec le lot témoin. Ainsi qu'une diminution significative de la charge d'*E. coli* et que les lapins du lot 05 (infecté, régime non supplémenté) ont pu résister à l'infection dont le taux de mortalité était nul à partir du 15 jours d'expérimentation. Ces résultats confirment ceux trouvés par AMROUCHE *et al.* [418], VITINI A. *et al.* [419] et MASTRANDREA *et al.* [420].

MAHMOUDI *et al.* [282] ont démontré que l'administration de la souche de bifidobactérie à une diminution significative dans le taux d'*E. coli* entéro-pathogènes dans les fécès des rats. Une étude clinique qui a été menée par MASTRANDREA *et al.* [406] et qui ont rapportés que l'administration de la souche *Bifidobacterium* a montré un effet positif sur les symptômes cliniques du syndrome de l'intestin irrité.

AMROUCHE *et al.* [418] ont rapporté lors d'une étude *in vitro* et *in vivo* que la prise d'une souche probiotique *B. bifidum* réduit la colonisation du tractus digestif par les bactéries pathogènes et stimule l'immunité spécifique réponse de défense de l'hôte en activant les lymphocytes, la stimulation de l'activité anti-tumorale.

Après 21 jours d'administration de probiotique, une reconstruction de la muqueuse intestinale des lapins du lot 05 (infecté, régime non supplémenté) a été observée. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par MAHMOUDI *et al.* [282] et qui ont confirmé la preuve de l'effet barrière des bifidobactéries, et/ou de protection exercée par *B. bifidum* contre l'infection due par la contamination avec ECEP *E. coli* entéro-pathogènes. D'après tous ces résultats, nous pouvons répondre à notre problématique et confirmer l'effet prébiotique des deux microalgues comme aliment nourrissant la microflore intestinale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les microalgues, organismes unicellulaires, déjà utilisées dans des secteurs tels que la nutraceutique, la cosmétique ou l'agroalimentaire sont une source présentant un fort potentiel pour mettre en évidence de nouvelles molécules à activités biologiques et thérapeutiques.

Le but du travail de recherche présenté dans cette thèse était de mettre en valeur l'effet prébiotique de la supplémentation en deux microalgues d'une cyanobactérie *Spirulina platensis* et une algue verte *Chlorella pyrenoidosa* seule et en association sur une souche probiotique.

Les résultats des analyses phytochimiques préliminaires de la poudre des deux algues révèlent la présence de certains composés bioactifs avec le pourcentage le plus élevé de la teneur en composés phénoliques et des flavonoïdes totaux dans la Chlorelle.

Dans le présent criblage l'extrait méthanolique de la Chlorelle a présenté le spectre d'activité le plus important ($48 \pm 7,07$ mm) avec une CMI de $> 198 \pm 2,12$ µg/ml contre la bactérie *E. coli*. Tandis que celui de la spiruline a présenté un spectre de $43 \pm 4,24$ mm contre *Bacillus subtilis* ATCC 9372 avec une CMI de $128 \pm 0,71$ µg/ml.

La caractérisation des extraits hexadiques qui ont révélés aussi des spectre inhibiteur important par GC-MS a montré la richesse de ces deux microalgues en acides gras saturés et insaturés et qui ont un pouvoir antibactérien très documenté.

Dans l'extrait hexanique de la spiruline, six composants ont été identifiés, le composant majoritaire été : l'acide palmitique (C16:0) avec 12,3% suivi par l'acide linoléique (C18 :2 $\Delta^{9,12}$) avec 6,04 % et l'acide oléique (C18:1 Δ^9) avec 4,25 %, puis l'acide stéarique (C18 :0) avec 1,22 % et l'acide α -linoléique (ALA) (C18 :3 $\Delta^{9,12,15}$) avec 1 % tandis que l'acide palmitoléique (C16 :1 Δ^9) n'a pas excédé 0,62 %. Tandis que, dans l'extrait hexanique de la chlorelle, douze composants ont été identifiés, le composant majoritaire été : l'acide α -linoléique (ALA) (C 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) avec 13,91 % suivi par l'acide linoléique (C 18:2 $\Delta^{9,12}$) (AL) avec 13 % et l'acide palmitique (C16:0)

avec 11,83 %. Nous avons constaté aussi des teneurs importantes en 7,10 acide hexadécanoïque (C16:2) avec 4,18 %, l'acide stéarique (C18:0) avec 2,19 % et l'acide oléique (C18:1) avec 1,35 %. Ainsi que certains acides gras saturés comme : l'acide margarique (anteisoneptadécanoïque) (C17:0) (0,84 %), l'acide pentadécyle (C15 :0) (0,25 %), l'acide tridécanoïque (C13 :0) et l'acide laurique (C12 :0) avec 0,08 % et l'acide lignocérique (C24 :0) et l'acide Eicosanoïque EPA avec 0,07 et 0,06 %, respectivement.

A partir des souches isolées de différents laits et des selles de nourrisson, quatorze bactéries lactiques et cinquante-quatre bactéries bifides ont été identifiées et retenues pour faire l'objet d'une sélection selon les aptitudes technologiques et probiotiques. Cinq souches lactiques et sept souches bifides ont été testées selon leur pouvoir inhibiteur des bactéries pathogènes et leurs résistances aux antibiotiques. La souche *Bifidobacterium bifidum* BHI 07 a été retenue pour faire l'objet des études ultérieures.

D'après les résultats de l'étude de l'effet *in vitro*, il ressort que la supplémentation avec les quatre concentrations testées (1, 3, 5 et 10 %) avec les deux microalgues la cyanobactérie et l'algue verte ont influencées positivement sur le taux de survie de la souche expérimentale *Bf. bifidum*. Cela est dû à l'effet promoteur de la biomasse algale de la croissance bactérienne vue sa richesse en micronutriments.

D'après les résultats de l'étude de l'effet de la supplémentation en ces deux microalgues sur l'interaction de *Bf. bifidum* BHI 7 et des espèces isolées de la flore intestinale résidente. Une concentration de 10 % de supplémentation en chlorelle a montré un effet antibactérien très intéressant, ou nous avons constaté une destruction totale de la souche *E. coli* après 144 h en culture mixte avec les trois autres souches de la flore intestinale résidente (bactéroïdes, *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. BHI7) et même temps une légère inhibition de la croissance de la souche *Lactobacillus* sp. Ainsi que, la concentration 5 % a présenté une influence significative par rapport aux deux autres concentrations testées (1 % et 3 %).

Les résultats de l'étude *in vivo*, ont montrés l'intérêt de l'incorporation des microalgues sur le développement de l'activité microbienne et le survie du lapereau. Une supplémentation de 5 % de la poudre algale dans le régime alimentaire du lapin peut être une alternative à une antibiothérapie dans le cas d'une infection bactérienne due à d'*E. coli*.

Cette étude a permis de mettre en valeur l'effet promoteur des deux microalgues d'étude contre les bactéries pathogènes responsables d'intoxication alimentaires et de mettre en évidence les molécules naturelles à effet thérapeutique antimicrobien afin de limiter la toxicité des médicaments.

En perspectives, il serait intéressant de réaliser les points suivants :

- Purification et caractérisation des principes actifs par LC-MS et RMN ;
- Etude de la cytotoxicité des extraits organiques de ces deux microalgues à fort potentiel antibactérien en vue d'une application industrielle ;
- Etude des mécanismes de synergie entre *Spirulina* sp. et *Chlorella* sp. à l'égard de *Bifidobacterium* sp.;
- Formulation d'un aliment fonctionnel à base des extraits d'intérêt

APPENDICE A : Composition des milieux de culture

Tableau A.1 : Composition du milieu Baird-Parker

Tryptone.....	10 g
Extrait de viande	30 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	20 g
pH ajusté à 7,2. Autoclaver 115 °C pendant 20 min	

Tableau A.2 : Composition de la Gélose Mac Conkey

Bile de bœuf	5 g
Peptone trypsique de gélatine	20 g
Lactose.....	10 g
Pourpre de bromocrésol	10 mg
pH ajusté à 7,3. Autoclaver 120 °C pendant 15 min	

Tableau A.3 : Composition du Milieu MRS (MAN ROGOSA et SHARP)

Glucose.....	20 g
Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf.....	8 g
Acétate de sodium, 3 H ₂ O	5 g
Extrait de levure	4 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Citrate d'ammonium	2 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05 g
Tween 80.....	1 ml
Eau distillée	950 ml
pH ajusté à 6,8 à 7, autoclaver à 120°C/15 mn.	

Tableau A.4: Composition de la Gélose Muller-Hinton

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	10 g
pH ajusté à 7,4. Autoclaver 115 °C pendant 15 min	

Tableau A.5 : Composition de la Gélose M 17 (Terzaghi et Sandine, 1975).

Peptone tryptique de caséine.....	2,5 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Peptone papainique de soja.....	.5 g
Extrait de levure déshydraté.....	..2,5 g
Extrait de viande.....5 g
Glycérophosphate de sodium.....	19 g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.....	0,25 g
Acide ascorbique0,5 g
Lactose5 g
Agar15 g
Eau distillée950 ml.

Tableau A.6 : Composition de la Gélose nutritive

Peptone5 g
Glucose5 g
Extrait de levure3 g
Agar agar15 g
Eau distillée.....1000 mL

APPENDICE A : Composition des milieux de culture

Tableau A.7 : Composition de la Gélose OGA

Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Agar	16 g
pH ajusté à 7. Autoclaver 115 °C pendant 20 min	
Rajouter avant emploi au milieu à 45 °C, 100 mL d'oxytétracycline (terramycine) à 1 mg/mL et couler les boites de Pétri.	

Tableau A.8 : Composition de la Gélose *Salmonella-Shigella* (SS)

Peptone	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Lactose.....	10 g
Sels biliaires.....	6 g
Citrate de sodium.....	8,5 g
Citrate de fer ammoniacal.....	1 g
Hyposulfite de sodium	8,5 g
Rouge neutre	25 mg
Vert brillant	0,33 mg
Agar	13 g
pH ajusté à 7. Stériliser par ébullition (1 à 2 mn)	

Tableau A.9 : Composition de la Gélose semi- solide VF : Milieu viande – Foie gélosé à 6 % (pour mille)

Extrait de viande – Foie	30 g
Glucose	2 g
Gélose	6 g
Répartir en tubes minces sur 12 cm de hauteur ou en tubes à essai ordinaires. Autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes.	

1/ Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs qui ont été utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- Colorants : Violet de Gentiane, Fuschine, cristal violet, phénolphtaléine à 1% ;
- Acides et bases : Soude dornic N/9, acide chlorhydrique 1 M et 5 M, acide nalidixique, acide nitrique.
- Solvants organiques : Acétone, dichlorométhane, chloroforme, éther de pétrole, hexane, méthanol.
- Réactifs : Vogues Proskauer (VPI et VPII), Kovacks, RM (Rouge de méthyle), Nitrite, poudre de zinc.
- Alcool et autres : Ethanol, lugol, eau oxygénée, sulfate de potassium, Sulfate de cuivre, caséine, acides aminés (tyrosine, D-L phénylalanine, leucine, cystéine, glycine), sucres (glucose, galactose, lactose, xylose, arabinose, saccharose, tréhalose, adonitol, tergitol, inositol, raffinose, sorbose, mannose, cellobiose et dextrine), trypsine, albumine sérique bovine (BSA), acétate de sodium, Chlorure de lanthane, sulfate de potassium, sulfate de cuivre., Folin-Ciocalteu, carbonate de calcium, trichlorure d'aluminium
- Antibiotique : Tétracycline

2/ Appareillages

L'appareillage qui a été utilisé est le suivant :

- Agitateur électrique de marque Stuart ;
- Analyse thermogravimétrique (ATG) de marque SDT Q600;
- Autoclave de marque AVX Electronic ;
- Bain Marie de marque Memmert ;
- Balance analytique de marque METTLER TOLEDO ;
- Centrifugeuse Gerber de marque FUMKE;
- Chromatographie liquide de haute performance (HPLC) de marque YL 9100
- Compteur de colonies ;
- Etuves de séchage de marque Memmert;
- Four à moufle de marque Nabertherm;
- Incubateur de marque Memmert ;

APPENDICE B : Liste de produits chimiques, réactifs et appareillages

- Microscope électronique à balayage (MEB) de marque ;
- Microscope optique de marque Leica ;
- pH mètre de marque Hanna ;
- Spectromètre d'absorption atomique (SAA) de marque Agilent Technologies 200 Series AA ;
- Spectromètre IR de marque Alpha;
- Spectromètre UV-Visible de marque Specord 210;
- Spectrométrie de Fluorescence à rayon X (FRX) de marque Rigaku;
- Vortex électrique ;

APPENDICE C : Courbes d'étalonnage des minéraux : sodium, calcium, cuivre, zinc, Fer, cadmium, et Plomb

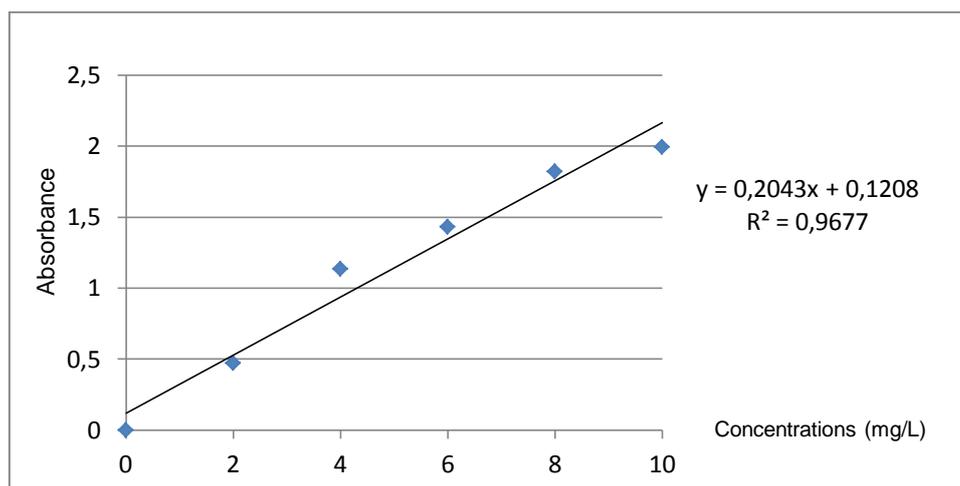


Figure 1.C : Courbe d'étalonnage de sodium

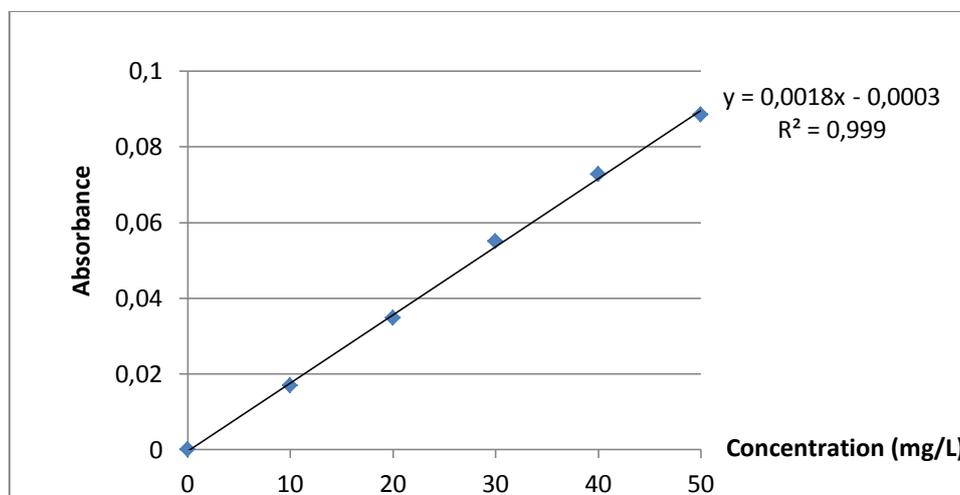


Figure 2.C : Courbe d'étalonnage de calcium

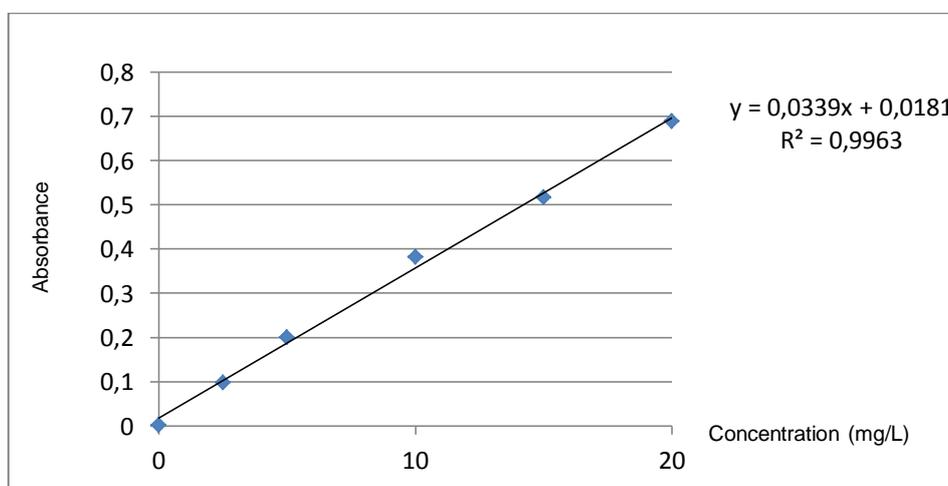


Figure 3.C : Courbe d'étalonnage de potassium

APPENDICE C : Courbes d'étalonnage des minéraux : sodium, calcium, cuivre, zinc, Fer, cadmium, et Plomb

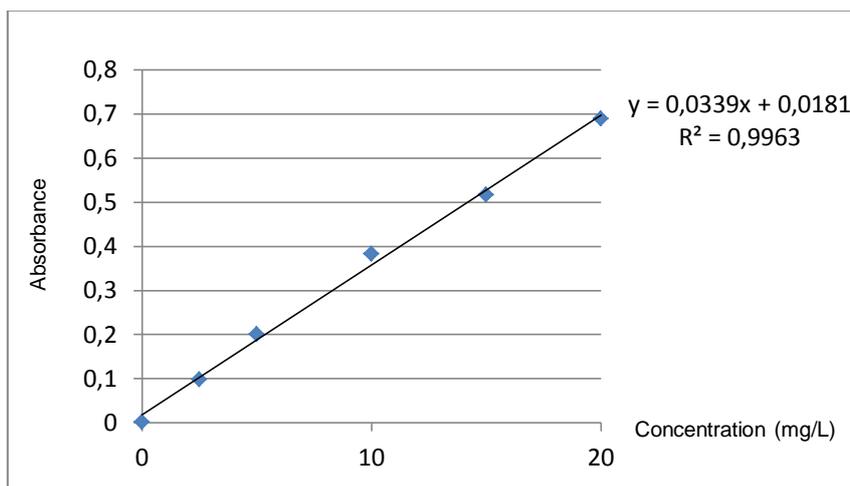


Figure 4.C : Courbe d'étalonnage de magnésium

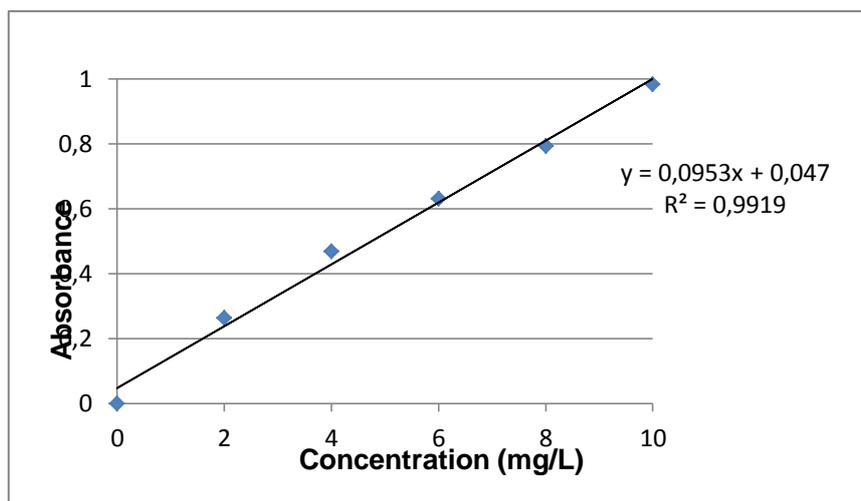


Figure 5.C : Courbe d'étalonnage de cuivre

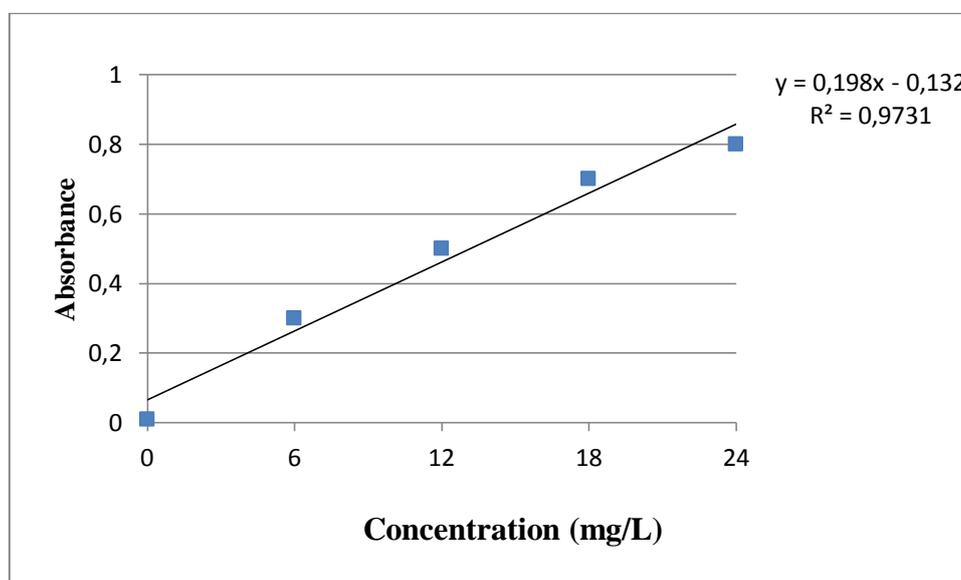


Figure 6.C : Courbe d'étalonnage de fer

APPENDICE C : Courbes d'étalonnage des minéraux : sodium, calcium, cuivre, zinc, Fer, cadmium, et Plomb

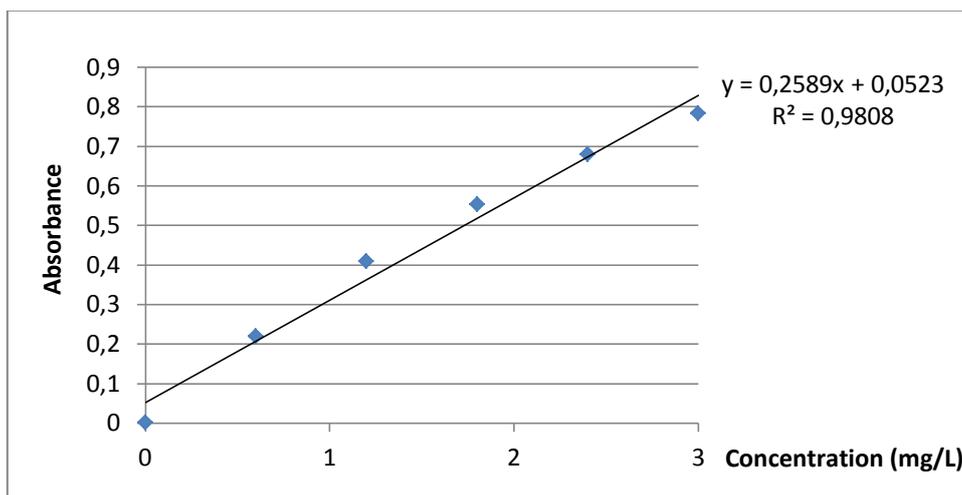


Figure 7.C : Courbe d'étalonnage de cadmium

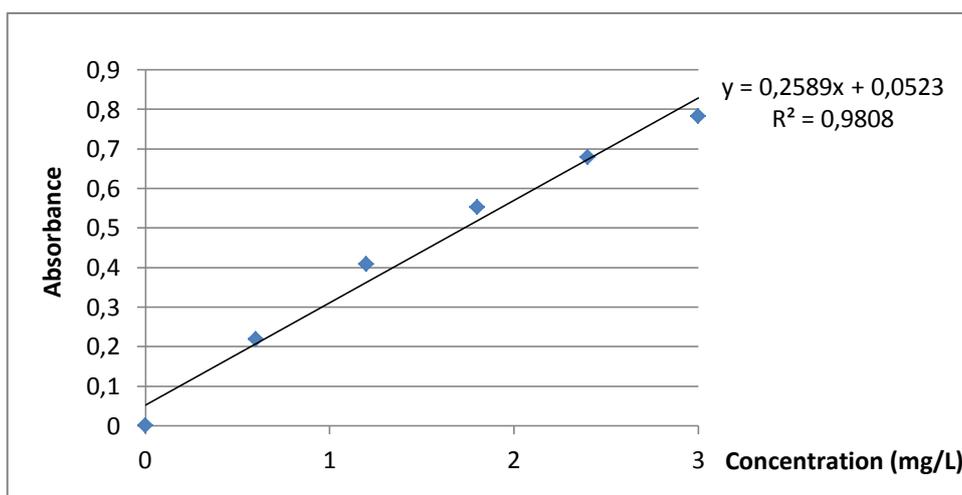


Figure 8.C : Courbe d'étalonnage de plomb

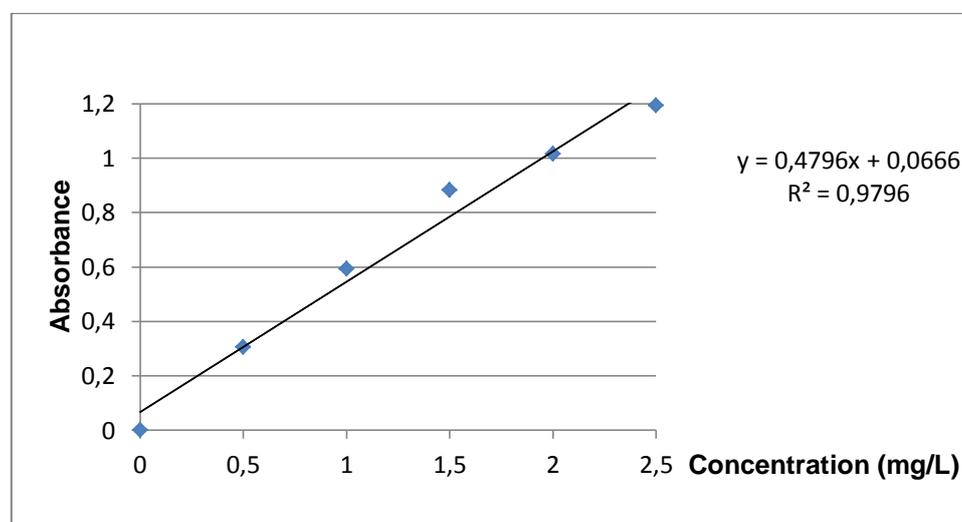


Figure 9.C : Courbe d'étalonnage de zinc

APPENDICE D : Système d'extraction au soxhlet et de concentration des extraits organiques

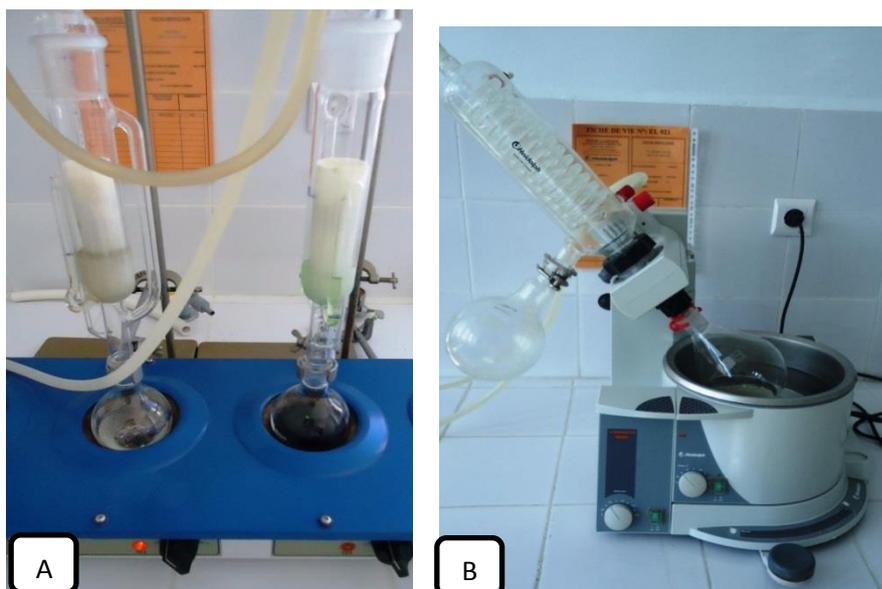


Figure 1.D : Système d'extraction au soxhlet et de concentration des extraits organiques. A : Extraction par reflux ; B : Concentration (Photographie originale).

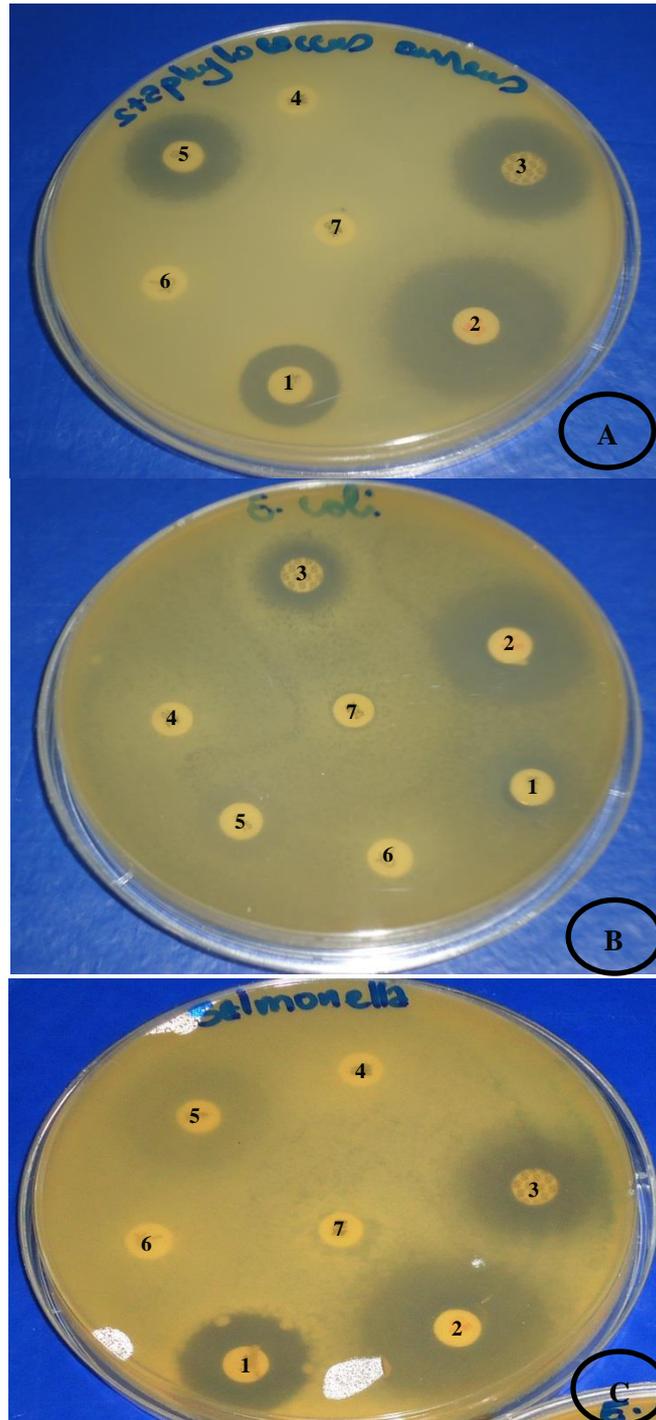


Figure 1.E : Photos d'antibiogramme des souches pathogènes : (A) : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, (B), *Escherichia coli* ATCC 25922, (C) : *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. (1) : la chloramphénicol (30 μ g), (2) : la gentamicine (10 μ g), (3) : la streptomycine (10 μ g), (4) : l'amoxicilline (25 μ g), (5) : l'érythromycine (15 μ g), (6) : l'oxacilline (1 μ g), (7) : l'ampicilline (10 μ g).

APPENDICE F : Courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine, l'acide tannique et la vanilline

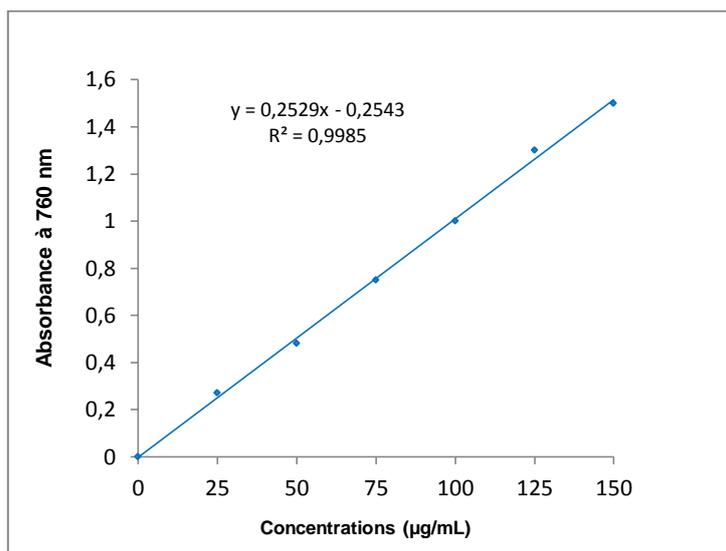


Figure 1.F : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

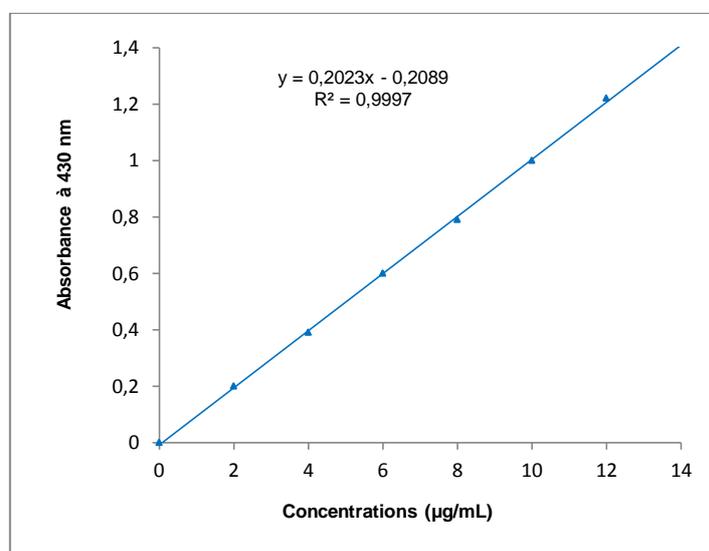


Figure 2.F : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

APPENDICE F : Courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine, l'acide tannique et la vanilline

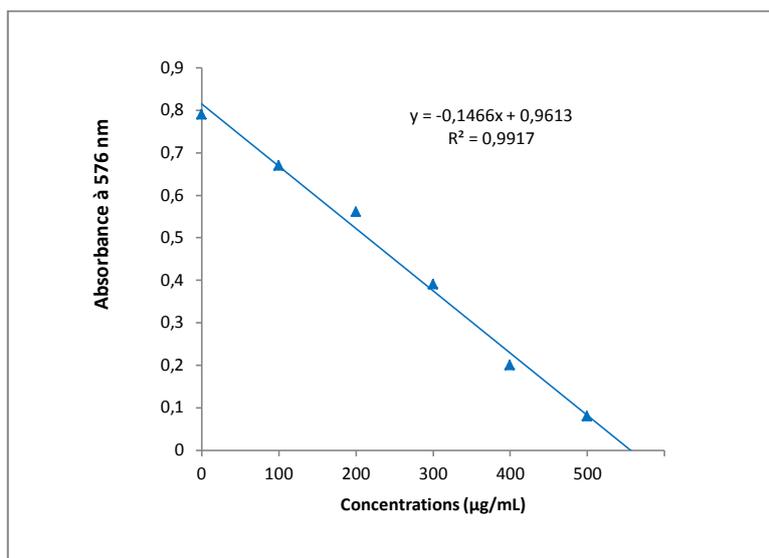


Figure 3.F: Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

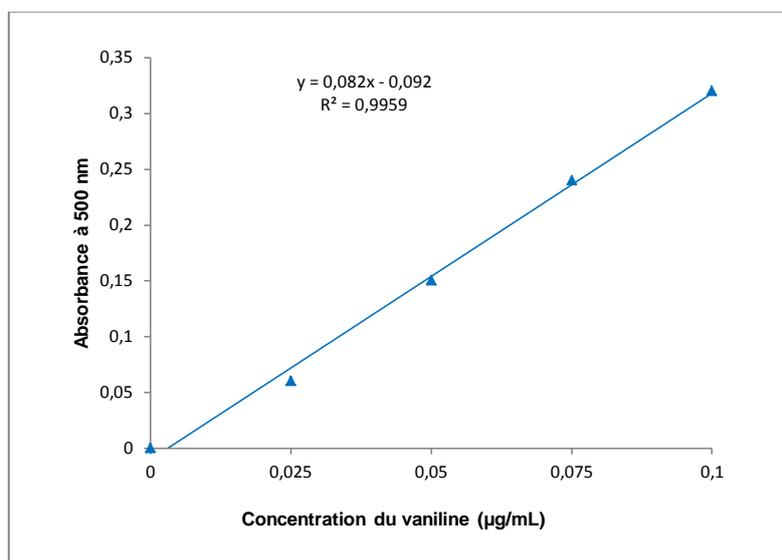


Figure 4.F : Courbe d'étalonnage de la vanilline

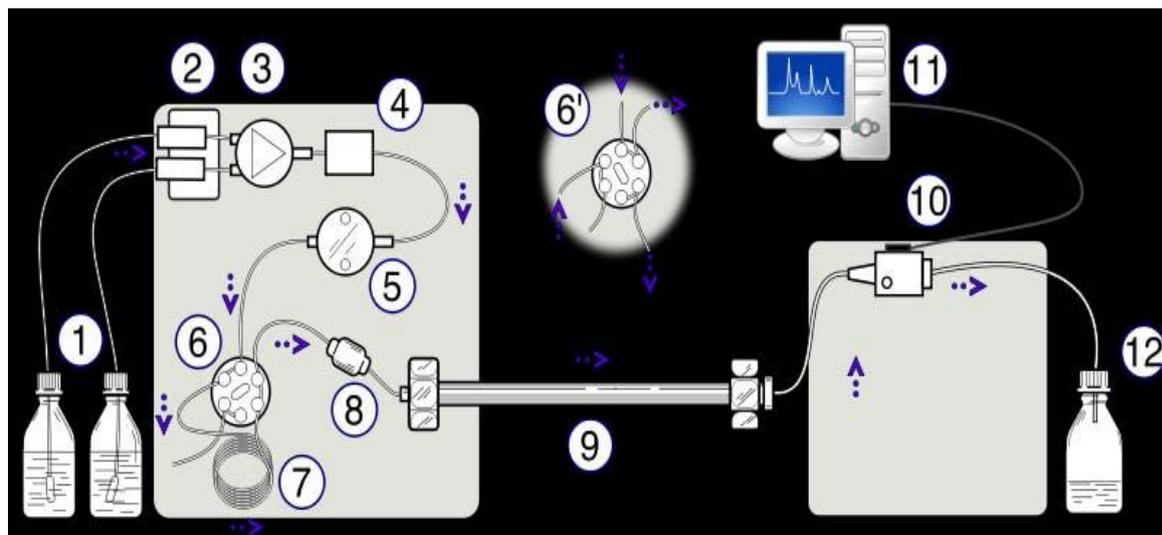


Figure 1.G : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance. 1- Réservoirs des solvants, 2 - Dégazeur, 3 - Valve de gradient d'élution, 4 - Doseur de phase mobile (ou éluant), 5 - Pompe à haute pression, 6 - Vanne d'injection en position "inject", 6' - Vanne d'injection en position "load", 7 - Boucle d'injection de l'échantillon, 8 – Précolonne (éventuelle), 9 - Colonne analytique, 10 – Détecteur, 11 - Acquisition du signal, 12 - Décharge déchets [259].

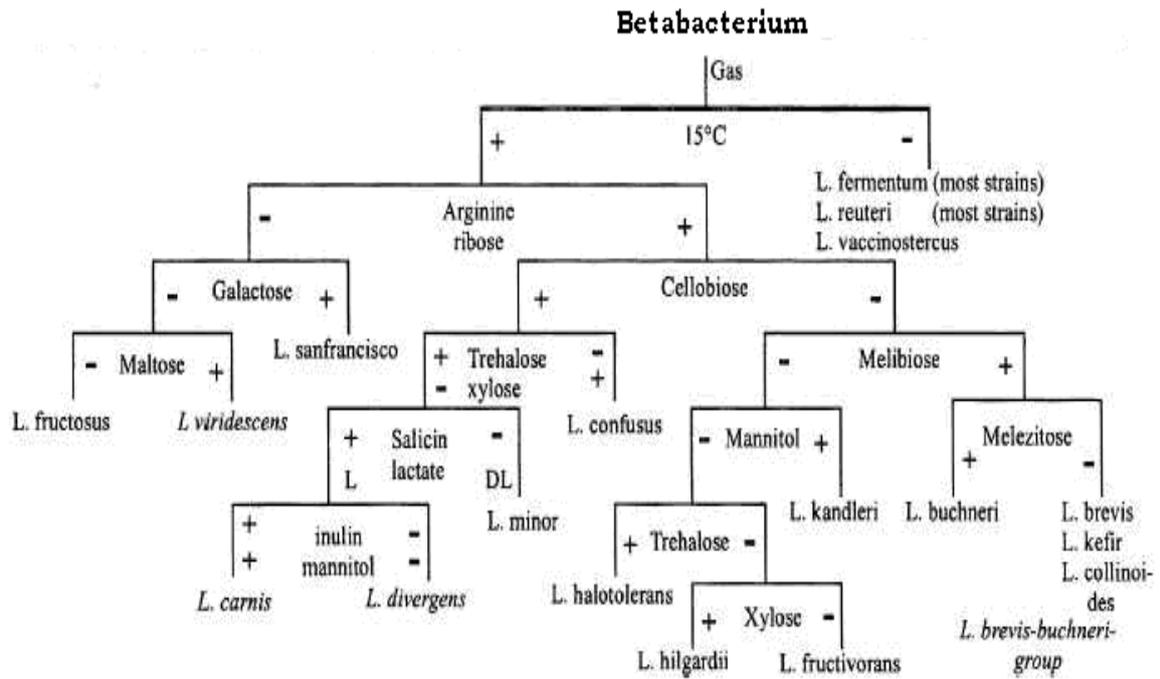


Figure H.3 : Schéma d'identification dichotomique rapide pour lactobacilles hétéro-fermentatif [416].



Figure 1.I : Photo des cages en batterie avec des mangeoires et tétines



Figure 2.I : Photos des aliments expérimentaux granulés A : régime de contrôle, B : régime supplémenté en chlorelle, C : régime supplémenté de la combinaison des deux algues, D : régime supplémenté en spiruline.

APPENDICE I



Figure 3.I : Photo de pesée des lapins



Figure 4.I : Photos des autopsies et étude des paramètres du système digestif des lapins



Figure 5.I : Photo du sacrifice d'un lapin



Figure 6.I : Echantillons conservés dans le formol 10 %



Figure 7.I : Photo d'inclusion à la paraffine pour la préparation des blocs



Figure 8.I : Photo d'un microtome

APPENDICE J : Grille de notation de l'état sanitaire des lapereaux

Tableau J.1 : Contrôle de la morbidité

Code	Symptômes
R	Problèmes respiratoires, coryza, toux
B+	Ballonnement important
L	« bruit d'eau » au niveau de l'estomac ou caecum (à la palpation)
P	Parésie caecale (contenu compact ou dur, à la palpation)
DF	Diarrhée faible – souillure faible et peu colorée (claire à jaune clair)
DD	Diarrhée débutante –faible souillure mais colorée (brun-marron)
DS	Diarrhée « sèche » -souillure colorée, mais sèche.
M	Présence de mucus.
A	Autres : mammites, maux de pattes, œdèmes, pattes cassées, morsure, mycoses, myxomatoses etc.....à préciser.
O.K	R.A.S (bon état sanitaire)

Tableau J.2 : Contrôle de la mortalité

Code	Symptômes
D+	Diarrhée nette (arrière train souillé et coloré)
D-	Diarrhée faible (souillure faible mais colorée de l'arrière train) = signe colibacillose.
DF	Diarrhée faible –souillure faible et peu colorée (clair à jaune clair) = signe d'entérocolite épizootique du lapin EEL.
B	Ballonnement important de l'abdomen.
P	Parésie totale.
R	Problèmes respiratoires: coryza, toux.
E	EEL : si forte présomption, soit au moins un ballonnement important et diarrhée faible.
A	Autres : décès ou élimination pour cause accidentelle.
I	Inconnue (en cas de doute sur l'origine de la mort).

APPENDICE K : Tableaux d'identification des composés phénoliques et
caroténoïdes

Tableau K.1 : Compositions phénoliques d'extrait brut hydro-méthanolique de
Spirulina platensis analysés par HPLC.

N°	Temps de rétention (min)	Surfaces (%)	Composants
01	3,4	7,9	Non identifié
02	4,3	11,1	Non identifié
03	5,0	3,3	Non identifié
04	5,5	3,6	Non identifié
05	6,8	3,1	Acide gallique
06	8,0	5,4	Non identifié
07	8,9	5,8	Non identifié
08	9,8	2,1	Non identifié
09	10,7	2,4	Résorcinol
10	11,6	2,2	Non identifié
11	13,1	1,0	Non identifié
12	14,0	0,6	Non identifié
13	14,7	0,3	Non identifié
14	15,2	0,8	Non identifié
15	16,1	1,5	Non identifié
16	17,2	0,3	Non identifié
17	17,8	1,1	Non identifié
18	18,6	0,6	Non identifié
19	19,2	0,4	Non identifié
20	19,9	0,9	Non identifié
21	20,9	0,4	Non identifié
22	21,3	0,5	Catéchine
23	21,8	0,2	Non identifié
24	22,4	1,2	Vanilline
25	23,9	1,0	Non identifié
26	24,5	0,5	Non identifié
27	24,8	0,9	Non identifié
28	25,5	0,5	Acide coumarique
29	26,1	0,8	Acide férulique
30	27,1	0,6	Non identifié
31	28,7	4,3	Acide carboxylique
32	31,1	2,4	Non identifié
33	34,4	2,4	Non identifié
34	36,1	1,5	Quercétine
35	37,9	1,2	Non identifié
36	39,3	1,0	Acide trans2.4Dimetoxy Cinamique
37	39,8	1,3	Non identifié
38	41,1	0,6	Kaempferol
39	41,8	0,4	Non identifié
40	42,2	0,7	Non identifié
41	42,8	0,5	Non identifié
42	43,7	1,2	Non identifié

APPENDICE K : Tableaux d'identification des composés phénoliques et
caroténoïdes

43	44,6	0,8	Non identifié
44	46,0	1,4	Non identifié
45	46,8	1,0	Non identifié
46	47,4	0,4	Non identifié
47	47,9	1,0	Non identifié
48	48,6	1,1	Non identifié
49	49,6	0,8	Non identifié
50	50,1	0,7	Non identifié
51	51,1	2,9	Non identifié
52	53,7	2,4	Non identifié
53	56,1	1,9	Non identifié

Tableau K.2 : Compositions phénoliques d'extrait brut hydro-méthanolique de
Chlorella pyrenoidosa analysés par HPLC.

N°	Temps de rétention (min)	Surfaces (%)	Composants
01	3,4	6,9	Non identifié
02	3,5	10,7	Non identifié
03	4,5	16,3	Non identifié
04	5,3	13,3	Non identifié
05	7,4	6,6	Acide gallique
06	8,1	3,1	Non identifié
07	8,6	10,8	Non identifié
08	9,3	5,8	Non identifié
09	10,1	2,5	Résorcinol
10	10,8	2,0	Non identifié
11	11,5	1,4	Non identifié
12	12,2	0,6	Non identifié
13	12,7	0,9	Non identifié
14	13,3	0,7	Non identifié
15	14,5	0,6	Non identifié
16	15,3	0,7	Non identifié
17	15,9	0,6	Non identifié
18	16,9	2,6	Non identifié
19	17,6	0,1	Non identifié
20	18,2	0,3	Non identifié
21	18,9	0,1	Non identifié
22	19,7	0,2	Non identifié
23	21,1	0,1	Catéchine
24	21,5	0,1	Non identifié
25	22,0	0,1	Acide syringique
26	22,7	0,6	Vanilline
27	24,1	0,3	Non identifié
28	24,5	0,2	Non identifié
29	25,1	0,5	Acide Trans. Cinnamique

APPENDICE K : Tableaux d'identification des composés phénoliques et
caroténoïdes

30	25,7	0,3	Acide coumarique
31	26,5	0,1	Acide férulique
32	26,9	0,2	Non identifié
33	27,8	0,1	Non identifié
34	29,3	2,3	Non identifié
35	32,1	0,1	Euteropeine
36	34,5	0,4	Non identifié
37	35,0	0,9	Non identifié
38	36,1	0,4	Quercétine
39	38,0	0,1	Non identifié
40	39,1	0,1	Acide trans2.4Dimetoxy Cinamique
41	39,8	0,2	Non identifié
42	43,0	0,2	Non identifié
43	44,7	0,1	Non identifié
44	45,7	0,2	Non identifié
45	47,1	0,1	Non identifié
46	47,8	0,5	Non identifié
47	49,2	1,3	Non identifié
48	51,3	1,4	Non identifié
49	53,2	0,1	Non identifié
50	53,7	0,2	Non identifié
51	54,7	0,3	Non identifié
52	55,8	0,7	Non identifié
53	57,4	1,2	Non identifié
54	58,8	0,2	Non identifié

Tableau K.3 : Compositions caroténoïdes d'extrait brut hydro-méthanolique de
Spirulina platensis analysés par HPLC.

N°	Temps de rétention (min)	Surfaces (%)	Composants
01	3,2		Non identifié
02	3,7		Non identifié
03	7,4		Chlorophylle c₁
04	8,1		Non identifié
05	8,4		Non identifié
06	9,9		Non identifié
07	10,3		Non identifié
08	10,9		Fucoxanthine
09	11,7		Uriolide
10	12,2		Non identifié
11	12,8		Néoxanthine
12	13,4		Prasinoxanthine
13	13,7		Non identifié
14	14,0		Violaxanthine

APPENDICE K : Tableaux d'identification des composés phénoliques et
caroténoïdes

15	14,3		Non identifié
16	14,9		Non identifié
17	15,5		Diadinoxanthine
18	16,6		Alloxanthine
19	17,2		Non identifié
20	20,9		Non identifié
21	22,8		Non identifié
22	23,2		Non identifié
23	23,9		Non identifié

Tableau K.4 : Compositions caroténoïdes d'extrait brut hydro-méthanolique de
Chlorella pyrenoidosa analysés par HPLC.

N°	Temps de rétention (min)	Surfaces (%)	Composants
01	3,2	3,2	Non identifié
02	7,6	1,6	Non identifié
03	7,9	1,9	Chlorophylle c₁
04	8,6	11,3	Non identifié
05	9,2	3,2	Non identifié
06	9,6	6,1	Non identifié
07	10,4	4,1	Non identifié
08	10,8	5,7	Fucoxanthine
09	11,8	6,3	Uriolide
10	12,3	2,1	Non identifié
11	12,6	4,9	Non identifié
12	13,3	7,5	Prasinoxanthine
13	14,1	8,4	Violaxanthine
14	14,7	5,8	Non identifié
15	15,2	3,2	Diadinoxanthine
16	15,5	3,3	Non identifié
17	16,1	6,8	Antheraxanthine
18	16,9	2,9	Alloxanthine
19	17,5	1,5	Lutéine
20	18,1	2,7	Zeaxanthine
21	19,8	0,8	Chlorophylle b
22	20,1	1,0	Non identifié
23	21,5	0,6	Chlorophylle a
24	22,0	0,4	Non identifié
25	23,0	0,7	Non identifié
26	23,3	0,6	Non identifié
27	23,7	0,4	Non identifié
28	24,5	3,2	Non identifié

APPENDICE K : Tableaux d'identification des composés phénoliques et
caroténoïdes

Tableau K.5 : Identification des caroténoïdes dans les microalgues (Kraay et al.,
1992) [55]

N°	Temps de rétention (min)	Pigments
01	4,39	Chlorophyllide a
02	6,34	Chlorophylle c ₃
03	7,27	Chlorophylle c ₁
04	7,94	Chlorophylle c ₂
05	10,71	Fucoxanthine
06	11,38	Hexanoyloxyfucoxanthine
07	11,62	Uriolide
08	12,15	Non identifié
09	12,39	Neoxanthine
10	13,06	Prasinoxanthine
11	13,90	Violaxanthine
12	14,46	Non identifié
13	15,29	Diadinoxanthine
14	16,11	Antheraxanthine
15	16,50	Alloxanthine
16	17,68	Lutéine
17	18,16	Zeaxanthine
18	19,65	Chlorophylle b
19	21,54	Chlorophylle a
20	24,22	Non identifié
21	25,73	β, ψ Carotène
22	26,28	β, β Carotène
23	26,00	Phytol Chlorophylle c

APPENDICE L : Résultats du criblage des souches lactiques et des bifidobactéries

Tableau L.1 : Suivi du pouvoir acidifiant des bifidobactéries

	T ₀	T ₂	T ₄	T ₂₄	T ₂₈	T ₄₈	1,45
BHI 1	6,43	6,31	6,12	5,21	5,14	4,93	1,31
BHI 3	6,44	6,33	6,09	5,21	5,13	4,94	1,30
BHI 4	6,8	6,75	6,65	6,5	6,46	6,35	0,45
BHI 5	6,77	6,65	6,35	5,32	5,18	4,87	1,90
BHI 7	6,7	6,63	6,2	5,6	5,03	4,86	1,84
BHI 8	6,4	6,14	5,95	5,52	5,34	5,12	1,28
BHI 33	6,79	6,7	6,66	6,5	6,53	6,41	0,38

Tableau L.3 : Suivi du pouvoir acidifiant des souches lactiques

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	Δ pH
Lc 02	6,56	6,04	5,76	5,46	5,42	5,3	1,26
Lc 03	6,4	6,09	5,78	5,34	5,33	5,35	1,71
Pc 01	6,16	6,01	5,86	5,11	4,95	4,77	1,39
Pc 02	6,52	6,23	5,26	4,12	4,05	3,94	2,58
Sc 01	6,32	6,21	6,05	5,38	5,3	5,24	1,4
Sc 02	6,94	6,21	5,89	5,15	5,28	5,23	1,05
Sc 03	6,33	6,28	6,04	5,06	4,93	4,93	1,08
Ec 01	6,6	6,13	5,84	5,48	5,36	5,33	1,27
Ec 02	6,3	5,98	5,69	5,08	5,04	4,88	1,42
Lb 01	6,6	6,54	6,46	5,05	4,8	4,67	1,93
Lb 02	6,53	6,44	6,38	4,35	4,3	4,17	2,36

Tableau L.4 : Suivi de l'acidité des souches lactiques

Acidité	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Lc 02	18	18	20	30	37	42
Lc 03	18	19	22	34	40	48
Pc 01	16	23	28	41	50	62
Pc 02	17	26	30	47	63	75
Sc 01	15	19	23	32	36	40
Sc 02	15	17	21	28	31	34
Sc 03	15	16	19	25	28	31
Ec 01	20	26	28	32	35	40
Ec 02	21	28	30	35	38	42
Lb 01	20	24	28	53	67	80
Lb 02	28	30	38	80	93	100

APPENDICE L : Résultats du criblage des souches lactiques et des bifidobactéries

Tableau L.5 : Suivi de la cinétique de la croissance des bifidobactéries

	T₀	T₂	T₄	T₂₄	T₂₈	T₄₈	G (h)	μ (h⁻¹)
BHI 1	5,99	6,83	7,81	8,25	8	7,94	0,31	3,25
BHI 2	5,9	7,55	7,86	7,95	8,39	7,99	0,29	3,49
BHI 3	5,56	7,57	7,52	6,26	8,16	7,93	0,25	3,94
BHI 4	6,94	6,99	7,12	7,63	7,84	7,58	0,94	1,07
BHI 5	6,57	7,62	7,8	8,21	8,27	8,5	0,31	3,22
BHI 7	6,85	6,94	7,15	7,69	7	10,8	0,15	6,58
BHI 8	5,97	6,3	6,86	7,37	7,43	7,51	0,39	2,57
BHI 33	6,8	7,04	7,67	7,86	7,91	7,12	1,88	0,53

Tableau L.6 : Suivi de la cinétique de la croissance des souches lactiques

Log UFC	T₀	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅	μ (h⁻¹)	G (h)
Lc 02	6,63	6,82	6,94	7,37	7,65	7,98	26,67	0,04
Lc 03	6,89	7,11	7,46	7,79	8,03	8,28	25,90	0,04
Pc 01	6,41	6,63	6,86	7,48	7,85	7,93	23,68	0,04
Pc 02	7,26	7,69	8,18	9,05	9,31	9,6	15,38	0,07
Sc 01	6,77	6,84	7,03	7,65	7,89	8,27	24,00	0,04
Sc 02	6,58	6,74	6,82	6,94	7,18	7,39	44,44	0,02
Sc 03	6,35	6,39	6,58	7,05	7,4	7,43	33,33	0,03
Ec 01	6,7	6,88	7,04	7,43	7,71	8,05	26,67	0,04
Ec 02	6,84	6,96	7,29	7,72	7,97	8,41	22,93	0,04
Lb 01	8,92	9,18	9,3	10,68	10,7	10,67	20,57	0,05
Lb 02	8,95	9,29	9,43	9,79	9,81	9,73	46,15	0,02

APPENDICE M : Suivi des paramètres zootechniques des lapins des six lots expérimentaux

Tableau M.1 : Effet de la supplémentation en microalgues sur les performances de croissance des lapereaux

	Lot 01	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05	Lot 06
Poids initial	793,33 ± 203,46	773 ± 213,15	821,33 ± 222,36	798 ± 223	793,33 ± 203,46	778,67 ± 207,96
Poids final	847,83 ± 439,48	839,67 ± 172,63	882,4 ± 229,95	843 ± 225	1100,67 ± 120,01	815,07 ± 169,45
Gain du poids (g)	54,50 ± 311,13	66,67 ± 55,99	60,00 ± 172,67	45 ± 132,4	155,00 ± 165,44	36,40 ± 146,73

Tableau M.2 : Effet de la supplémentation en microalgues sur la prise alimentaire des lapereaux

	Lot 01	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05	Lot 06
Prise alimentaire	55,43	66,00	58,24	63	86,71	40,98

APPENDICE N : Résultats de l'analyse bactériologique des fécés et du contenu caecal des lapins des 06 lots expérimentaux

Tableau N.1 : Charge de la flore totale (exprimée en Log UFC/ mL) des fécés et du contenu caecal (CC) des lapereaux

Germes totaux mésophiles (Log UFC/g)	J7	J 14	J 21	J 28	CC
Lot 01	7,65	7,86	6,73	7,9	9,14
Lot 02	7,86	3,86	4,59	3,74	4,96
Lot 03	6,73	9,03	6,8	4,82	4,7
Lot 04	7,9	6,38	4,67	2,69	4,46
Lot 05	9,14	9,92	7,38	6,48	5,04
Lot 06	8,83	8,4	3,35	3,07	4,14

Tableau N.2 : Charge d'*E. coli* (exprimée en Log UFC/ mL) des fécés et du contenu caecal des lapereaux

<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	J7	J 14	J 21	J 28	CC
Lot 01	6,43	6,45	6,49	6,5	5,37
Lot 02	6,07	3,67	3,56	1,96	1,1
Lot 03	6,93	3,4	3,25	2,72	1,3
Lot 04	6,15	3,48	3	3,78	1,06
Lot 05	7,68	9,0	6,8	5,03	2,03
Lot 06	6,63	3,9	3,48	4,18	4,31

Tableau N.3 : Charge de *Streptococcus* sp. (exprimée en Log UFC/ mL) des fécés et du contenu caecal des lapereaux

<i>Streptococcus</i> sp. (Log UFC/g)	J7	J 14	J 21	J 28	CC
Lot 01	5,93	6,27	6,45	7,69	5,13
Lot 02	6,74	6,16	5,44	4,6	5,02
Lot 03	6,98	5,79	5,38	4,72	5,58
Lot 04	7,15	6,84	6,37	6,15	6,52
Lot 05	7,82	7,3	5,62	5,48	4,01
Lot 06	7,88	6,16	5,96	3,13	3,13

APPENDICE N : Résultats de l'analyse bactériologique des fécés et du contenu caecal des lapins des 06 lots expérimentaux

Tableau N.4 : Charge de *Lactobacillus* sp. (exprimée en Log UFC/ mL) des fécés et du contenu caecal des lapereaux

<i>Lactobacillus</i> sp. (Log UFC/g)	J7	J 14	J 21	J 28	CC
Lot 01	7,27	5,48	4,21	2,78	1,5
Lot 02	7,32	3,89	3,92	2,44	3,39
Lot 03	7,4	4,05	3,95	2,9	3,48
Lot 04	7,38	4,74	4,33	3,18	3,72
Lot 05	5,34	2,37	2,8	1,62	1,96
Lot 06	7,44	4,8	3	2,03	1,4

Tableau N.5 : Charge de *Bifidobacterium* sp. (exprimée en Log UFC/ mL) des fécés et du contenu caecal des lapereaux

<i>Bifidobacterium</i> sp (Log UFC/g)	J7	J 14	J 21	J 28	CC
Lot 01	4,44	3,93	3,77	3,51	2,3
Lot 02	5,1	12,45	12,52	12,09	7,21
Lot 03	4,86	13,62	13,79	12,23	4,44
Lot 04	4,71	13,65	13,68	11,76	6,9
Lot 05	3,54	11,28	8,75	7,42	4,24
Lot 06	3,57	13,19	11,39	10,6	4,31

Tableau N.6 : Charge des anaérobies sulfito-réducteurs (exprimée en Log UFC/ mL) des fécés et du contenu caecal des lapereaux

Anaérobie sulfito-réducteur (Log UFC/g)	J7	J 14	J 21	J 28	CC
Lot 01	0	0	0,8	1,05	3,78
Lot 02	2,44	2,91	2,87	0	3,26
Lot 03	1,53	2,17	2,05	0	2,1
Lot 04	0,06	0,14	0,3	0,39	1,82
Lot 05	0,96	1,07	1,13	1,3	3,17
Lot 06	2,66	2,32	1,94	3,01	3,31

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Molan, P.C., *The role of honey in the management of woundos, A review of the evidence on the advantages of using honey as a topical wound treatment together with ractical recommadations for its clinical use* Journal of wound care, 1999. **08**(08): p. 415- 418.
2. Morère J.L., P.R., *Dictionnaire raisonné de biologie*, in Editions Frison-Roche, 2002. p. 1222 p. .
3. Ghasemi Y., M.A., Mohagheghzadeh A., Shokravi S., Morowvat M.H. , *Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of Chlorococcus dispersus*. J. Biol. Sci. , 2007. **7**: p. 904-910.
4. Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I. & Widiastuti, E. , *Effect of feeding duration of Spirulina platensis on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler chicks*. South African Journal of Animal Science 2018. **48**(1): p. 98-107.
5. Prakash J.W., A.J.M., Jeeva S. , *Antimicrobial activity of certain fresh water microalgae from Thamirabarani River, Tamil Nadu, South India*. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2011: p. S170-S173.
6. Justo, G.Z., Silva, M. R. & Queiroz, M.L.S., *Effects of green algae chlorella vulgaris on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascitestumour transplantation in mice*. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2001. **23**: p. 131-199.
7. Lauritano, C., et al., *Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities*. Frontiers in Marine Science, 2016. **3**: p. 68.
8. Levine, I.A., *Algae: a way of life and health*, in *Microalgae in Health and Disease Prevention*2018, Elsevier. p. 1-10.
9. Akhtar, N., et al., *Growth response of Spirulina platensis in papaya skin extract and antimicrobial activities of Spirulina extracts in different culture media*. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 2012. **47**(2): p. 147-152.
10. Brennan L., O.P., *Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renew. Sustain. Energy. Rev, 2010. **14**: p. 557 - 577.
11. Analie Lourens-Hattingh, B.C.V., *Yogurt as probiotic carrier food*. International Dairy Journal, 2001. **11**: p. 1–17.
12. Rasic, J.L., *Microflora of the intestine probiotics*. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (pp. 3911-3916). Oxford: Academic Press, 2003.
13. D'Aimmo, M.R., M. Modesto, and B. Biavati, *Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **115**(1): p. 35-42.
14. Ranadheera, R., Baines, SK Adams, MC, *Importance of food in probiotic efficacy*. Food Research International, 2010. **43**(1): p. 1-7.
15. Jingrui, W., Zhuqing, Xing,Wei, Tang, Yongna, Zheng, Yanping, Wang, *Isolation, Identification, and Potential Probiotic Characterization of One Lactococcus from Kefir Grain*. Food Sci. Biotechnol., 2015. **24**(5): p. 1775-1780.
16. Becerra Celis, G.P., *Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu*. Thèse de Doctorat, Ecole supérieure d'électricité, Gif-sur-Yvette (France). 2009.
17. Hela, B.A.B.A., *Etude et optimisation de la bioaccumulation de magnésium dans les microalgues «Chlorella vulgaris»*. Thèse de doctorat, universite paris-saclay, France, 2015. **P. 215**

18. Sumi Y., *Microalgae Pioneering the Future - Application and Utilization*. Life Science Research Unit, quarterly review 2009. **No.34**.
19. Falkowski PG, K.M., Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJR,, *The evolution of modern eukaryotic phytoplankton*. Science, , 2004. **305** p. 354–360.
20. Ainane, T., *Valorisation de la biomasse algale du Maroc: Potentialités pharmaceutiques et applications environnementales, cas des algues brunes Cystoseira tamariscifolia et Bifurcaria bifurcata* Thèse de Doctorat - Université Hassan II- Casablanca, Maroc, 2011: p. 203 p.
21. Reviere, B., *Biologie et phylogénie des algues*. Belin, 2002. **1**: p. pp 351.
22. Andersen, 1992.
23. Rai, S.a., 2011.
24. Gaël, R., *Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges*. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, France, , 2005: p. P. 256.
25. Ozenda, P., *Les végétaux organisation et diversité biologique*. Dunod., 2000.
26. Pasquet, V., *Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines*. Thèse de Doctorat - Université de la Rochelle, France, 2011: p. P. 225.
27. B., S., *Determination of pigments in vegetables*. J Chromatogr. , 2004. **1054**: p. 217-26.
28. Virginie Mimouni, L.U., Virginie Pasquet, Marie Mathieu, Laurent Picot, Gaël Bougaran, Jean-Paul Cadoret, Annick Morant-Manceau and Benoît Schoefs, *The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012. **13**: p. 2733-2750.
29. Cubas C., G.L., M. and Gonz´alez, M., *Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (Phaseolus vulgaris L.) by N,N-dimethylformamide using response surface methodology*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **vol. 21**, (no. 2): p. pp. 125 – 133.
30. Humphrey, A.M., *Chlorophyll as a color and functional ingredient*. Journal of Food Science, 2004. **V. 69**(n° 5): p. 422–425.
31. Scheer, H., William, J.L. and Lane, M. D., *Chlorophylls and carotenoids,” in Encyclopedia of Biological Chemistry* Elsevier, New York, NY, USA., 2004: p. pp. 430– 437.
32. Guignard, J., *Biochimie végétale*. Dunod., 2000.
33. Aris H., S.L., Ronald H., and Michael K. D., *Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects*. International Journal of Chemical Engineering, 2010. **2010**: p. 11. P.
34. Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W. , *Phytoplankton pigments in oceanography*. UNESCO publishing, 1997.
35. Berns, D.S.a.M.C., R. , Chem. Rev., 1989. **89**: p. 807- 825.
36. Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G. & Collier, J. , *The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions*. Microbiological Reviews, 1993. **57**: p. 725-749. .
37. Kato, T., *Blue pigment from Spirulina*. New Food Industry 1994. **29**: p. 17–21.
38. Chariemagne, 2008.
39. Brejc K., F.R., Huber R., Steinbacher S. , J. Mol. Biol., 1995: p. 249, 424.
40. Jyotirmayee, P., Sachidanansa, Das and Basanta Kumar, Das, *Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review* African Journal of pharmacy and Pharmacology, 2014. **8**(32): p. 809-818.
41. Cardozo KHM, G.T., Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E *Metabolites from algae with economical impact*. Comp. Biochem. Phys. Part C Toxicol. Pharmacol. , 2007. **146**: p. 60 - 78.

42. Rodríguez-Meizoso I, J.L., Santoyo S, Señorans F, Cifuentes A, Ibáñez E, *Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from Haematococcus pluvialis microalga*. J. Pharm. Biomed. Anal. , 2010. **51(2):456-63**.
43. Wijesekara I., P.R., Kim S., *Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae*. Carbohydr. Polym. , 2010. **84(5)**: p. 14-21.
44. Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A., Reglero, G., Santoyo, S., *Dunaliella salina microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials*. J. Food Prot. , 2006. **69**: p. 2471-2477.
45. Rodríguez-Meizoso I, J.L., Santoyo S., Cifuentes A., García-Blairsy R.G., Señorans F.J., Ibañez E., *Pressurized fluid extraction of bioactive compounds from Phormidium species*. J. Agric. Food Chem., 2008. **56**: p. 3517-3523.
46. Goud M.J.P., S.D., Charya M.A.S., *Antibacterial activity and biomolecular composition of certain fresh water microalgae from River Godavari (India)*. Sci. World J. , 2007. **2(3)**: p. 19-23.
47. Ghasemi Y., Y.M.T., Shafiee A., Amini M., Shokravi S., Zarrini G., *Parsiguine, a novel antimicrobial substance from Fischerella ambigua*. Pharm. Biol. , 2004. **42**: p. 318-322.
48. Kaushik P., C.A., *In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of Spirulina platensis*. Indian J. Microbiol. , 2008. **48**: p. 348-352.
49. Plaza M., S.S., Jaime L. , *Screening for bioactive compounds from alga*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2010. **51**: p. 450-455.
50. Rodríguez-Meizoso I, J.L., Santoyo S., Señorans F., Cifuentes A., Ibáñez E. , *Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from Haematococcus pluvialis microalga*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2010. **51(2)**: p. 456-463.
51. Pratt R., D.T.C., Eiler J.B., Gunnison J.B., Kumler W.D., et al., *Chlorellin, an antibacterial substance from Chlorella*. Science Asia, 1944. **99**: p. 351- 352.
52. Mendes R.L., N.B.P., Cardoso M.T., Pereira A.P., Palabra A.F. , *Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae*. Inorganica Chimica Acta 2003. **356**: p. 328-334.
53. Cardozo K.H.M., G.T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E. , *Metabolites from algae with economical impact*. Comp. Biochem. Phys. Part C Toxicol. Pharmacol. , 2007. **146**: p. 60-78.
54. Prashantkumar P., A.S., Vidyasagar G. , *Antimicrobial activity of blue green and green algae*. I. J. Pharm. Sci. , 2006. **68(5)**: p. 647 - 648.
55. Hind E. Fadoul, N.J., *Antimicrobial Activity of Extracts from Aquatic Algae Isolated From Salt Soil and Fresh Water in Thailand*. International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB), 2014. **2(11)**: p. 149-152.
56. Muthulakshmi M., S.A., Sudha M., Selvakumar G., *Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from Spirulina isolated from fresh water body against various human pathogens*. J. Algal Biomass Util., 2012. **3(3)**: p. 7-11.
57. Ördög V., S.W.A., Lenobel R., Bancírová M., Strand M., van Standen J. , *Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites*. J. Appl. Phycol. , 2004. **16**: p. 309-314.
58. Santoyo S., R.-M.I., Cifuentes A., Jaime L., García-Blairsy Reina G., Señorans F.J., Ibañez E., *Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from Haematococcus pluvialis microalgae*. LWT-Food Sci. Technol., 2009. **42**: p. 1213-1218.
59. Yamaguchi, K., *Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites : a review*. J. Appl. Phycol. , 1997. **8**: p. 487-502.

60. Sudha S.S., K.R., Rengaramunjan J. et al., *Antimicrobial activity of Spirulina platensis and Aphanothece sp. on selected clinical bacterial isolates and its antioxidant activity*, South As. J. Journal of Biological Sciences, 2011. **1**: p. 87-98.
61. Plaza M., S.S., Jaime L., *Screening for bioactive compounds from alga*. J. Pharm. Biomed. Anal. , 2010. **51**: p. 450 - 455.
62. Hanaa H. Abd El-Baky, F.K.E.B.a.G.S.E.-B., *Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga Spirulina maxima*. Journal of Medicinal Plants Research 2008. **2**(10): p. 292-300.
63. Hikmet Katircioglu, Y.B., Belma Aslim, Zehra Yüksesdag, Tahir Atici, *Screening for Antimicrobial Agent Production of Some Freshwater*. The Internet Journal of Microbiology.
64. Danielli M.M. Dantas , R.M.P.B.C., Maria G. Carneiro-da-Cunha , A. O. Galvez , A. R. Drummond and Ranilson S. Bezerra, *Bioproduction, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Compounds from Chlorella vulgaris*. Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences, 2015.
65. Mohamed G. Battah, H.A.H.I., Manal M. El-Naggar, Fagr Kh. Abdel_Gawad and Mohamed S. Amer, *Antifungal Agent from Spirulina maxima: Extraction and Characterization*. Global Journal of Pharmacology 2014. **8**(2): p. 228-236.
66. Shasank S. Swaina, S.K.P., Rabindra N. Padhy, *Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria*. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017. **90**: p. 760 - 776.
67. Shabudeen Syed, A.A.a.I.P., *The Uses of Chlorella Vulgaris as Antimicrobial Agent and as a Diet : the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General*. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology, 2015. **7**(1): p. 185-190.
68. Li A.H., C.K., Wong C., King-Wai F., Feng C., Yue J. , *Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae*. Food Chem., 2007. **102**: p. 771-776.
69. Kannan, R.R.R., Arumugam, R., Anantharaman, P., *In vitro antioxidant activities of ethanol extract from Enhalus acoroides (L.F.) Royle.* . Asian Pac. J. Trop. Med. , 2010. **3**(11): p. 898 - 901.
70. MacMillan J.B., E.-R.M.A., De Roop J.S., Molinski T.F. , *Lobocyclamides, A-C, lipopeptides from a cryptic cyanobacterial mat containing Lyngbya confervoides*. J. Org. Chem. , 2002. **67**: p. 8210 - 8215.
71. Shanab, S.M.M., *Bioactive Allelo-chemical compounds from Oscillatoria Species (Egyptian isolates)*. Int. J. Agric. Biol. , 2007. **9**(4): p. 617-621.
72. Tan, L.T., *Bioactive natural products from marine Cyanobacteria for drug discovery*. Phytochemistry, 2007. **68**: p. 954-979.
73. Jaya P.G.M., S.D., Singara C.M.A. , *Antibacterial Activity and Biomolecular Composition of Certain Fresh Water Micro-Algae from River Godavari (India)*. Sci. World J., 2007. **2**(3): p. 19 - 23.
74. Bhagavathy S., S.P., *Protective role of β -carotene from Chlorococcum humicola against reactive oxygen species and lipid peroxidation in Benzo(a)Pyrene induced toxicity.* . J. Pharmacol. Res., 2010. **1**(2): p. 21-35.
75. Fan M., L.Z., Wang R., Xu N., *Isolation and antibacterial activity of anabaena phycocyanin.* . Afr. J. Biotechnol., 2013. **12**: p. 1869-1873.
76. Xue C.H., S.Y., Zhang H., Li Z., Cai Z., Ou Y., Lin C.H., Imbs A.B., *Molecular species composition of glycolipids from Spirulina platensis*. Food Chem. , 2002. **77**: p. 9 - 13.
77. O'Doherty J.V., D.S., Figat S., Callan J.J., Sweeney T. , *The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from Laminaria spp. on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs*. Anim. Feed Sci. Technol. , 2010. **157**: p. 173-180.

78. Abdo, S.M., Hetta, M.H., Samhan, F.A, El Din, R.A.S and Ali, G.H. , *Phytochemical and antibacterial study of five fresh water algal species*. Asian Journal of Plant Sciences, 2012. **11**(3): p. 109 - 116.
79. Shu Y., L.Y., Li L., Feng J., Lou B., Zhou X., Wu H. , *Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens*. Afr. J. Microbiol. Res., 2011. **5**: p. 5358-5361.
80. Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M. et al. , *Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry*. . Journal of Chromatography A, 2010. **1217**: p. 7956- 7965.
81. Hetta M., M.R., El-Senousy W., Ibrahim M., El-Taweel G., Ali G., *Antiviral and antimicrobial activities of Spirulina platensis*. World J. Pharm. Pharm. Sci 2014. **3**: p. 31-39.
82. Spolaore P., J.-C.C., Duran E., Isambert A. , *Commercial Applications of Microalgae*. . J. Biosci. Bioeng. , 2006. **101**(2): p. 87 - 96.
83. Kellam S.J., C.R.J.P., Owsianka A.M., Walker J.M., *Results of a large scale screening programmed to detect antifungal activity from marine and freshwater micro algae in laboratory culture*. Brit. Phycol. J. , 1988. **23**: p. 45 - 47.
84. Ramadan M.F., A.M.M.S., Ibrahim Z.K. , *Functional bioactive compounds and biological activities of Spirulina platensis lipids*. Czech J. Food Sci., 2008. **26**: p. 211 - 222.
85. Demule M.C.Z., D.G.Z., Decano M.S. , *Bioactive substances from Spirulina platensis (cyanobacteria)*. Int. J. Exp. Bot. , 1996. **58**: p. 93 - 96.
86. Lawton, L.A., Morris, L.A., Jaspars, M., *A bioactive modified peptide, aeruginosamide, isolated from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. J. Org. Chem. , 1999. **64**: p. 5329 - 5332.
87. Mowbray, S., *The antibacterial activity of chlorophyll*. Br. Med. J., 1957. **1**(5013): p. 268 - 270.
88. Smith V.J., D.A.P., Dyrzynda E.A. , *Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro algae* Mar. Drugs, 2010. **8**: p. 1213 - 1262.
89. Nevin T.A., B.B.G., *The effect of sodium copper chlorophyllin on pure cultures of oral-type organisms*. J. Dent. Res., 1954. **33**(4): p. 571 - 579.
90. Saeki Y., I.Y., Shibata M., Sato Y., Takazoe I., Okuda K. , *Antimicrobial action of green tea extract, flavono flavor and cooper chlorophyll against oral bacteria*. Bull. Tokyo Dent. Coll., 1993. **34**(1): p. 33 - 37.
91. Mahanom H., A.A.H., Dzulkifly M.H. , *Effect for different drying methods on concentrations of several phytochemicals in herbal preparation of 8 medicinal plant leaves*. Malays. J. Nutr., 1990. **5**: p. 47 - 54.
92. Bhagavathy, S., Sumathi, P., *Protective role of β -carotene from Chlorococcum humicola against reactive oxygen species and lipid peroxidation in Benzo (a) Pyrene induced toxicity*. J. Pharmacol. Res., 2010. **1**(2): p. 21 - 35.
93. Mihov S.G., G.D.I., Minkova K.M., Tchernov A.A. , *Phycobiliproteins in Rhodella reticulata and photoregulatory effects on their content*. J. Biotechnol., 1996. **48**: p. 251 - 257.
94. Glazer, A.N., *Phycobiliproteins - a family of valuable widely used fluorophores*. J. Appl. Phycol., 1994. **6**: p. 105 - 112.
95. Murugan, T., *Antibacterial activity of C-phycoyanin against clinical isolates by disc diffusion method*. J. Pharm. Res. , 2012. **5**(6): p. 3020 - 3021.
96. Sabarinathan, K.G., Ganesan, G. , *Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycoyanin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium - Westiellopsis sp.* . Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. , 2008. **12**: p. 79 - 82.
97. Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. , *Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of Psidium guajava*. J. Med. Plants Res. , 2010. **4**: p. 393-396.

98. Klejdus B., L.L., Plaza M., Snóblová M., Stěrbová D., *Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A. , 2010. **1217**(51): p. 7956-7965.
99. Ouattara L., K.J., Zongo C., Barro N., Savadogo A., Bassole I.H.N., Ouattara A.S., Traore A.S. , *Antioxidant and antibacterial activities of three species of *Lansea* from burkina faso* J. Appl. Sci., 2011. **11**: p. 157-162.
100. Gao D., Z.Y., *Comparative antibacterial activities of crude polysaccharides and flavonoids from *Zingiber officinale* and its extraction*. Asian J. Trad. Med., 2010. **5**: p. 235-238.
101. Ozdemir, G., Karabay, N.U., Dalay, M.C., Pazarbasi, B. , *Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis**. Phytother. Res., 2004. **18**: p. 754-757.
102. El-Sheekh M.M., D.S.M., Swelim M.A., Mohamed S. , *Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis**. Iranian J. Microbiol. , 2014. **6**: p. 112-119.
103. Salvador, N., Gomez-Garreta, A., Lavelli, L. and Ribera, M.A. , *Antimicrobial activity of Iberian macroalgae*. Scientia Marina, 2007. **71**: p. 101-114.
104. Cucco M.B., G.G., Malacarne Oltonelli R. , *Effects of betacarotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of Grey partridge, *Perdix perdix**. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. , 2007. **147**: p. 1038-1046.
105. Mirzoeva O. K., G.R.N., Calder P. C. , *Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria* Microbiol. Res., 1997. **152**: p. 239-246
106. Lampe M.F., B.L.M., Isaacs C.E., Patton D.L., Stamm W.E. , *Killing of *Chlamydia trachomatis* by novel antimicrobial lipids adapted from compounds in human breast milk*. Antimicrob. Agents Chemother. , 1998. **45**: p. 1239-1244.
107. Desbois A.P., M.-S.A., Smith V.J. , *A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)*. Mar. Biotechnol. , 2009. **11**: p. 45-52.
108. Bergsson G., S.O., Thormar H., *In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides*. Antimicrob. Agents Chemother. , 1999. **43**(11): p. 2790-2792.
109. Henrikson, R., *Microalga *Spirulina*, superalimento del futuro*. Ronore Enterprises. 2^a ed. Ediciones Urano, Barcelona, España, 1994: p. 222.
110. Ciferri, O., *Spirulina, the edible microorganism*. Microbiol. Rev. 47:551-578. Cordella, I. Moussa, A.C. Martel, N. Sbirrazzuoli and L. Lizzani-Cuvelier, *Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique oriented perspectives*,. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983. **50** (7): p. 1751-1764.
111. Lacaz, R., and Nascimento, E. , *Produção de biomassa de *Spirulina* máxima para alimentação humana e animal*. Rev. Microbiol., 1990. **21**: p. 85-97.
112. Ayala, F., *Guía sobre el cultivo de *Spirulina**. In: Biotecnología de Microorganismos Fotoautótrofos. Motril, Granada, España, 1998: p. 3-20.
113. Belay, A., *Mass culture of *Spirulina* outdoors - The Earthrise Farms experience*. . In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis. London, 1997: p. 131-158.
114. Shabana, K.A., Arabi, M. S., *Spirulina - An overview* International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012. **4**(3): p. 9-15.
115. Castenholz, R.W., and Waterbury, J.B. , *Oxygenic photosynthetic bacteria. Section 19*, In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G., Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3*, Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA. 1989: p. 1710-1806.
116. Stanier, R.Y., and Van Niel, Y. , *The concept of a bacterium*. . Arch. Mikrobiol. , 1962. **42**: p. 17-35.

117. Guglielmi, G., Rippka, R., and Tandeu de Marsac, N. , *Main properties that justify the different taxonomic position of Spirulina sp. and Arthrospira sp. among cyanobacteria*. In: Doumenge, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A., Eds. Spiruline algue de vie. Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco. Musée Océanographique. Numéro spécial. , 1993. **12**: p. 13-23.
118. J.W., S., *The development and diversification of Precambrian life* Origin of Life 1974. **5**: p. 119 - 135.
119. Knoll, A.H., *Cyanobacteria and earth history*. - In: Herrero A. & Flores E. (eds), *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*, p. 1-19, Caister Academic Press, Norfolk. 2008.
120. Schirrmeyer B. E., A.A.B.H.C., *The origin of multicellularity in cyanobacteria*. - BMC Evol. Biol. , 2011. **11**: p. 45.
121. Komárek J., Z.E., Šmarda J., Kopecký J., Rejmánková E., Woodhouse J., Neilan B. A. & Komárková J., *Polyphasic evaluation of Limnoraphis robusta, a water-bloom forming cyanobacterium from Lake Atitlán, Guatemala, with a description of Limnoraphis gen. nov.* - Fottea 2013. **13**: p. 39-52.
122. Shih P. M., W.D., Latifi A., Axen S. D., Fewer D. P., Talla E., Calteau A., Cai F., Tandeau de Marsac N., Rippka R., Herdman M., Sivonen K., Coursin T., Laurent T., Goodwin L., Nolan M., Davenport K. W., Han C. S., Rubin E. M., Eisen J. A., Woyke T., Gugger M. & Kerfeld C.A., *Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. **110**: p. 1053-1058.
123. M., G., *Monographie des Oscillatoriées (Nostocacées homocystées)*. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. , 1892. **7**, **15**: **263-368**, **16**: **91-264**.
124. C., B.E.F., *Revision des Nostocacées hétérocystées*. Ann. Sci. Not. Bot. 7 Ser., , 1886-1888. **3**: **323-381**, **4**: **343-373**, **5**: **51-129**, **7**: **177-262**.
125. L., G., *Cyanophyceae*. In: Pascher A. (ed.), Süswasserflora 12, p. 481, Gustav Fischer Verl., Jena., 1925.
126. P., F., *Les Nostocacées de la Normandie*. . Not. Mem. Doc. Soc. Agric. Archéol. Hist. nat. Manche, 1929. **41**: p. 197-228.
127. L., G., *Cyanophyceae*. In: Rabenhorst's Kryptogamen Flora von Deutschland, Vol. 14, p. 1196, Akad. Verlagsges., Leipzig., 1932.
128. L., G., *Schizophyta (Klasse Schizophyceae)*. . In: Engler A. & Prantl K. (eds), *Natürliche Pflanzenfamilien 1b: 1-232*, Duncker & Humblot, Berlin., 1942.
129. Elenkin, A.A., *Monografia algarum cyanophycearum aquidulcium at terrestrium in finibus URSS inventarum [Blue-green algae of the USSR]*. - Izdat. Akad. Nauk SSSR. 1936-1949.
130. K., S., *Cyanophyta - sinice, Glaucophyta - glaukofity. Vol. 2*. - In: *Flora słodkowodna Polski [Freshwater microflora of Poland]*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warsaw. 1966.
131. T.V., D., *Cyanophyta*. I.C.A.R. Monographs on Algae, New Delhi., 1959.
132. Rippka R., D.J., Waterbury J. B., Herdman M. R. & Stanier R.Y. , *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria*. J. Gen. Microbiol. , 1979. **111**: p. 1-61.
133. R.W., C., *Phylum BX. Cyanobacteria*. In: Boone D. R. & Castenholz R. W. (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, p. 473-599, Springer, New York., 2001.
134. Jiří omárek, J.K., Jan Mareš & Jeffrey R. Johansen, *Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach*. Preslia 2014. **86**: p. 295-335.
135. Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G., *The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (Spirulina Turpin) and the description of Halospirulina tapeticola gen. nov., sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2000. **50**: p. 1265-1277.

136. Charpy L., L.M.J., Alliod R., *La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique?* . Institut de Recherche pour le Développement. Marseille. Rapport d'expertise pour le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 2008: p. P. 49
137. R.D., F., *Spiruline Technique, pratique et promesse*. Edisud, Aix-en-Provence, 1999: p. P. 246
138. Jiménez C., C.B.R., Labella D., Niell F.X., *The feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in Southern Spain*. Aquaculture, 2003(217): p. 179-190.
139. Van Eykelburg, C., Fuchs, A. and Schmidt, G.H., *Anatomie Van Leewenbokek*. 1989. **45**: p. 369.
140. Balloni, W., Tomaselli, L., Giovanetti, L. and Margheri, M.C. , *Biologia fondamentale Del genere Spirulina*. In: Cantarelli, C., Ciferri, O., Florenzano, G., Kapsiotis, G., Materassi, R., Treccani, U., Eds. Progetto finalizzato "Ricerca di nuove fonti proteiche e di nuove formulazioni alimentari". Atti del Convegno: Prospettive della coltura di Spirulina in Italia. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Firenze-Academia dei Georgofili, CNR, Tipografia Coppini; pp.49-82., 1980.
141. Feng C., Y.J., *Algae and their Biotechnological Potential* Springer Science & Business Media, Hong Kong., 2013: p. P. 306
142. Ishimi, Y., Sugiyama, F., Ezaki, J., Fujioka, M., & Wu, J. , *Effects of Spirulina, a blue-green alga, on bone metabolism in ovariectomized rats and hindlimb-unloaded mice*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2006. **70**: p. 363-368.
143. Olvera-Novoa, M.A., Dominguez-Cen, L.J., OliveraCastillo, L. and Martínez-Palacios C.A., *Effect of the use of the microalgae Spirulina maxima as fish meal replacement in diets for tilapia, Oreochromis mossambicus (Peters), fry* . Aquaculture research, 1998. **29**: p. 709-715.
144. Shizhong Liang, X.L., Feng Chen & Zijian Chen, *Current microalgal health food R & D activities in China*. Hydrobiologia, 2004. **512**(1-3): p. 45-48.
145. Misbahuddin, M., Maidul Islam, A., Khandker, S., Iftaker-Al-Mahmudc, Islam, N., Anjumanara., *Efficacy of Spirulina extract plus zinc in patients of chronic arsenic poisoning: A randomized placebo-controlled study*. Clinical Toxicology, 2006. **44**(2, 1): p. 135-141.
146. Shekharam, K., Ventakaraman, L., and Salimath, P., *Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue-green algae Spirulina platensis* . Phytochem., 1987. **26**: p. 2267-2269.
147. Chopra K., B.M., *Antioxydant Profile of Spirulina : A Blue-Green Microalga in Spirulina In Gershwin & Belay (ed.) Spirulina. Human Nutrition and Health* . 2007: p. 101-118.
148. Tokusoglu O. and Unal, M.K., *Biomass nutrient profiles of three microalgae: Spirulina platensis, Chlorella vulgaris, and Isochrysis galbana*. J. Food Sci., , 2003. **68**: p. 1144-1148.
149. Belay, A., *Mass culture of Spirulina outdoors - The Earthrise Farms experience*. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology* . Taylor and Francis. London. , 1997: p. 131-158.
150. Puyfoulhoux G., R.J., Besançon P., Baroux B., Baccou JC., Caporiccio B. , *Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model*. J Agric Food Chem., 2001. **49**: p. 1625-1629.
151. Grosogeat, H., *Ma promesse anti-âge "Ralentir le vieillissement, Maigrir durablement, Combattre les maladies modernes"*. Ed Odile Jacobe, Paris, 2009: p. P. 212.
152. Falquet, J.a.H., J.P., *Spiruline, Aspects Nutritionnels*. Antenna Technologies, 2006: p. 41 p. .
153. Saleh, A.M., Singh, P.K. and Dolly Wattal, Dhar. , *Comparative β -caroten content of Spirulina strains at different days of incubation*. The Andhra Agric., 2008. **55**(1): p. 61-62.

154. Beijerinck, M., *Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen.* . Botanische Ztg, 1890. **48**: p. 729.
155. Morris H.J., C.O.V., Almarales Á., Bermúdez R.C., Alonso M.E., Borges L., et al. , *Protein hydrolysates from the alga Chlorella vulgaris 87/1 with potentialities in immunonutrition.* Biotecnol. Appl. , 2009. **26**: p. 162 - 165.
156. Justo G.Z., S.M.R., Queiroz M.L., *Effects of the green algae Chlorella vulgaris on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice.* . Immunopharmacol. Immunotoxicol. , 2001. **23**: p. 119 - 132.
157. de Souza Queiroz J., B.C.M., da Rocha M.C., Bincoletto C., Paredes-Gamero E.J., de Souza Queiroz M.L., et al. , *Chlorella vulgaris treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis.* Brain. Behav. Immun. , 2012 **29**: p. 39 - 50.
158. Safi, C., Zebib, B., erah, O., Pontalier, P.Y., Vaca-Garcia, C., *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris : A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews 2014. **35** p. 265-278.
159. Zheng H, Y.J., Gao Z, Huang H, Ji X, Dou C. , *Disruption of Chlorella vulgaris cells for the release of biodiesel producing lipids : a comparison of grinding, ultrasonication, beadmilling, enzymatic lysis, and microwaves.* . Appl. Biochem. Biotechnol., 2011. **164**: p. 1215-1224.
160. Yamamoto M., K.I., Kawano S., *Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, Parachlorella kessleri (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).* Planta., 2005. **221**: p. 766-775.
161. Yamamoto M., F.M., Hirata A., Kawano S., *Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga Chlorella vulgaris (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).* J. Plant Res. , 2004. **117**: p. 257-264.
162. Yamamoto, M., Kurihara, I., Kawano, S., *Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, Parachlorella kessleri (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).* Planta., 2005. **221**: p. 766 - 775.
163. Yvonne, N., Tomas, K., *Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of Chlorella vulgaris, C. kessleri, C. sorokiniana compared with C. luteoviridis (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).* Arch. Hydrobiol. , 2000. **100**: p. 95 - 105.
164. Hagen C., S.S., Braune W., *Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of Haematococcus pluvialis (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation.* Eur. J. Phycol., 2002. **37**: p. 217 – 226.
165. Biedlingmaier S., W.G., Schmidt A., *A correlation between detergent tolerance and cell wall structure in green algae.* Z Naturforsch, C: Biosci, 1987. **42**: p. 245 - 250.
166. Martínez F., A.C., Orús M.I., *Morphometric and stereologic analysis of Chlorella vulgaris under heterotrophic growth conditions.* Ann. Bot. , 1991. **67**: p. 239 - 245.
167. Lee, R.E., *Phycology.* 4th ed. Cambridge, England, New York Cambridge University Press, 2008.
168. Příbyl P., C.V., Zachleder V. , *Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in Chlorella vulgaris.* J. Appl. Phycol., 2013. **25**: p. 545-553.
169. Lv J.M., C.L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L., *Enhanced lipid production of Chlorella vulgaris by adjustment of cultivation conditions.* Bioresour. Technol. , 2010. **101**: p. 6797-6804.
170. Příbyl P., C.V., Zachleder V. , *Production of lipids in 10 strains of Chlorella and Parachlorella, and enhanced lipid productivity in Chlorella vulgaris.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012. **94**: p. 549-561.
171. Liu Z.Y., W.G.C., Zhou B.C. , *Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris.* . Bioresour. Technol., 2008. **99**: p. 4717-4722.
172. Chen, J.L.a.F., *Biology and Industrial Applications of Chlorella : Advances and Prospects.* Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2016. **153**: p. 1-35.

173. Safi C., C.M., Pignolet O., Silvestre F., Vaca-Garcia C., Pontalier P-Y., *Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extract ability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors*. J. Appl. Phycol., 2013. **25**: p. 523-529.
174. M.K., H., *Comparative effects of autotrophic and heterotrophic growth on some vitamins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, amino acids and protein profile of Chlorella vulgaris Beijerinck*. Afr. J. Biotechnol., 2011. **10** p. 13514-13519.
175. Bajguz, A., *Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of Chlorella vulgaris*. Plant. Physiol. Biochem., 2000. **38**: p. 209-215.
176. Hu Q., S.M., Jarvis E.,Ghirardi M.,Posewitz M.,Seibert M., et al. , *Microalgal triacylglycerols as feed stocks for biofuel production: perspectives and advances*. Plant. J., 2008. **54**: p. 621-239.
177. Mata T.M., M.A.A., Caetano N.S. , *Microalgae for biodiesel production and other applications:a review*. Renew. Sustain. Energy. Rev, 2010. **14**: p. 217-232.
178. Becker, E., *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press. , 1994: p. p.293.
179. Yeh KL, C.J., *Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga Chlorella vulgaris ESP-31*. Bioresour. Technol. , 2012. **105**: p. 120-127.
180. Stephenson A.L., D.J.S., Howe C.J., Scott S.A., Smith A.G., *Influence of nitrogen-limitation regime on the production by Chlorella vulgaris of lipids for biodiesel feedstocks*. Biofuels, 2009. **1**: p. 47-58.
181. Lordan S., R.R.P., Stanton C. , *Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases*. Mar. Drugs, 2011. **9**: p. 1056-1100.
182. H., T., *Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae)1*. J. Phycol., 1991. **27**: p. 224-232.
183. de-Bashan L.E., B.Y., Moreno M., Lebsky V.K., Bustillos J.J., *Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae Chlorella spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol. , 2002. **48**: p. 514-521.
184. Kitada K., M.S., Sasaki M., Goto M., Nakashima Y., Kumamoto S., et al. , *Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from Chlorella vulgaris*. J. Chem.Technol. Biotechnol., 2009. **84**: p. 657-661.
185. Kong W., L.N., Zhang J., Yang Q., Hua S., Song H., et al., *Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from Chlorella vulgaris residue after lipid separation using response surface methodology*. J. Food Sci. Technol., 2012: p. 1-8.
186. Cha K.H., L.H.J., Koo S.Y., Song D.G., Lee D.U., Pan C.H., *Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from Chlorella vulgaris*. J. Agric. Food Chem., 2010. **58**: p. 793-797.
187. Chacón-Lee T.L., G.-M.G.E., *Microalgae for "Healthy" foods - possibilities and challenges*. Compr. Rev. Food Sci. Saf. , 2010. **9**: p. 655-675.
188. Singh J., G.S., *Commercialization potential of microalgae for biofuels production*. Renew. Sustain. Energy Rev., 2010. **14**: p. 2596-2610.
189. Gonzalez L.E., B.Y., *Increased growth of the microalga Chlorella vulgaris when co-immobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol., 2000. **66**: p. 1527-1531.

190. Gouveia L., R.A., Batista A.P., Sousa I., Empis J. , *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005. **222**: p. 362-367.
191. Fernandez-Sevilla J.M., F.F.G., Grima E.M. , *Obtaining lutein-rich extract from microalgal biomass at preparative scale*. *Methods Mol. Biol.*, 2012. **892**: p. 307-314.
192. Cha K.H., K.S.Y., Lee D.U., *Antiproliferative effects of carotenoids extracted from Chlorella ellipsoidea and Chlorella vulgaris on human colon cancer cells*. *J. Agric. Food Chem.*, 2008. **56**: p. 10521-10526.
193. Panahi Y., P.B., Jalalian H.R., Mohammadi E., Taghipour H.R., Sahebkar A, et al. , *Investigation of the effects of Chlorella vulgaris as an adjunctive therapy for dyslipidemia: results of a randomised open-label clinical trial*. *Nutr. Diet.*, 2012. **69**: p. 13-19.
194. Maruyama I., N.T., Shigeno I., Ando Y., Hirayama K., *Application of unicellular algae Chlorella vulgaris for the mass-culture of marine rotifer Brachionus*. *Hydrobiologia*, 1997. **358**: p. 133-138.
195. Yeh K.L., C.J.S., *Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31: implications for biofuels*. *J. Biotechnol.* , 2011. **6**: p. 1358-1366.
196. Xu, J.a.G., J. I. , *Honor thy symbionts*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(18): p. 10452-10459.
197. Xu, J., Mahowald, M. A. et al. , *Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine*. *PLoS biology*, 2007. **5**(7): p. e156.
198. Ley, R.E., Turnbaugh, P. J. et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1022-1023.
199. Cani, P.D.a.D., N. M. , *The gut microbiome as therapeutic target*. *Pharmacol Ther* 2011. **130**(2): p. 202-212.
200. Eberl, G., *A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism*. *Mucosal Immunol.*, 2010. **3**(5): p. 450 - 460.
201. Li, J., H. Jia, X. Cai, H. Zhong, Q. Feng, S. Sunagawa, M. Arumugam, J. R. Kultima, E. Prifti, T. Nielsen, A. S. Juncker, C. Manichanh, B. Chen, W. Zhang, F. Levenez, J. Wang, X. Xu, L. Xiao, S. Liang, D. Zhang, Z. Zhang, W. Chen, H. Zhao, J. Y. Al-Aama, S. Edris, H. Yang, T. Hansen, H. B. Nielsen, S. Brunak, K. Kristiansen, F. Guarner, O. Pedersen, J. Doré, S. D. Ehrlich, P. Bork, and MetaHIT Consortium. , *An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome*. *Nat. Biotechnol.* , 2014. **32**(8): p. 834-841.
202. Naïmi, S., *Isolement, caractérisation et étude in vitro de l'activité anti-inflammatoire de différentes souches probiotiques*. Thèse de Doctorat - Université de Laval, Québec, Canada, 2014: p. P.112.
203. Diamant, M., Blaak, E. et al. , *Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?* *Obesity Reviews*, 2011. **12** (4): p. 272-281.
204. Thibault, R., Blachier, F. , Darcy-Vrillon, B., de Coppet, P., Bourreille, A. and Segain, J.P. , *Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency*. *Inflamm. Bowel. Dis.* , 2010. **16**(4): p. 684-695.
205. El Kaoutari, A., Armougom, F. , Gordon, J. I., Raoult, D. and Henrissat, B. , *The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota*. *Nat. Rev. Microbiol.* , 2013. **11**(7): p. 497-504.
206. Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J., *J. Clin. Gastroenterol.* Colonic health : fermentation and short chain fatty acids, 2006. **40**: p. 235-243.
207. Nakamura, N., Lin, H. C., McSweeney, C. S., Mackie, R. I. and Gaskins, H.R. , *Mechanisms of microbial hydrogen disposal in the human colon and implications for health and disease*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* , 2010. **1**: p. 363-395.

208. Van Hylckama Vlieg, J.E., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M. and Zhao, L. , *Impact of microbial transformation of food on health - from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract*. Curr. Opin. Biotechnol. , 2011. **22**(2): p. 211-219.
209. Lin, H.V., Frassetto, A., Kowalik, E. J., Nawrocki, A. R., Lu, M. M., Kosinski, J. R., Hubert, J. A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G. and Marsh, D. J. , *Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms*. PLoS One 2012. **7**(4): p. e35240.
210. Ouwehand, A., Isolauri, E. et al., *The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood*. European Journal of Nutrition, 2002. **41**(1): p. i32-i37.
211. Shu, Q.a.G., H. S. , *Immune protection mediated by the probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20™) against Escherichia coli O157: H7 infection in mice*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2002. **34**(1): p. 59-64.
212. Bäckhed, F., Ley, R. E. et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1915-1920.
213. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO reports, 2006. **7**(7): p. 688-693.
214. Danie, N., *Impact des acides gras oméga-3 sur les désordres métaboliques associés à l'obésité : rôle potentiel du microbiote intestinal* THèse de Doctorat - Université de Laval, Québec, Canada, 2015.
215. Hawrelak, J.A., and Myers, S. P. , *The causes of intestinal dysbiosis: a review*. Altern. Med. Rev. , 2004. **9**(2): p. 180-197.
216. Zhang, H.a.L., X. M., *Control of commensal microbiota by the adaptive immune system*. Gut. Microbes, 2015. **6**(2): p. 156-160.
217. WHO/FAO, *FAO/WHO Experts' Report: Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. 2001.
218. Mc Farland, L.V., *Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea*. Travel Medicine and Infectious Disease 2007. **5**(2): p. 97-105.
219. ROFES, C., *Intéret du microbiote intestinal et probiotiques* Thèse de Doctorat - Université de Toulouse III Paul Sabatier, France, 2014: p. P.79.
220. Salminen, S.J., Gueimonde, M. et al., *Probiotics that modify disease risk*. The Journal of nutrition, 2005. **135**(5): p. 1294-1298
221. Madsen, K., Cornish, A. et al., *Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 580-591.
222. Nagpal, R., Yadav, H. et al., *Potential of probiotics and prebiotics for synbiotic functional dairy foods: an overview*. International Journal of Probiotics and Prebiotics, 2007. **2**(2/3): p. 75.
223. Nagpal, R., Kumar, A. et al., *Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review*. FEMS microbiology letters, 2012. **334**(1): p. 1-15.
224. Belalia, S., *Effet protecteur de Streptococcus thermophilus et Bifidobacterium bifidum enrobées d'un anti-acide (Maalox) sur* Thèse de Magister - Univeristé d'Orna, Algérie, 2011: p. P. 173.
225. Holzapfel, W.H.a.S., U. , *Introduction to pre-and probiotics*. Food Research International, 2002. **35**(2): p. 109-116.
226. Kabeerdoss, J., Devi, R. S. et al., *Effect of yoghurt containing Bifidobacterium lactis Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers*. Nutr. J., 2011. **10**: p. 138.
227. Scardovi, V., *Genus Bifidobacterium Orla-Jensen*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2*, pp. 1418-1434. Edited by Sneath PH A, Mair N.S, Sharpe ME & Holt. Baltimore JG: Williams & Wilkins. . 1986.

228. Ait Abdeslam, A., *Etude de croissance de Bifidobacterium sp. dans le de brebis*. Thèse de Magister - Univeristé d'Orna, Algérie, 2008: p. P.132.
229. Okamoto, M., Benno, y., Leung, K.P. and Maeda, N., *Bifidobacterium tsurumiense sp. nov., from hamster dental plaque*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2008. **58**: p. 144-148.
230. Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X. and Ling, D. , *Bifidobacterium thermacidophilum sp. nov., isolated from an anaerobic digester*. Int .J. Syst. Evol. Microbiol., 2000. **50**: p. 119-125.
231. Yildirim, Z., Johnson, M.G., Winters, D.K. , *Purification and mode of action of bifidocin B produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454*. J. Appl. Microbiol. , 1999(86): p. 45-54.
232. Shah, N.P., *Bifidobacteria : Characteristics and potential for application in fermented milk products*. Milchwissenschaft 1997. **52**(1): p. 16-21.
233. Modler, H.W., *Bifidodogenic Factors-Sources, Metabolism and Applications*. Int. Dairy J., , 1994. **4**: p. 383-407.
234. Mitsuoka, T., Hidaka, H. and Eida, T., *Effect of Fructo-oligosaccharides on Intestinal Microflora*. . Die Nahrung 1987. **31**: p. 427-436.
235. Arboleya S., R.-M.P., Margolles A., Solís G., Salminen S., de Los Reyes-Gavilán C.G., Gueimonde M., *Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk*. Int. J. Food Microbiol., 2011 Sep. . **149**(1): p. 28-36.
236. Oelschlaeger, T.A., *Mechanisms of probiotic actions-a review*. International Journal of Medical Microbiology, 2010. **300**(1): p. 57-62.
237. Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J. et al. , *Probiotic mechanisms of action*. Annals of Nutrition and Metabolism, 2012. **61**(2): p. 160-174.
238. Groschwitz, K.R.a.H., S. P. , *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009. **124**(1): p. 3-20.
239. Hooper, L.V., Wong, M. H. et al. , *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. Science, 2001. **291**(5505): p. 881-884.
240. Anderson, R.C., Cookson, A. L.et al. , *Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation*. BMC microbiology, 2010. **10**(1): p. 316.
241. Ohland, C.L.a.M., W. K. , *Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2010. **298**(6): p. G807-G819.
242. Rofes, C., *Intérets du microbiote intestinal et probiotiques*. Thèse de Doctorat Université de Toulouse III Paul Sabatier, 2014: p. P. 79.
243. Heyman, M.a.H., É. , *Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique : le paradoxe*. Nutr. Clin. Métabolisme, 2006 Jun. . **20**(2): p. 85-94.
244. Laparra, J.M.a.S., Y. , *Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals*. Pharmacol. Res. , 2010. **61**(3): p. 219-225.
245. Roberfroid, M., *Prebiotics: the concept revisited*. J. Nutr., 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 830S-837S.
246. Cumming, J.H.a.K., S.C., *Probiotics, prebiotics and antibiotics in infammatory bowel disease infammatory bowel crossroads of microbes, epithelium and immune systems*. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium, 2000. **263**(99-114).
247. FAO/WHO, *Agriculture mondiale*. horizon, 2004. **2015-2030**.
248. Foxx-Orenstein, A.E., Chey, W.D. , *Manipulation of the gut microbiota as a novel treatment strategy for gastrointestinal disorders*. Am. J. Gastroenterol. , 2012. **1**: p. 41-6.
249. Vrese, J.S.a.M.d., *Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition*. Am. J. Clin. Nutr., 2001. **73**(suppl): p. 361S-364S.

250. Gibson, G.R., Probert, M.H., Loo, V. J., Rastall, A. R. and Roberfroid, B., M. , *Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics*. Nutrition Research Review, 2004. **17**(259-275).
251. Larouci, S., *Contribution à l'étude des probiotiques et prébiotiques comme alternatives aux antibiotiques en aviculture*. Thèse de Magister - Université de Chlef, Algérie, 2013: p. 130 p. .
252. Marteau, P., Seksok, P., Lepage, P., Dore, J., , *Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics*. Mini Rev Med Chem, 2004. **4**(889-896).
253. Haton, C., *effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale* Thèse de Doctorat de l'université de Paris VI, France 2005: p. P. 168.
254. Lucini, C., Maruccio, L., de Girolamo, P., Vega, J.A. and Castaldo, L., *Localisation of neurotrophin - containing cells in higher vertebrate intestine*. Anat. Embryol. (Berl), 2002. **205**(2): p. 135-140.
255. Coudeyras S. and Forestier, C., *Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine*. Can. J. Microbiol., 2010. **Vol. 56**(N° 8): p. 611-650.
256. Telemo, E., Korotkova, M. and Hanson, L.A., *Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa and lymphocyte homing*. Ann. Allergy Asthma Immunol. , 2003. **90**(6 Suppl. 3): p. 28-33.
257. O., R.F.M.a.G., *Probiotiques et pathologies digestives de l'enfant*. Cah. Nutr. Diet., 2007. **Vol. 42**: p. 45-50.
258. Grangette, C., *Probiotiques et régulation de la réponse immune allergique et inflammatoire*. Cah. Nutr. Diet., 2007. **Vol. 42**: p. 76-85.
259. Mocanu, G., et al., *Influence of Spirulina platensis biomass over some starter culture of lactic bacteria*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2013. **19**(4): p. 474-479.
260. Varga, L., N. Ásványi-Molnár, and J.F. Szigeti, *Manufacturing technology for a Spirulina-enriched mesophilic fermented milk*. 2012.
261. Bhowmik, D., J. Dubey, and S. Mehra, *Probiotic efficiency of Spirulina platensis-stimulating growth of lactic acid bacteria*. World Journal of Dairy & Food Sciences, 2009. **4**(2): p. 160-163.
262. Benahmed Djilali, A., *Analyse des aptitudes technologiques de poudres de dattes (Phoenix-dactylifera.l) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes*. Thèse de Doctorat - Université de Boumerdès 2012: p. 188 p. .
263. Wheal MS, F.T., Palmer LT. , *A cost-effective acid digestion method using closed polypropylene tubes for inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis of plant essential elements*. . Anal.Meth., 2011. **3**: p. 2854-2863.
264. Atwater, W.e.R., E., *A new respiratory calorimeter and the conservation of energy in human body*. Il-physical 1899. **9**: p. 214-251.
265. Wafa, M., *Synthèse d'un nouveau ciment belétique fortement réactif à partir de mélange de déchets industriels et étude de ses propriétés hydriques* THèse de Doctorat - Université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, 2016: p. P. 237.
266. Luque de Castro M.D., G.-A.L.E., *Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future*. Analytica Chimica Acta, 1998. **369**: p. 1-10.
267. HADJ SALEM, J., *Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria Retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique* THèse de Doctorat - Institut national polytechnique de Lorraine, 2009: p. P. 270.
268. Spooner, F.D.S., G. , *Laboratory assessment of antibacterial activity*. In : Methods in Microbiology (edited by J.R. Norris & D.W. Ribbons). London: Academic Press. , 1972. **7B**: p. 211-276.

269. standard), N.N.c.f.c.l., *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement M 100-S9*, . 1999: p. 1-112.
270. Saini, R.K., Choudhary, A.S., Joshi, Y.C. et al. , *Solvent Free Synthesis of Chalcones and their Antimicrobial Activities*. E. Journal of Chemistry, 2005. **2**(4): p. 224-227.
271. B., H., *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd Edition. Chapman & Hall Pub. London, UK. , 1998: p. P. 286
272. Singleton, V.L.J., A.R. , *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture, 1965. **16**: p. 144-158.
273. Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S. et al. , *Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia*. Acta Pharmaceutica, 2004. **54**: p. 65-71.
274. Bidie Alain dit Phillipe, G.B.B.N., Yapo Adou F., N'Guessan Jean David N. & Djaman Allico Joseph *Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée Ivoirienne*. Sciences & nature 2011. **Vol. 8**(N° 1): p. 1-11.
275. José L. Parada, G.Z.d.C., *, María C. Zaccaro de Mule', Mo'nica M. Storni and b.d. Cano, *Lactic acid bacteria growth promoters from Spirulina platensis*. International Journal of Food Microbiology, 1998. **45**: p. 225-228.
276. Lichtenthaler, H.K., *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrane*. Methods Enzymology, 1987. **147**: p. 350 - 382.
277. Penchev, P.I., *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions*. Thèse de Doctorat - Université de Toulouse, 2010: p. 239 p. .
278. Garcia, J.L., Garcia, E., Arraras, A., Garcia, P., Ronda, C. and Lopez, R. , *Cloning, purification and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin*. J. Virol. , 1987. **61**: p. 2573 - 2580.
279. Terzaghi, B.E., Sandine, W.E., *Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages*. Applied Microbiology, 1975: p. 807-813.
280. Beerens, H., *An elective and selective isolation medium for Bifidobacterium sp.* . Letters in Applied Microbiology, 1990. **11**: p. 155-157.
281. Frank, J.F., Holcomb, J.E., McGregor, J.U., *Viability of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in soft-serve frozen yogurt*. Cult. Dairy Prod. J. , 1991: p. 26:44.
282. Mahmoudi, F., Hadadji, M., Guessas, B., Kihal, M., *Evaluation of in vitro antagonism and protection against enteropathogenic experimental challenge of different strains of Bifidobacterium*. African Journal of Microbiology Research, 2013. **7**(29): p. 3816-3823.
283. Schillinger, U., Friedrich-Karl, L., *Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat*. Applied and Environmental Microbiology, 1989: p. 1901-1906.
284. Larpent, J.P.e.l., G.M., *Mémento technique de microbiologie* 2ème Ed. Technique et documentaire lavoisier, Paris, 1990: p. 417 p.
285. De Roissard, H.e.L., F.M. , *Bactéries lactiques*. 2ème volumes, Loriga Uriage, 1994: p. 600 p. .
286. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. et Reuter, G., *Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*. Int. J. Food Microbiol. , 1998. **41**: p. 103-125.
287. Avril, D.e.D., M. , *Biopréservation by lactic acid bacteria*. Antonie leeuwenhoek. J., 1992. **70**: p. 331-345.
288. Guessas, B., Hadadji, M., Saidi, N. et Kihal, M., *Inhibition of Staphylococcus aureus growth by lactic acid bacteria in milk*. Dirasat, Agricultural Sci., 2006. **32**(3): p. 304-312.
289. Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L., Ji, G.E. , *Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria*. Int. J. Food Microbiol., 1999. **47**: p. 25-32.

290. Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B.B., *Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian type fermented sausages*. International Journal of Food Microbiology, 2005. **105**: p. 419-431.
291. Accolas, J.P., Bloquel, R., Didienne, R., Régnier, J. , *Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt*. 1977. **57**: p. 1-23.
292. De Souza Oliveira, R.P., Perego, P., Converti, A., De Oliveira, M. N., *Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with Streptococcus thermophilus*. J. Food Eng., 2009. **91**: p. 133-139.
293. Phillips, I., Andrews, J.M., Bridson, E., Cooke, E.M., Spencer, R.C., Holt, H.A., Wise, R., Bint, A.J., Brown, D.F.J., Greenwood, D., King, A., Williams, R.J.A. , *Guide to Sensitivity Testing*. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, 1991.
294. Zhou, J., Dong, Y., Zhao, X., Lee, S., Amin, A., Ramaswamy, S., Domagala, J., Musser, J.M., Drlica, K. , *Selection of Antibiotic-Resistant Bacterial Mutants: Allelic Diversity among Fluoroquinolone-Resistant Mutations*. Journal of Infectious Diseases, 2000. **182**: p. 517-525.
295. Treagan, L., Pulliam, L. , *Medical microbiology laboratory procedures*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1982: p. 233-243.
296. Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. , *Bacteriocins of Gram-negative bacteria*. Bacteriological Review, 1976. **40**(3): p. 722-756.
297. Aslam, S., Hamill, R.J., Musher, D.M. , *Treatment of Clostridium difficile-associated disease: Old therapies and new strategies*. Lancet Infect Dis. , 2005. **5**: p. 549-557.
298. Bernard, J.e.R., A., *Les Entérobactéries, systématiques et méthodes de diagnostic*. Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier, Paris, 2003: p. 349 p.
299. Achemchem, F.e.A., J. , *Production de Bactériocines par des bactéries lactiques isolées à partir du jben de chèvre du nord du Maroc*. Tétouan, Maroc, 2005: p. 170-182.
300. Metlef, S., *Effet antagoniste de Lactococcus lactis, souches extrémophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente*. Thèse de Magister - Université de Chlef, Algérie 2008: p. 161 p. .
301. Ariane, K.S.M., Flaviano, S. Martins, Danielle, A. Gomes, Samir, D. A. Elian, Angélica, T. Vieira, Mauro M. Teixeira, Denise, C. Cara, Regina, M. D. Nardi, Jacques, R. Nicoli, *Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of Bifidobacterium animalis var...* Arch. Microbiol., 2010. **192**: p. 995-1003.
302. Gidenne, T., *La maîtrise sanitaire dans un élevage de lapin en 2010* Session de formation ASFC - 1er Juin 2010, 2010.
303. Gerencsér ZS., S.Z., Matics, ZS., Radnai, I., Kovács, M., Nagy, I., Cullere, M., Dal Bosco, A., Dalle Zotte, A., *Effect of dietary supplementation of spirulina (Arthrospira platensis) and thyme (Thymus vulgaris) on apparent digestibility and productive performance of growing rabbits*. World Rabbit Sci., 2014. **22**: p. 1-9.
304. Perez, J.M., Lebas, F., Gidenne, T., Maertens, L., Xiccato, G., Parigi-Bini, R., Dalle Zotte, A., Cossu, M.E., Carazzolo, A., Villamide, M.J., Carabaño, R., Fraga, M.J., Ramo, M.A., Cervera, C., Blas, E., Fernandez, J., Falcao, E., Cunha, L. et Bengala Freire, J., *European reference method for in vivo determination of diet digestibility in rabbits*. World Rabbit Science, 1995. **3**: p. 41-43.
305. Bennegadi N., G., T. et Licois, D., *Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit*. Animal Research, 2001. **50**: p. 401-413.

306. Becker, E.W., *Micro-algae as a source of protein*. . Biotechnol. Adv. , 2007. **25**: p. 207-210.
307. Jagiello, M., Minta, E., Chojnacka, K. et Kafarski, P., *Mode of biosorption of chromium (III) by Spirulina species cells from aqueous solutions*. Water Environment Research, 2006. **78**(7): p. 740-743.
308. Chen, H.a.P., S., *Bioremediation potential of Spirulina: toxicity and biosorption studies of lead* Journal Zhejiang Univ. SCI., 2005. **3**: p. 171-174. .
309. Puyfoulhoux G., R.J.M., Besançon P., Baroux B., Baccou J.C., Caporiccio B., *Iron availability from iron-fortified Spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model*. . J. Agric. Food Chem., 2001. **49**: p. 1625-1629.
310. Rangsayatorn, N., Pokethitiyook, P., Upatham, ES., Lanza, GR., *Cadmium biosorption by cells of Spirulina platensis TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel*. Environ. Int., 2004. **30**(1): p. 57-63.
311. Solisio, C., Lodi, A., Torre, P., Converti, A., Del Borghi, M., *Copper removal by dry and rehydrated biomasse of Spirulina platenis*. 2006.
312. USDA, *Dietary reference intakes and recommended dietary allowances*. . Nat Acad of Siences, USA. , 2002.
313. Jubie, S.a.D., S.P., *Gas Chromatography- Mass Spectrometry Analysis and Antibacterial Activity of Fatty acid Mixture of Spirulina platensis*. Journal of Pharmaceutical Science & Research 2012. **4** ((6),): p. 1836 - 1838.
314. Kaushik, R.K.B.a.P., *Biofuel Production from Microalgae for Energy Applications*. J. Algal Biomass Utln., 2014. **5**(4): p. 50-54.
315. Monika Prakash Rai, S.N., Rupali Sharma, , *Response of growth and fatty acid compositions of Chlorella pyrenoidosa under mixotrophic cultivation with acetate and glycerol for bioenergy application*. Biomass and Bioenergy. , 2013. **58**;: p. 251-257
316. Lívia Seno Ferreira, Mayla Santos Rodrigues, João Carlos Monteiro de Carvalho, and E.F. Alessandra Lodi, Patrizia Perego, Attilio Converti, *Adsorption of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ onto dry biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis and Chlorella vulgaris. I. Single metal systems*. Chemical Engineering Journal 2011. **173**: p. 326- 333.
317. Peng, W., Wu, Q., Tu, P., and Zhao. N., *Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis*. . Bioresour. Technol. , 2001. **80**: p. 1-7.
318. Bhola, V., Ramesh, D., Sheena Kumari, S., Karthikeyan, S., Elumalai, S., and Bux. F. , *Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of Chlorella vulgaris*. . J. Biosci. Bioeng., 2011. **111**: p. 377-382.
319. Anand, V., Sunjeev, V., Vinu, R. , *Catalytic Fast Pyrolysis of Arthrospira platensis (Spirulina) Algae Using Zeolites*. J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2016.
320. Klejdus B., K.J., Benesřová L., Vacek J., *Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species*. Journal of Chromatography A, , 2009. **1216**: p. 763-771.
321. Shalaby EA, S.S., *Antiradical and antioxidant activities of different Spirulina platensis extracts against DPPH and ABTS radical assays*. . J. Mar. Biol. Oceanogr. , 2013. **2**: p. 1-8.
322. Singh DP, P.R., Meena KK, Sharma L, Sharma AK. , *Induced accumulation of polyphenolics and flavonoids in cyanobacteria under salt stress protects organisms through enhanced antioxidant activity*. . Am. J. Plant. Sci. , 2014. **5**: p. 726-735.
323. Miao X., W.Q., Yang C., *Fast purolysis of microalgae to produce renewable fuels*. . Journal of analytical and applied pyrolysis 2004. **71**: p. 855-863.

324. Ali, H.E.A., Shanab Sanaa, M.M., Abo-State Mervat, A.M. et al. , *Screening of Microalgae for Antioxidant activities, Carotenoids and Phenolic Contents*. Applied Mechanics and Materials, 2014. **625**: p. 156-159.
325. Haji mahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N., *Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae*. J. Appl. Phycol. , 2010. **22**: p. 43-50.
326. Manivannan K., A.P.B.T., *Evaluation of antioxidant properties of marine microalga Chlorella marina (Butcher, 1952)*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012: p. S342-S346.
327. Omulokoli E., K.B.C.S., *Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants*. J. Ethnopharmacol., 1997. **56**(2): p. 133-137.
328. M.M., C., *Plant products as antimicrobial agents* Clinical Microbiology Reviews, 1999. **12**: p. 564-582.
329. Usharani G., S.G., Sivasakthi S. et al. , *Antimicrobial Activity of Spirulina platensis Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi*. Advances in Biological Research 2015. **9** (5): p. 292-298.
330. Vinay K., B.A.K.S.J.N., *Antibacterial activity of crude extracts of Spirulina platensis and its structural elucidation of bioactive compound*. . Journal of Medicinal Plants Research, 2011. **5**(32): p. 7043-7048.
331. Kaushik P., G.A., Chauhan G. et al., *Antibacterial Potential and UV-HPLC Analysis of Laboratory Grown Culture of Anabaena variabilis*. International Journal of Food Safety, 2009. **11**: p. 11-18.
332. Parisi A.S., Y.S., Reinehr C.O. et al. , *Assessment of the antibacterial activity of microalgae Spirulina platensis* Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicada, Araraquara, 2009. **30**(3): p. 97-301.
333. Asthana, D., Kimura, J.I., Shinjo, R., Katukase, M. and Pophare, A.M. , *Geochemical and Sr-Pb-Nd-Hf isotopic study of Neoarchean "Setouchi-type" high-magnesium andesite suite from Central India*. Geochim. Cosmochim. . Acta, 2006. **70**((18), Supplement 1,): p. pp. A24-A24, (16th Annual V.M. Goldschmidt Conference 31st August 2006, Melbourne, Australia). .
334. Ozdemir, G., Karabay, N., Dolay, M. et al. , *Determining the antimicrobial activity capacity of various extracts of Spirulina platensis produced in Turkey's condition*. . Journal of Fish Aquatical Sciences 1st algal technological Symposium, 2004. **18**(1): p. 161-166.
335. Entesar, A., *Antimicrobial Activity of Microalgal Extracts Isolated From Baharia Oasis, Egypt*. Global Advanced Research. Journal of Microbiology, 2016. **5**(3): p. 23-32.
336. H., R.M.A.A.M.T., *Antibacterial and Antifungal Activity of Cyanobacteria and Green Microalgae. Evaluation of Medium Components by Placket-Burman Design for Antimicrobial Activity of Spirulina platensis*. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 2008. **3**(1): p. 22-31.
337. Kellam, S.J.W., J.M., *Results of a large scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture*. British Phycological Journal, 1989. **23**: p. 45-47.
338. Yu, H., Jia, S. & Dai, Y. , *Growth characteristics of the cyanobacterium Nostoc flagelliforme in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation*. Journal of Applied Phycology, 2009. **21**(1): p. 127-133.
339. Lee, S.H., Chang, K.S., Su, M.S. et al. , *Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi*. Food Control, 2007. **18**: p. 1547-1554.
340. Mishra, P.M.S., A., *Antibacterial Activity and GC/MS Analysis of the Extract of Leaves of Finlaysonia obovata (A Mangrove Plant)*. Asian Journal of Plant Sciences, 2007. **6**: p. 168-172.
341. A.-H. Liu, H.G., M. Ye, Y.-H. Lin, J.-H. Sun, M. Xu, D.-A. Guo, , J. Chromatogr. A 2007. **1161** p. 170.

342. Goiris, K.M., K.; Voorspoels, S.; de Paepe, D.J.E.; Baart, G.; de Cooman, L. , *Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages*. J. Phycol. , 2014. **50**: p. 483-492.
343. Safafar H. , W.V., Møller P. and Jacobsen C. , *Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater*. Marine Drugs, 2015. **13**: p. 7339-7356.
344. Finocchio E., L.A., Solisio C., Converti A., *Chromium (VI) removal by methylated biomass of Spirulina platensis* Chem. Eng. J., 2010. **156** p. 264-269.
345. Vieira R.S., O.M.L.M., Guibal E. ,Rodríguez-Castellón E., Beppu M.M. , *Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: an XPS investigation of mechanism*. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 2011. **374**: p. 108-114.
346. Livia Seno Ferreira, M.S.R., João Carlos Monteiro de Carvalho, Alessandra Lodi, Elisabetta Finocchio, Patrizia Perego, Attilio Converti, *Adsorption of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ onto dry biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis and Chlorella vulgaris. I. Single metal systems*. Chemical Engineering Journal, 2011. **173** p. 326– 333.
347. Desmazeaud, M.J.e.D.R., H. , *Metabolisme général des bactéries lactiques. Bactéries lactiques, aspect fondamentaux et technologiques*. Loriga-Uriage. , 1994. **1**: p. 196-207.
348. Guiraud, J.P., *Microbiologie Alimentaire*. Dunod, Paris, France, 2003: p. 652 p. .
349. Larpent, J.P., *Microbiologie alimentaire*. Tec & doc, Lavoisier. Paris, 1997: p. 10-72.
350. FAO/WHO, *FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Geneva, Swiztherland: World Health Organization, 2002.
351. Naylin, N., Taing, O., Hashinaga, F., Toshima, Y. , *Antioxidant activity of sugar-tolerant yeast Zygosaccharomyces rouxii*. Food Biotechnol., 2005. **19**: p. 107-120.
352. Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S. et al., *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : Correlation with in vivo findings*. Am. J. Clin. Nutr. , 2001. **73**: p. 386S-392S.
353. Kim, W.S., Ren, J., Dunn, N.W. , *Differentiation of Lactococcus lactis subspecies lactis and subspecies cremoris strains by their adaptive response to stresses*. FEMS Microbiol Lett. , 1999. **171**(1): p. 57-65.
354. Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. , *Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts*. Food Microbiol. , 2000. **17**: p. 205-215.
355. Al-Saleh, A.A., Metwalli, A.A.M., Abu-Tarboush, H.M. , *Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and bifidobacteria*. J. Saudi. Soc. for Food and Nutrition 2006. **1**: p. 1-17.
356. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J. , *Overview of gut flora and probiotics*. Int. J. Food Microbiol., 1998. **41**: p. 85-101.
357. Gilliland, S.E., Staley, T.E., Bush, L.J., *Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct*. J. Dairy Sci., 1984. **67**: p. 3045-3051.
358. Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S. , *Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract*. Dig. Dis. Sci. , 1992. **37**: p. 121-128.
359. Pyoung Il Kim, M.Y.J., Young-Hyo Chang, Saehun Kim, Seong-Jae Kim, Yong-Ha Park. , *Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007. **74**: p. 1103-1111.
360. Li-Shui, C., Ying, M.A., MAUBOIS, Jean-Louis, Sheng-Hua, H.E., CHEN, Li-Jun, LI, Hai-Mei *Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol*. Dairy Sci. Technol., 2010. **90**:: p. 537-548.

361. Kim, K., Kim, K.H., Storey, M.K., Voelker, D.R., Carman, G.M., *Isolation and Characterization of the Saccharomyces cerevisiae EKI1 Gene Encoding Ethanolamine Kinase*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(21): p. 14857-14866.
362. Herreros, M.A., Fresno, J.M., Gonzalez-Prieto, M.J., Tornadizo, M.E. , *Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese)*. International Dairy Journal, 2003. **13**: p. 469-479.
363. EFSA, E.C., *Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance*. The E.F.S.A. Journal 2005. **223**: p. 1-12.
364. Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucet-Populaire, F. , *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2005. **55**: p. 38-44.
365. Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. , *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **81**: p. 1-10.
366. Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucet-Populaire, F. , *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **55**: p. 38-44.
367. Lim, K.S., Huh, C.S., Baek, Y.J., *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria*. Journal of Dairy Science, 1993. **76**: p. 2168-2174.
368. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. , *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Bifidobacterium isolates from human and gastrointestinal tract*. Letters in Applied Microbiology, 1998. **26**: p. 333-337.
369. Delgado, S., O'sullivan, E., Fitzgerald, G., Mayo, B. , *Subtractive screening for probiotic properties of Lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics*. Journal of Food Science, 2007. **72**: p. M310-M315.
370. Danielsen, M., Wind, A. , *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **82**: p. 1-11.
371. Lin, M.Y., Harlander, S., Savaiano, D. , *Construction of an integrative food-grade cloning vector for Lactobacillus acidophilus*. Appl. Microbiol Biotechnol., 1996. **45**: p. 484-489.
372. Ahn, D.U., Wolfe, F.H., Sim, J.S., Kim, D.H. , *Packaging cooked turkey meat patties while hot reduces lipid oxidation*. Journal of Food Science, 1992. **57**: p. 1075-1077.
373. Cataloluk, O., Gogebakan, B. , *Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey*. FEMSMicrobiol Lett, 2004. **236**: p. 7-12.
374. Huys, G., D'Haene, K., Swings, J. , *Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic Lactobacillus plantarum strain CCUG 43738*. Antimicrob. Agents Chemother. , 2006. **50**: p. 1550-1551.
375. Florez, A.B., Delgado, S. and Mayo, B. , *Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment*. Can. J. Microbiol. , 2005. **51**: p. 51-58.
376. Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. , *Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods*. Trends Food Sci. Tech. , 2004. **15**: p. 348-359.
377. Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. , *Antibiotic resistance spread in food*. Nature, 1997. **389**: p. 801-802.
378. Chopra, I., Roberts, M. , *Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001. **65**: p. 232-260.
379. Marounek, M., Rada, V. , *Susceptibility of poultry Lactobacilli to ionophore antibiotics*. J. Vet. Med. , 1995. **42**: p. 193-196.

380. Finegold, S.M., Harada, N.E., Miller, L.G. , *Antibiotic susceptibility patterns as aids in classification and characterization of gram-negative anaerobic bacilli*. Journal of Bacteriology 1967. **94**: p. 1443-1450.
381. Ammor, M.S., Florez, A.B., van Hoek, A.H., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Aarts, H.J., Margolles, A., Mayo, B. , *Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2008. **14**: p. 6-15.
382. Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F. , *Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999. **76**: p. 115-137.
383. Tabak, S., Bensoltane, Ahmed, *L'activité antagoniste des bactéries lactiques (Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum et Lactobacillus bulgaricus) vis-à-vis de la souche Helicobacter pylori responsable des maladies gastroduodénales*. Nature & Technology, 2012(6): p. 71.
384. Juven, B.J., Schved, F., Lindner, P. , *Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of Lactobacillus acidophilus*. Journal of Food Protection, 1992. **55**: p. 157-161.
385. Jin, L.Z., Ho, W.Y., Abdullah, M.A., Ali, M.A., Jalaludin, S. , *Antagonistic effects of intestinal lactobacillus isolates on pathogens of chicken*. Lett. Appl. Microbiol., 1996. **23**: p. 67-71.
386. Khedkar, J.N., Dave, J.M., Sannabhadti, S.S. , *Antibacterial activity associated with Bifidobacterium adolescentis*. Journal Food Science Technology, 1998. **35**: p. 527-529.
387. Tissier, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 1900: p. 297 p.
388. Kheadr, E.E., Bernoussi, N., Lacroix, C., Fliss, I. , *Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins*. International Dairy J., 2004. **14**: p. 1041-1053.
389. Yildirim, Z., Johnson, M.G., Winters, D.K. , *Purification and mode of action of bifidocin B produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454*. J. Appl. Microbiol. , 1999. **86**:: p. 45-54.
390. Varga, L., J. Szigeti, and V. O" rdo" g., *Effect of a Spirulina platensis biomass and that of its active components on single strains of dairy starter cultures*. Milchwissenschaft, 1999. **54**: p. 187–190.
391. Varga, L.S., J.; Kovács, R.; Földes, T.; Buti, S., *Influence of a Spirulina platensis Biomass on the Microflora of Fermented ABT Milks During Storage (R1)*. J. Dairy Sci., 2002. **85**: p. 1031–1038.
392. Guldás, M., *Influence of Spirulina platensis powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk*. Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, , 2010. **Vol.60** (No.4 Prosinac): p. 237-243.
393. Kheadr, E.S., *Viability of Bifidobacterium longum Grown Alone or in Association with Some Strains of Lactic Acid Bacteria Under Refrigeration*. Alex. J. Fd. Sci. & Technol., 2007. **4**(1): p. 45-62.
394. Kheadr, E.E., *Impact of aflatoxin M1 on the viability and some physiological activities of bifidobacteria*. Alex. J. Agric. Res., 2001. **46**: p. 83-105.
395. Mabrouk Ragab EL-Sabagh, M.A.A.E., D. H. Mahboub & Mohamed Abdel-Daim, *Effects of Spirulina platensis lgae on growth performance, antioxidative status and blood metabolites in fattening lambs*. Journal of Agricultural Science, 2014. **Vol. 6**(No. 3): p. 92-98.
396. Halama, D., *Single cell protein*. In : *Nonconventional Feedstuffs in the Nutrition of Farm Animals* (Ed. K. Boda). . Elsevier Science Publishing Company, Inc. 655 Avenue of Americas, New York, N.Y. , 1990. **10010** p. 34-49.
397. Han, J.G., Kang, G.G., Kim, J. K. and Kim, S. H. , *The present status and future of Chlorella*. Food Sci. Ind., 2002. **6**: p. 64-69.
398. Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S. R., & Poppi, D. P., *Effect of the concentration of Spirulina (Spirulina platensis) algae in the drinking water on water*

- intake by cattle and the proportion of algae bypassing the rumen. Anim. Prod. Sci., 2010. 50: p. 405-409.*
399. Kulpys, J., Paulauskas, E., Pilipavicius, V., & Stankevicius, R., *Influence of cyanobacteria Arthrospira (Spirulina platensis) biomass additive towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. Agron. Res., 2009. 7: p. 823-835.*
400. DalleZotte, A., Sartori, A., Bohatir, P., Rémignon, H., Ricci, R., *Effect of dietary supplementation of Spirulina (Arthrospira platensis) and Thyme (Thymus vulgaris) on growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits. 2013. Livestock Science(152): p. 182-191.*
401. Yan, L., Lim, S. U. and Kim, I. H. , *Effect of Fermented Chlorella Supplementation on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Blood Characteristics, Fecal Microbial and Fecal Noxious Gas Content in Growing Pigs. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 2012. Vol. 25(No. 12): p. 1742-1747.*
402. Zheng, L., Oh, S.T., Jeon, J.Y., Moon, B.H., Kwon, H.S., Lim, S.U., An, B. K. and Kang, C. W., *The Dietary Effects of Fermented Chlorella vulgaris (CBT) on Production Performance, Liver Lipids and Intestinal Microflora in Laying Hens. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 2012. Vol. 25(No. 2): p. 261 - 266.*
403. Yan, L., Meng, Q. W. and Kim, I. H. , *Effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristic and fecal microbial shedding in weaning pigs. . Livest. Sci. , 2012. 145: p. 189-195.*
404. Nagy, B.a.F., P.Z. , *Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals. . Vet. Res. , 1999. 30: p. 259-284.*
405. VAN ZYL, A., RAMBAU, R.V. & VAN DER MERWE, M., *Aspects of the anatomy and histology of the alimentary canal of the greater cane rat, Thryonomys swinderianus, with reference to its feeding physiology. African Zoology, 2005. 40: p. 25-36.*
406. YU, B., CHIOU, W.S., KUO, C.Y., *Comparison of digestive function among rabbits, guinea-pigs, rats and hamsters. II. Digestive enzymes and hindgastrointestinal tracts (GIT) fermentation. Asian - Australasian Journal of Animal Sciences 2000. 13: p. 1508-1513.*
407. Bagóné Vántus, V., Kovács, M., Zsolnai, A., *The rabbit caecal microbiota: development, composition and its role in the prevention of digestive diseases – a review on recent literature in the light of molecular genetic methods. Acta Agraria Kaposváriensis, 2014. 18(1): p. 55-65.*
408. Desmazeaud, M., *Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Alimentation et santé. Cahiers agricultures INRA volume 5.cedex, France, 1996: p. 331-342.*
409. Gill, H.S., *Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestinal tract. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, 2003. 17: p. 755-773.*
410. Balakrishnan, M.e.F., M.H., *Prebiotics, probiotics and digestive health. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. 15(6): p. 580-585.*
411. Zeng, B., Shushu Han, Ping Wang, Bin Wen, Wensu Jian, Wei Guo, Zhiju Yu, Dan Du, Xiangchao Fu, Fanli Kong, Mingyao Yang, Xiaohui Si, Jiangchao Zhao & Ying Li, *The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits. Scientific reports, 2015. 5: p. 1-8.*
412. Žymantiene, J., Vaidas Oberauskas, Jone Kantautaitė et al., *The effect of Chlorella vulgaris IFR-111 on the organism of New Zealand white rabbits. Veterinarija ir Zootechnika, 2010. 50(72): p. 94-101.*
413. Janczyk, P., Halle, B. and Souffrant, B. , *Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with Chlorella vulgaris. Poult. Sci., 2009. 88: p. 2324-2332.*
414. Jamil, A.B.M.R., Akanda, R., Rahman, M., Hossain, A. & Islam, S., *Prebiotic competence of Spirulina on the production performance of broiler chickens. J. Adv. Vet. Anim. Res. , 2015. 2(304-309).*

415. Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Christaki, E., Florou-Paneri, P. & Nikolakakis, I., , *Spirulina as a functional ingredient in broiler chicken diets*. S. Afr. J. Anim. Sci. , 2016. **46**: p. 94-102.
416. Gružasuskas, R., Lekavicius, R., Raceviciut-Stupelien, R., Šašyt, V.T., Švirmickas, G.J. , *Višiuk broileriu virškinimo procesu optimizavimas simbiotiniais preparatais*. Veterinarija ir Zootechnika, 2004. **28**: p. 51-56.
417. Mariey, Y.A., Samak, H.R., Ibrahim, M.A. , *Effect of using Spirulina platensis algae as a feed additive for poultry diets: 1- productive and reproductive performances of local laying hens*. Egyptian Poultry Science Journal, 2012. **32**: p. 201-215.
418. Amrouche, T., *Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse in vitro et étude in vivo des mécanismes moléculaires impliqués*. Thèse de Doctorat, Université de Laval, 2005: p. 175 p.
419. Vitini, E., Alvarez, S., et al., *Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria*. Biocell, 2000. **24**(3): p. 223-232.
420. Mastrandrea, F., Coradduzza, G., Serio, G., Minardi, A., Ardito, S., Muratore, L., *Probiotics reduce the CD34+ hemopoietic precursor cell increased traffic in allergic subjects*. Allergy and Immunology, (Paris), , 2004. **36**: p. 118-122.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE

1/ **HAMOUDA ALI I.**, DOUMANDJI A. Characterization and screening of the potential probiotic Lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* strains isolated of different biotopes, Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism 2018 (2015) 1– DOI:10.3233/MNM-17191

IOS Press

2/ **HAMOUDA ALI I.**, DOUMANDJI A. Comparative phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activities of *Spirulina platensis* and *Chlorella pyrenoidosa*: potential application of bioactive components as an alternative to infectious diseases, *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie*, 2018 n° 39, 41-49.

Participation à des journées scientifiques internationales et nationales

1/ **HAMOUDA ALI I.**, DOUMANDJI A., « Influence *in vitro* of Spirulina on the growth of bifidobacteria », 4th International on Industrial Biotechnology, Tlemcen, Algérie, 2013.

2/ **HAMOUDA ALI I.**, DOUMANDJI A., « Etude de la spiruline comme aliment fonctionnel nourrissant la microflore intestinale », 3^{ème} Congrès International sur les molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées au Stress oxydant, Hammamet, Tunisie, 2014.

3/ **HAMOUDA ALI I.**, « Etude *in vitro* de l'effet probiotique d'une micro-algue *Arthrospira* », Journées Scientifiques et Pédagogiques, USTHB, Alger, Algérie, 2014

4/ **HAMOUDA ALI I.**, DOUMANDJI A., « Valorisation de la masse algale d'une *Arthrospira Spirulina platensis*: Une source importante de composants nutritionnels », 6^{ème} Journées Scientifiques Internationale sur la valorisation des bioressources, Monastir, Tunisie, 2015.

5/ **HAMOUDA ALI I.**, “Study of antimicrobial propriety of *Arthrospira Spirulina platensis* extracts. The potentiel application as a therapeutic supplement in health”, 1st international Congress of Nutrition & Food Science, Tlemcen, Algeria, 2015.

6/ **HAMOUDA ALI I.**, AHMED ABDOULAYE W., « Usage des deux microalgues *Spirulina platensis* et *Chlorella pyrenoidosa* comme agent antimicrobien : Application des composants bioactifs comme alternative aux maladies infectieuses », 10th Maghrebien Congress on Marine Science and the 5th Franco-Maghrebien Congress of Zoology & Ichthyology, Fes, Morocco, 2016.

7/ **HAMOUDA ALI I.**, GUEMOR D., ABDALI M., AHMED ABDOULAYE W., « Evaluation de l’effet des microalgues comme traitement alternative aux antibiotiques : provocation expérimentale d’une infection par *Escherichia coli* ATCC 25922 chez des lapins », 3^{ème} Congrès Internationale Ci-SAN 2017, Constantine, Algérie.