

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB - BLIDA
FACULTÉ DES SCIENCES AGRO-VÉTÉRINAIRES
DÉPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**

MÉMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE
L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER ACADÉMIQUE
EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
Spécialité : Sciences Alimentaires

**Effet d'une supplémentation de la spiruline dans
l'alimentation animale sur la physiologie du cobaye (souris
Balb/c)**

**M. BOUZAR Ahmed Chiheb
M. GHARZOULI Salah Chorfi**

Devant le jury composé de:

M ^{me} BOUTEKRABT L.	Maître de conférences A	USDB	Co-Promotrice et Président de jury
M ^{me} DOUMANDJI A.	Maître de conférences A	USDB	Promotrice
M. KADRI B.	Maître de conférences B	USDB	Examineur
M. AMALOU D.	Chargé de cours A	USDB	Examineur
M. ZADI.M	Directeur du laboratoire de l'ITELV		Invité

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2010 - 2011

Remerciements

Louange a Dieu, le tout puissant qui sans lui rien de tout cela n'aurait été possible.

Nos plus sincères remerciements s'adressent en premier lieu à notre promotrice Mme DOUMANDJI.A. Pour sa patience son dévouement sa disponibilité et son attention constante durant la réalisation de ce travail. Elle a su nous initier à un travail de recherche scientifique pratique et théorique.

À notre président de thèse: M^{me} L. BOUTEKRABT

Qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Nos vifs remerciements et nos respectueux hommages à notre jury de thèse:

M^{me} L. BOUTEKRABT qui nous fait l'honneur et le plaisir de faire parti à notre jury de thèse. Sincères remerciements.

M.D. AMALOU et B. KADRI qui nous font l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Sincères remerciements.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire de l'ITELV de Baba Ali, pour leur accueil ainsi que leur précieuse aide, particulièrement à Mr ZADI.M pour sa patience, son aide, sa disponibilité durant toute la période de réalisation de ce travail sans oublier M^{mes} BOUKHEDOUNI.N, ISSAD.N, BOUCHEFFA.A, SADI.S, KALAFATE.H et BOUZERD.S qui nous ont beaucoup aider a la réalisation de ce travail.

Nous désirons également remercier Mr le directeur du laboratoire d'hygiène de BLIDA et Mr TEFAHI.D responsable au laboratoire d'hygiène pour leur accueil et leurs aides.

Tous nos remerciements s'adressent également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, veuillez trouver l'expression de notre sympathique et de notre profonde reconnaissance.

Moi, BOUZAR Ahmed Chiheb j'exprime mes très sincères remerciements à la femme de ma vie ma chère mère ainsi que mon père, les deux prunelles de mes yeux ainsi que mes deux frères Islem et Yakoub pour leurs aides et leurs sacrifices à mon égard ; ainsi que toute ma famille que je ne citerais pas un à un mais qui sauront se reconnaître...

Je remercie aussi mon binôme Mr GHARZOULI S. Qui s'est montrée très coopérative.

Dédicaces

Avec un grand plaisir moi BOUZAR Ahmed Chiheb je dédie ce travail qui a été réalisé avec beaucoup d'implication:

À mes parents que j'aime beaucoup.

À ma sœur Noura Ahlem envers laquelle j'ai un amour particulier.

À toute ma famille et à la respectueuse famille ALWACH.

À mes frères Islem et Yaakoub.

À mes amis Billel et Rabie et à tous mes amis.

À toute ma promotion et tous ceux qui me connaissent.

Moi Mr GHARZOULI Salah Chorfi, je dédie ce modeste travail à:

À la mémoire de mon honorable et brave père ;

À ma très chère "MA" ;

À mon aimable épouse ;

Et à toute ma famille

Pour leur amour, leur attachement, leur présence et leur soutien dans cette vie.

Qu'ils trouvent dans ce modeste travail le témoignage de ma profonde reconnaissance et l'amour que j'ai pour eux.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I. Digestion du monogastrique	
I. Progression d'un repas dans le tube digestif de l'homme.....	3
I.1.1. La mastication et la déglutition	3
I.1.2. Les mouvements de l'estomac et de l'intestin grêle.....	3
I.1.3. Les mouvements du gros intestin.....	3
I.2. Les phénomènes chimiques.....	4
I.3. L'absorption.....	4
II – Flore intestinale	6
II-1 Diversité du microbiote intestinal	6
II-2 Installation du microbiote intestinal.....	7
II-3. Distribution des bactéries dans le tube gastro-intestinal humain.....	8
II-4 Diversité des fonctions du microbiote.....	10
II-5 Microbiote intestinal et système immunitaire.....	11
II-6 Influence de l'alimentation sur la flore intestinale.....	13
II-7 Les micro-organismes en transit, ingérés (volontairement) par voie orale.....	13
III-implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique.....	14
III-1. Implication de la flore dans la modification du stockage énergétique et la favorisation de l'adiposité	14
IV – généralité sur les cobayes (souris).....	16
IV –1. Environnement	16
IV –1.1. La température.....	16
IV –1.1. Intervalle recommandé.....	16
IV –1.2. Les dangers.....	16
IV –1.2. L'humidité.....	16
IV –1.2.1. Valeur recommandée.....	16
IV –1.2.2. Risques sanitaires liés à une humidité trop élevée ou faible	16
IV –1.3. La qualité de l'air : le taux d'ammoniac et la ventilation.....	17
IV –1.3.1. Le taux d'ammoniac.....	17
IV –1.3.1.2. Origine de l'ammoniac et mesures préventives	17
IV –1.4. L'éclairage.....	17
IV –1.4.1. La photopériode	17
IV –1.4.2. Le spectre lumineux	18
IV –1.5. La densité animale	18
IV –1.5.1. La dominance chez les souris	18
IV –1.6. L'ambiance et le bruit.....	18
IV –1.6.1. L'ambiance.....	18
IV –1.6.2. Le bruit.....	18
IV –1.6.2.1. Intensité sonore.....	18
IV –1.6.2.2. Intensité sonore en pratique	19
IV –2. L'alimentation	19
IV –2.1. Comportement alimentaire et conséquences pratiques.....	19
IV –2.2. Généralités et rappels sur la physiologie digestive.....	20
IV –2.3. La flore de la souris.....	20
IV –2.4. Souris adultes à l'entretien, en gestation, en lactation et souriceaux sevrés en croissance.....	20
IV –2.4.1. Recommandations.....	20
IV –2.4.1.1. Besoin énergétique selon le statut physiologique des rats et des souris.....	21
IV –2.4.1.2. Densité énergétique de la ration.....	21
Chapitre II. Généralités sur la spiruline	
I. Définition.....	23

II –Caractéristiques structurales.....	23
III-Croissance et reproduction de la spiruline.....	24
IV –Aspects et intérêts nutritionnels de la spiruline.....	25
IV –1. Analyse nutritionnelle qualitative et quantitative.....	25
IV – .1.1.Protéines.....	25
IV –1.2. Lipides.....	26
IV –1.2.1. Lipides totaux.....	26
IV –1.2.2. Acides gras.....	26
IV – 1.2.3.Fraction insaponifiable.....	26
IV – 1.3.Glucides.....	26
IV – 1.4.Acides nucléiques.....	26
IV – 1.5.Vitamines.....	27
IV – 1.6.Pigments et enzymes.....	28
IV – 1.7.Minéraux et oligoéléments.....	29
V_ Effets secondaires et de surdosage lié à la consommation de la spiruline.....	29
VI_ La spiruline dans la pharmacopée.....	30
PARITE 2 : EXPERIMENTATION ET RESULTATS	
Problématique de recherche et objectifs.....	31
Chapitre I : matériels et méthodes	
I- Matériels et Méthodes.....	32
I- 1 Cobayes et aliments.....	32
I- 1.1. Cobayes.....	32
I- 1.2. Condition d'élevage.....	32
I- 1.3. Régimes.....	32
I- 1.4. Suivi des animaux.....	32
I- 2. Choix du lot	32
I- 3. Échantillonnages.....	35
I- 3.1. Présentation des analyses.....	35
I- 3.2. Analyses physico-chimiques.....	36
I- 3.3. Analyses microbiologiques.....	36
I-3.4. Méthodes d'analyses.....	36
I- 3.4.1.1. Analyses physico-chimiques des échantillons.....	36
I- 3.4.1.2. Détermination de la matière sèche.....	36
I-3. 4.1.3. Détermination des cendres.....	37
I-3. 4.1.4. Détermination des protéines brute.....	38
I- 3.4.1.5. Détermination de la cellulose brute.....	40
I- 3.4.1.6. Détermination de la matière grasse.....	41
I- 3.4.2. Analyses microbiologiques.....	42
I- 3.4.2.1. Préparation des dilutions décimales.....	42
I- 3.4.2.2. Recherche et démembrement de la flore microbienne.....	42
I- 3.4.2.3. Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale.....	43
I- 3. 2.2.2. Recherche et dénombrement de coliformes totaux.....	43
I- 3.4.2.4.Recherche et dénombrement des coliformes fécaux.....	44
I- 3. 2.2.4. Recherche et dénombrement de staphylocoques dore.....	44
I- 3.4.2.5. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	46
I- 3.4.2.6. Recherche des Salmonelles	48
I- 3.4.2.7. Recherche des Streptocoques fécaux.....	50
I- 3.4.2.8. Recherche et dénombrement des levures et moisissure.....	52
II- Contrôle de la pureté de la souche de spiruline.....	54
II-1. Présentation des analyses.....	54
II-2. Méthodes d'analyses.....	54
II-2.1. Coloration de Gram.....	54

II-2.2. Teste catalase.....	54
III- Analyse de la flore intestinale.....	55
IV - Détermination du Taux de glycémie après l'introduction de la spiruline dans l'alimentation des souris.....	56
V- Détermination de la formule numéraire sanguine	56
VI- Dissection des souris.....	57
VII- analyse statistiques.....	57
VII-1. Le principe de l'analyse de la variance.....	57
VII-2. Le plan expérimental.....	57
Chapitre II: Résultats et discussion	
I- Résultats.....	58
I- 1. Contrôle de la qualité physicochimique de l'aliment des souris.....	58
I- 2. Contrôle de la qualité bactériologique de la spiruline de provenance de France.....	58
II- Confirmation de l'identification de la souche de spiruline et de bifidobactéries.....	60
II- 1. La coloration de Gram.....	60
II- 2. Le test catalase.....	60
III- Evolution du poids des souris après prise d'une ration alimentaire standard seule ou enrichie avec la spiruline.....	60
III- 1. Effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur le gain de poids.....	60
III- 2. Effet de la spiruline sur l'évolution du poids.....	62
III- 3. Effet de la spiruline dans la prévention des déséquilibres alimentaires.....	64
III- 4. Effet de la spiruline dans la correction des déséquilibres alimentaires.....	65
IV – Influence de la spiruline dans la modification du rapport <i>Bifidobacterium/Escherichia coli</i> intestinal.....	66
V - Détermination du Taux de glycémie après l'introduction de la spiruline dans l'alimentation des souris.....	67
VI - Détermination du taux des globules rouges et des plaquettes sanguines.....	69
VII- Dissection des souris.....	70
VIII – Analyses statistiques.....	74
Conclusion générale et perspectives	77
Références bibliographiques	78
Annexes	91

Liste d'abréviation

ADN: Acide Désoxyribo Nucleique.
AGCC : acides gras à chaîne courte
ARDA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis.
ARN : Acide Ribonucléique
°C: Degré Celsius
dB : Décibel
FIAF : fasting-induced adipose factor
g : Gramme.
HGB: Hemoglobin
HCT : Hematocrit.
IgA: Immunoglobuline A (type d'anticorps)
Kg : Kilogramme.
LPL : Lipoprotéine lipase
mL: Millilitre
mg : Milligramme.
µm : Micromètre.
pH: Potentiel d'Hydrogène
PLT: Plaquettes sanguines.
ppm : Partie pour mill.
RBC : Red blood cells.
UFC: Unité Formant des Colonies
WBC: white blood cells

Listes des figures

Figure 1: Muqueuse intestinale et cellules épithéliales	5
Figure 2: Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores	9
Figure 3: Le système immunitaire associé à l'intestin.....	12
Figure 4: Rôle de la flore intestinale dans le développement des maladies métaboliques associées à l'obésité	15
Figure 5: <i>Spirulina platensis</i> observée au microscope	24
Figure 6: Filaments des deux espèces de spiruline observés au microscope optique	24
Figure 7: Photographie d'un dessiccateur (photographie originale).....	37
Figure 8: Photographie d'un four à moufle (photographie originale)	38
Figure 9: Photographie d'un distillateur d'azote (photographie originale).....	39
Figure 10: Photographie d'un Fibertech (photographie originale).....	40
Figure 11: Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figure 12: Recherche et dénombrement des <i>Clostridium sulfito-reducteurs</i>	47
Figure 13: Recherche des Salmonelles.....	49
Figure 14: Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux.....	51
Figure 15: Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	53
Figure 16: Photographie du prélèvement bactérien rectal (photographie originale).....	55
Figure 17: Photographie du lecteur de glycémie	56
Figure 18: Photographie d'un hématimètre (photographie originale).....	56
Figure 19 : Photographie de la spiruline (photographie originale).....	58
Figure 20: Photographie d'une spirale de spiruline après coloration de Gram (photographie originale).....	60
Figure 20: Photographie d'une colonie de <i>Bifidobacterium</i> après coloration de Gram (photographie originale).....	60
Figure 22: Effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur le gain de poids.....	61
Figure 23: Effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur l'alimentation des souris.....	61
Figure 24: Effet de la spiruline dans diminution de la prise de poids.....	62
Figure 25: Effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur l'alimentation des souris.....	63
Figure 26: Influence de la spiruline dans la prévention des déséquilibres alimentaires.....	64
Figure 27: Effet de la spiruline dans la correction des déséquilibres alimentaires.....	65
Figure 28: Influence de la spiruline dans la modification du rapport <i>Bifidobacterium/Echerichia coli</i> intestinale.....	66
Figure 29: Influence de la spiruline sur la glycémie chez les souris.....	68
Figure 30: Influence de la spiruline sur le taux des globules rouges chez les souris.....	69
Figure 31: Influence de la spiruline sur le taux des plaquettes sanguines chez les souris...70	
Figure 32: Photographie de la dissection des souris et la mises en évidence de leurs reins (photographie originale).....	71
Figure 33: Photographie de la dissection des souris et la mise en évidence de leurs reins, fois et pancréas (photographie originale).....	71

Liste des tableaux

Tableau 1: Calcul du Besoin Énergétique (BE) des souris et des rats selon leurs statuts physiologiques	21
Tableau 2: Recommandations alimentaires chez la souris avec une densité Énergétique comprise entre 3800 et 4100 kcal EM/ kg d'aliment et une humidité d'environ 10%.....	22
Tableau 3: Teneur en vitamines en µg/g de matière sèche de spiruline d'après (Falquet et Hurni, 2006) complété par d'autres références pour la vitamine E.....	28
Tableau 4: Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche.....	29
Tableau 5 : Résultats des analyses de la qualité physicochimique de l'aliment des souris	58
Tableau 6: Résultats des analyses bactériologiques effectuées sur la souche de spiruline.....	59
Tableau 7 : Résultats des Analyses statistiques du facteur dose de spiruline sur les différents paramètres physiologiques	75

Résumé

L'étude effectuée dans le cadre de ce projet porte sur la contribution de la mise en exergue de certaines influences de la spiruline introduite sous différentes concentrations dans la ration alimentaire des souris Balb/c. La spiruline a un impact sur plusieurs facteurs. Concernant le gain de poids des souris, celles qui ont ingéré une concentration de 40 mg de spiruline/L d'eau ont accusé une perte de poids de 4.53% alors que notre groupe témoin a eu un gain de poids équivalent à 17.64% pour une période de 26 jours. La spiruline influence le taux de glycémie sanguin en l'abaissant comparativement à notre lot témoin, présentant un taux de 162 cg/cL le groupe expérimental nourri avec une concentration de 12g de spiruline / L d'eau a vu sa glycémie baissé à 157.5 cg/cL. En ce qui concerne la flore intestinale, surtout le lactobacille et le bifidus (le maintien d'une population saine de ses bactéries dans l'intestin réduit les problèmes provoqués par des éléments pathogènes comme *E. coli* et *Candida albicans*), une concentration de 80 mg de spiruline/L d'eau a favorisé une augmentation du rapport *E.coli/ Bifidobacterium*. qui est de 93.88/6.11(%) en comparaison au témoin qui avait un rapport de 92.95/7.46 (%) alors qu'une forte dose de cette algue (200mg/L) accentué par un mauvais état sanitaire (maigreur) favorise le développement des coliformes au détriment des bifidobactéries

Les souris nourries avec la spiruline avec des concentrations de 40 mg de spiruline/L d'eau augmentent le taux de plaquettes et des globules rouges qui sont respectivement de $400 \times 10^9/L$ et $11,19 \times 10^{12}/L$ alors que celle du témoin qui est de l'ordre de $360 \times 10^9/L$ et $9,37 \times 10^{12}/L$. Ainsi par cette étude nous avons démontré qu'une mauvaise posologie de cette algue pouvait engendrer une perte de poids pathologique affectant l'état sanitaire des souris, elle nous a aussi permis de démontrer qu'une dose de 40 mg de spiruline/L d'eau influençait le régime alimentaire des souris et qu'un éventuel changement peut se traduire par la diminution d'environ 2,5 % de concentré par jour et une diminution d'environ 1.2% de pain pour une augmentation de 2.38 % du poids pour une période donnée, alors que pour environ la même proportion de concentré et de pain supplémentaire consommé par le groupe témoin nous avons une augmentation du poids de seulement 1,47 %.

Un excès de spiruline ingéré par les souris pourrait être néfaste provoquant une hyperactivité de plusieurs fonctions pour ne citer qu'un exemple : la fonction rénale qui purifie le sang des excès en protéines et en acides urique et ceci est dû à la forte concentration de la spiruline en protéines.

Mots clés: Spiruline, *Bifidobacterium*, *E.coli*, Glycémie, globule rouge, plaquettes sanguines, posologie, gain de poids.

Abstract

The study conducted under this project focuses on the contribution of the highlighting of certain influences Spirulina introduced in different concentrations in the diet of mice Balb / c. influencing nutrition behavior of these mice, and that by acting on several factors. For weight, experimental mice that had ingested a concentration of 40 mg of spirulina / L of water, had a weight loss of 4.53% in comparison with the control group had a weight gain equivalent to 17 , 64% for a period of 26 days. It influences the rate of blood glucose lowering in our control group compared with a rate of 162 cg / cL while the experimental group fed with a concentration of 12 g of spirulina / L of water had his blood sugar down to 157 , 5 cg / cL. Spirulina nourishes the intestinal flora, especially Lactobacillus and Bifidus involved in keeping people healthy and reduce intestinal problems caused by pathogens such as E. coli and Candida albicans, a concentration of 80 mg of spirulina / L of water to favor an increased ratio of *E.coli/Bifidobacterium*. which is 93.88 / 6.11 (%) compared to a witness who had a ratio of 92.95 / 7,46 (%), whereas a high dose of this alga (200 mg / L) increased by an poor health status (wasting) promotes the development of bifidobacteria at the expense of coliform In mice fed Spirulina at concentrations of 40 mg of spirulina / L of water the platelet and red blood cells that are growing by 4. 10¹¹ / L and 11.19. 10¹² / L, while those in control are the order of 360×10⁹/ L and 9,37× 10¹²/ L. Thus this study we demonstrated that a bad dose of the algae could lead to eventual weight loss disease affecting the health of mice. It also allowed us to demonstrate that a dose of 40 mg of spirulina / L of water influences the diets of mice and that any change can result in a decrease of approximately 2.5% of concentrate per day and a decrease of approximately 1.2% of bread to an increase of 2.38% weight for a given period, while for about the same proportion of concentrate and additional bread consumed by the control group increased weight is only 1.47%.

An excess of Spirulina ingested by mice may be harmful causing hyperactivity of several functions to cite one example: kidney function which cleans the blood of excess protein and uric acid caused by the high concentration of spirulina protein .

Key words: *Spirulina*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, glucose, red blood cell, platelet, dosage, weight gain.

ملخص

الدراسة التي أجريت في إطار هذا المشروع عبارة عن مساهمة تسليط الضوء على بعض من التأثيرات سبيرولينا التي أدخلت في تركيبات مختلفة في النظام الغذائي لفئران Balb / C على السلوك الغذائي لهذه الفئران، وذلك من خلال العمل على عدة عوامل. على زيادة الوزن للفئران بعد ابتلاعها تركيز معادل ل 40 ملغ من سبيرولينا / لتر من الماء مما أدى إلى تشجيع فقدان الوزن من 4،53 ٪ لمجموعتنا التجريبية مقابل زيادة الوزن إلى 17،64 ٪ لمجموعتنا الشاهدة وذلك لمدة 26 يوما. كما إنها تؤثر على معدل السكر في الدم وذلك بخفضه مقارنة لمجموعتنا الشاهدة والتي تعادل 162سغ/سل في حين أن المجموعة التجريبية التي تتغذى على تركيز 12غ من سبيرولينا / لتر من الماء إنخفض لنسبة السكر في الدم له إلى 157،5 سغ/سل . تغذية البكتيريا المعوية وخاصة اکتوباکیللوس و بیفیدوبکتیریا (للحفاظ على صحة السكان من البكتيريا في الأمعاء ويقلل من المشاكل التي تسببها الجراثيم مثل القولونية) ، بحيث تركيز 80 ملغ من سبيرولينا / لتر من الماء لصالح نسبة زيادة القولونية/ بیفیدوبکتیریا إلى 6.11/93.88 ٪ مقارنة مع الشاهد الذي كان نسبته 7.46/92.95 (٪) ، في حين ان جرعة عالية من هذه الطحالب (200 ملغم / لتر) مع سوء الحالة الصحية (الهزال) أدى إلى تنمية القولونيات على حساب بیفیدوبکتیریا. الفئران التي غذيت بتركيزات 40 ملغ من سبيرولينا / لتر من الماء رأت زيادة في الصفائح الدموية وخلايا الدم الحمراء التي هي على التوالي $10^9 \times 400$ لتر / و $10^{12} \times 11,19$ / لتر مقارنة مع الشاهد الذي بلغت نسبه $10^9 \times 360$ / لتر و $10^{12} \times 9,37$ / ل . و كذلك قمنا بالبرهان على أن جرعة مفرطة من الطحالب يمكن أن يؤدي في نهاية المطاف إلى فقدان الوزن بصفة تؤثر على صحة الفئران ، وسمحت لنا أيضا أن تثبت أن جرعة من 40 ملغ من سبيرولينا / لتر من الماء لها تأثير على النظام الغذائي لدى الفئران وأن هذا التغيير يمكن أن يؤدي إلى انخفاض ما يقرب من 2،5 ٪ من المركز الغذائي يوميا وإنخفاض حوالي 1،2 ٪ من الخبز إلى زيادة الوزن 2،38 ٪ ل فترة معينة ، بينما لنحو نفس النسبة من المركز الغذائي والخبز إضافية المستهلكة من قبل لمجموعتنا الشاهدة لدينا زيادة الوزن 1،47 ٪ فقط . إستهلاك فائض من سبيرولينا من قبل الفئران تكون ضارة تسبب فرط نشاط عدة وظائف نذكر مثال على ذلك : وظائف الكلى الذي ينظف الدم من البروتين الزائد وحمض اليوريك يسبب نسبة عالية من البروتين سبيرولينا.

الكلمات الجوهرية سبيرولينا ، الشفاء، القولونية، بیفیدوبکتیریا ، الجلوكوز ، خلايا الدم الحمراء، الصفائح الدموية، كمية الطحالب ، وزيادة الوزن :

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La spiruline (Cyanobactérie *Athrospira platensis*) est une algue bleue-verte microscopique, planctonique unicellulaire, vivant en eau douce, d'aspect spiralée de 0,3 à 1 mm de long, cultivée originellement dans les lacs du Tchad (chez les Kanembous) et dans la vallée de Texcoc au Mexique (chez les Aztèques). Elle a besoin pour croître naturellement d'une eau saumâtre et alcaline et de déjections animales, ainsi que d'un climat chaud. Elle peut être cultivée en apportant les sels minéraux et les nutriments nécessaires.

De manière générale, cette algue est considérée comme riche en protéines (60 à 70 % de son poids avec neuf acides aminés essentiels), en acides gras essentiels (c-linoléique), en minéraux (fer, calcium, potassium, phosphore, manganèse, cuivre, zinc, magnésium...), en oligoéléments, en vitamines (A, B1, B2, B6, B12, E et K) et contient de la chlorophylle, des fibres et un pigment bleu (la phycocyanine). Elle est consommée fraîche ou sèche et peut être présentée en poudre ou en granulés. Les doses préconisées vont de 5 g à 10 g/j, mais une consommation de 100 g chez l'adulte a été proposée.

En raison de sa culture facile, elle est utilisée dans le domaine animal comme complément protéique. En médecine humaine, elle a été proposée comme additif alimentaire ou comme nutriment à part entière dans les pays à problèmes nutritionnels. De manière plus générale, en matière nutritionnelle tant dans les pays riches que dans les pays pauvres, cette algue fait l'objet d'un véritable « culte », dans de nombreuses publications Internet (2600 sites à ce jour à partir du mot clé « spiruline ») avec des résultats réputés spectaculaires dans la malnutrition infantile, sans arguments scientifiques (Von Der Weid, 2002; Dupire, 1998). Elle a même été testée sur 52 sujets VIH-positifs, comparant un groupe de patients ayant une supplémentation en spiruline et un groupe ayant une supplémentation avec du soja (Azabji, 2010). Cette étude montre une efficacité comparable pour la spiruline avec le soja en terme de prise de poids, mais également un regain significatif des marqueurs d'immunité dans le groupe traité avec la spiruline, mais non dans le groupe sous soja, aussi des travaux récents indiquent qu'une supplémentation en spiruline de quelques semaines permet d'améliorer l'état de santé de patients âgés souffrant d'anémie et d'immunosénescence (Selmi, 2011).

En Algérie, on est au stade de la production artisanale et expérimentale. L'unique Algérien qui connaît parfaitement le processus de production de cette espèce d'algue est Monsieur Hiri Abdelkader. Il a réussi à la faire déplacer de son environnement naturel (El Guelta) vers un bassin d'une superficie légèrement au-dessus de 20 m² et produit 20 kg de spiruline sèche par an. C'est dans la région de Tamarrasset que cela se passe. Quatre mois après l'ensemencement du bassin, on peut déjà récolter la spiruline. Le kilogramme de spiruline est vendu sur le marché mondial à 560 euros. Les principales fermes de production de spiruline se trouvent aux USA (Californie et Haïti), en Thaïlande et en Chine. Selon les conclusions des dernières recherches du mois de mai 2005, il s'avère qu'un kilogramme de spiruline équivaut à une tonne de légumes et de fruits (M'hamed, 2008).

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence le rôle de la spiruline comme complément alimentaire en dévoilant son impact sur la physiologie de la souris Balb/c, ainsi que de démontrer que la spiruline reste un aliment (complément alimentaire) dont la dose journalière admissible doit être défini selon

les besoin de l'individu et non utiliser comme aliment miracle qui se consomme selon a volonté.

La première étape de cette présente étude consiste à l'identification de la souche de spiruline provenant de France.

La seconde étape consiste à introduire l'algue dans l'alimentation des souris pendant 21 jours et mettre en exergue son impact sur la physiologie des souris et son influence sur :

- la glycémie des souris.
- le gain de poids.
- la correction des déséquilibres alimentaires.
- Le taux globulaire sanguin.
- La flore intestinale.
- Ainsi que de démontrer l'impact d'une mauvaise posologie de la spiruline sur l'évolution du poids des sujets.

PARTIE I:
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1:

**DIGESTION DU
MONOGASTRIQUE**

I. Progression d'un repas dans le tube digestif de l'homme

La digestion est une suite de phénomènes mécaniques et chimiques qui s'accomplissent parallèlement tout le long du tube digestif. Elle a pour but de dégrader les aliments afin de les rendre assimilables par les cellules. Le trajet du contenu intestinal est relativement lent (de 30 à 120 heures de la bouche à l'orifice anale). La bouche et l'estomac assurent un brassage des aliments et leur homogénéisation avec les enzymes secrétées. À la sortie de l'estomac, les aliments sont transformés en une bouillie que l'on nomme le chyme. Sa progression résulte de l'action des muscles intestinaux qui s'exercent sur une bouillie qui conserve une certaine consistance (la consistance est due aux fibres végétales non digérées) (Meynier, 2003).

I.1.1. La mastication et la déglutition

Les aliments broyés par les dents (mastication) et imprégnés de salive (insalivation) forment le bol alimentaire qui glisse vers le pharynx.

Le franchissement du pharynx (ou déglutition) permet au bol alimentaire d'arriver au niveau de l'estomac. La déglutition oriente les aliments dans l'œsophage évitant toute interférence avec le système respiratoire (dont la trachée s'ouvre également sur le pharynx).

Les aliments sont propulsés vers l'estomac par des ondes (péristaltismes) (Rofidal, 2006).

I.1.2. Les mouvements de l'estomac et de l'intestin grêle

Il y a d'abord une période de remplissage avec fermeture du pylore. Après la fin du repas commencent les mouvements péristaltiques de brassage (malaxage du bol alimentaire) qui favorisent l'action des sucs gastriques après imbibition. Ensuite le pylore se relâche périodiquement et refoule le chyme dans l'intestin (duodénum).

Dans l'intestin grêle, le chyme subit l'action du suc pancréatique, de la bile et du suc intestinal.

Des mouvements de brassage favorisent les phénomènes chimiques tandis que les mouvements péristaltiques assurent la progression de l'ensemble vers le gros intestin (Meynier, 2003).

I.1.3. Les mouvements du gros intestin

Il n'y a pas de sécrétion de suc digestif dans le gros intestin car les résidus qui y parviennent contiennent peu de nutriments. La bouillie qui résulte de la digestion dans l'intestin grêle transite dans le colon ascendant et subit une déshydratation.

L'ensemble déshydraté, sous la poussée d'ondes péristaltiques, passe dans le colon descendant où il s'accumule.

Il s'ensuit une progression lente du chyme jusqu'au rectum. Ceux sont des mouvements péristaltiques qui tendent à déclencher le réflexe parasympathique de défécation (Rofidal, 2006).

I.2. Les phénomènes chimiques

Les sucs gastriques renferment, entre autre, de l'eau et des sels minéraux, du mucus et des enzymes. Les enzymes sont des biocatalyseurs qui transforment les aliments en substances plus simples (nutriments) susceptibles de passer dans le sang. Le mucus est un lubrifiant qui facilite la progression des aliments et assure la protection mécanique et chimique des muqueuses.

La salive referme une amylase.

Le suc gastrique renferme de l'acide chlorhydrique et libère deux enzymes : la Présure et la pepsine.

Le suc pancréatique contient une amylacée, une lipase, deux protéinases, une Peptidase et une grande quantité de produits basiques neutralisant l'acide chlorhydrique.

La bile ne contient pas d'enzymes mais des substances organiques qui facilitent L'émulsion des graisses.

Le suc intestinal contient des enzymes dont des peptidases et des disaccharidases.

La muqueuse du gros intestin n'élabore aucun enzyme mais cet organe renferme une flore bactérienne très riche (Meynier, 2003).

I.3. L'absorption

L'absorption digestive est le passage des aliments dégradés du tube digestif.

C'est au niveau de l'intestin grêle que s'effectue l'absorption des substances assimilables (par les replis de la muqueuse appelés villosités et micro villosités).

La surface d'échange y est très grande.

Les capillaires des villosités, lymphatiques et sanguins, sont séparés du chyme par un mince épithélium.

Les glucides et les protéines passent dans le sang.

Les lipides (molécules d'acides gras appelées triglycérides) pénètrent directement dans les cellules épithéliales puis sont déversées dans les chylifères (circulation lymphatique) avant de revenir dans le sang veineux des veines sous-clavières.

95% de l'eau est réabsorbée dans l'intestin grêle.

Le gros intestin n'a pas un grand rôle digestif il intervient cependant dans la résorption de l'eau et du sodium, le transit du contenu et le stockage temporaire des fèces entre les défécations.

Il est le siège de l'activité bactérienne qui intervient dans l'hydrolyse des graisses alimentaires non digérées, la dégradation des sucres non absorbés, des fibres alimentaires, des protéines, de l'urée.

Après toutes ces modifications, les résidus non utilisables sont expulsés par le phénomène de la défécation (Meynier, 2003).

Une villosité de la muqueuse de l'intestin grêle est mise en évidence dans la figure 1.

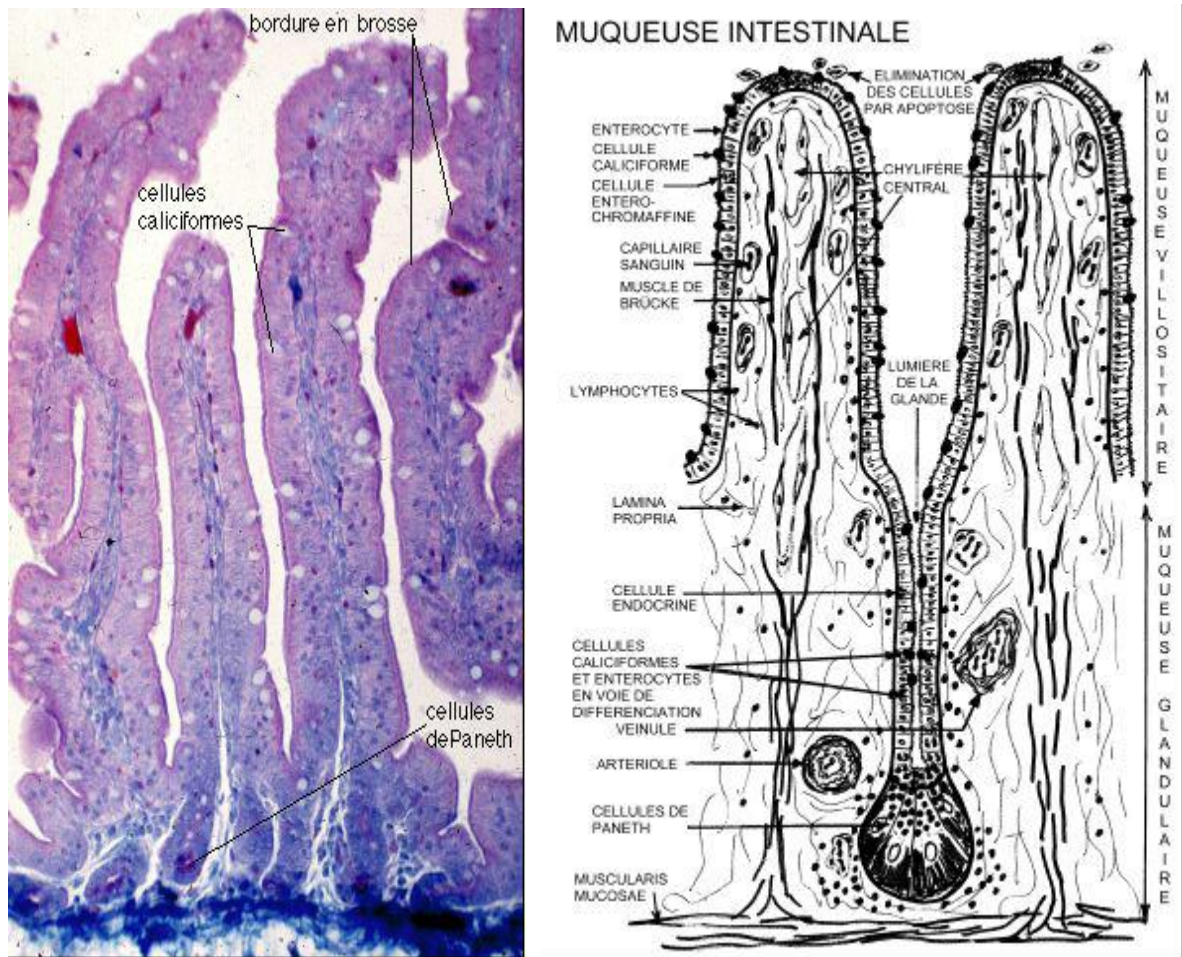


Figure 1: Muqueuse intestinale et cellules épithéliales (Cuibai, 2008)

II –Flore intestinale

La flore intestinale est l'ancienne dénomination poétique, d'une réalité appelée aujourd'hui le microbiote intestinal. Il représente l'ensemble des bactéries peuplant notre tractus digestif. Sa subsistance est assurée par nos résidus alimentaires, nos sécrétions ainsi que par la desquamation de nos tissus. En retour, le microbiote participe activement à notre bonne santé. Ce commensalisme résulte d'une longue vie commune et aujourd'hui, nous ne saurions vivre l'un sans l'autre.

Paradoxalement il nous est pour une grande part inconnu dans sa diversité et ses fonctions. Les recherches dans ce domaine furent l'action de petits groupes de chercheurs disséminés dans le monde jusqu'à ce que depuis 9 ans environ, le sujet soit repris par une importante part de la communauté internationale mettant en œuvre de nouvelles avancées technologiques, en particulier le séquençage massif du génome de ces milliers d'espèces bactériennes qui nous habitent : le projet « metagénome ».

Nous allons ici donner une image actualisée du microbiote (sa diversité, sa constitution et quelques unes de ses fonctions) à la lumière des résultats acquis par sa réévaluation moléculaire récente.

II-1 Diversité du microbiote intestinal

On estime aujourd'hui que le microbiote intestinal humain, dont la densité atteint son maximum dans le côlon distal avec 1011 bactéries par gramme de contenu, est composé de centaines d'espèces. La caractérisation traditionnelle par la culture *in vitro* (un exemple, Finegold et Attebery, 1974) est aujourd'hui délaissée dans la mesure où elle ne permet de prendre en compte que 30 % environ des microorganismes dénombrables par microscopie.

L'utilisation d'outils moléculaires a montré que la plus grande partie (2/3 environ) des espèces dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu lui sont propres (Suau et *al.*, 1999; Eckburg et *al.*, 2005).

Ainsi, la diversité d'espèces bactériennes commensales de l'intestin humain à l'échelle de la planète apparaît immense.

L'analyse de sa composition en taxa (genres bactériens et/ou grands groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus.

Trois phyla bactériens, Firmicutes, Bacteroidetes et Actinobacteria rassemblent la plus grande part des bactéries fécales dominantes. Le phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif) est toujours fortement représenté. Il comprend tout d'abord le groupe dit « *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccoïdes* » qui est souvent le plus important (14 à 31 % des bactéries totales en moyenne suivant les études) ; (Sghir et *al.*, 2000; Rigottier-Gois et *al.*, 2003; Seksik et *al.*, 2003) Il comprend des espèces bactériennes appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrovibrio*. Le phylum des Firmicutes comprend également le groupe « *Clostridium leptum* », avec notamment les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens*, groupe qui est aussi très souvent dans la dominance (16 à 22% en moyenne) ;(Seksik et *al.*, 2003; Lay et *al.*, 2007).

Les Bacteroidetes sont représentés par les genres apparentés à *Bacteroides* (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*). Ils sont toujours présents et partagent la dominance avec les groupes précédents (9 à 42 % des bactéries totales suivant les études). Le phylum Actinobacteria est moins systématiquement détecté en dominance mais il représente en moyenne quelques pourcents des bactéries totales. On y trouve les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les bactéries du groupe *Collinsella-Atopobium* (0,3 à 3,7 % en moyenne) (Rigottier-Gois et *al.*, 2003).

Les entérobactéries sont plus rarement observées dans la microflore fécale dominante (en moyenne 0,4 à 1 %), de même que les lactobacilles et streptocoques (2 %) (Lay et *al.*, 2007).

Si l'on reconnaît ainsi des caractéristiques très conservées en terme de composition au niveau des Phyla et grands groupes phylogénétiques, au niveau des espèces, la caractéristique principale semble être la présence de nombreuses espèces sujet-spécifiques. Ceci laisse penser qu'il existe au plan fonctionnel une interchangeabilité entre espèces et que les niveaux de résolution différents apportent des informations totalement complémentaires. Enfin les espèces observées ont le plus souvent une spécificité humaine, et dans tous les cas sont associées à l'environnement digestif de façon quasi exclusive. Ceci indique des phénomènes de coévolution avec l'hôte (Ley et *al.*, 2006) que confirment des travaux récents d'association de complexes microbiens entre espèces animales différentes (Rawls et *al.*, 2006).

II-2 Installation du microbiote intestinal

Le fœtus des mammifères évolue *in utero* dans un environnement stérile et la colonisation microbienne débute durant le processus de la naissance. En l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif où les niveaux de population atteignent rapidement 10¹¹ bactéries par gramme de selles.

La colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes et endogènes. Les facteurs exogènes incluent l'exposition aux microorganismes d'origine maternelle (fécale, vaginale et cutanée) et environnementale, mais aussi l'alimentation et parfois l'antibiothérapie, qui peut avoir des effets perturbateurs majeurs. Quelques études indiquent que le lait maternel pourrait être le vecteur de microorganismes de la mère vers l'enfant. Ainsi, même collecté aseptiquement le lait de femme n'est pas stérile. Les facteurs endogènes incluent un ensemble de sécrétions du tube digestif mais aussi de produits des premiers microorganismes colonisateurs qui globalement conditionnent la physico-chimie du biotope. Les bactéries anaérobies qui dominent le microbiote intestinal de l'adulte font partie des premiers microbes rencontrés lors d'une naissance par voie basse. Elles ne se développeront cependant en dominance dans l'intestin que lorsque les anaérobies facultatifs auront consommé l'oxygène présent. Des travaux récents chez l'animal indiquent que certaines espèces anaérobies colonisant modifient leur métabolisme après le sevrage (Bjursell et al., 2006).

Ce premier relais d'espèces s'opère durant les heures qui suivent la naissance.

Des relations antagonistes gouvernent ensuite progressivement le relais d'espèces en dominance conduisant vers l'âge de deux ans à un microbiote stable au plan fonctionnel (Midtvedt A.C. et Midtvedt T., 1992). Les bactéries anaérobies dominent les bactéries anaérobies facultatives dans le côlon distal et les selles par un facteur de 1000 environ.

L'hygiène qui entoure la naissance et les premiers moments de la vie conditionne fortement la dynamique de colonisation. Il apparaît aujourd'hui clairement que la colonisation par des espèces commensales habituelles comme *Escherichia coli* est retardée dans les pays industrialisés par rapport au passé (de quelques jours à 6 mois) et par rapport aux pays en voie de développement, apparemment du fait des conditions d'hygiène appliquées aujourd'hui (Nowrouzian et al., 2003). Des bactéries habituellement associées à la peau (*Staphylococcus* sp.) apparaissent alors dans la flore dominante précoce (Lindberg et al., 2004).

Une naissance par césarienne s'accompagne également le plus souvent de l'acquisition retardée des groupes dominants usuels et de la présence plus fréquente de bactéries d'origine environnementale que dans le cas de naissances par voie basse.

II-3. Distribution des bactéries dans le tube gastro-intestinal humain

L'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions physico-chimiques très différentes aux microorganismes qui s'y trouvent.

Le premier compartiment, l'estomac, se caractérise par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et par une forte acidité (figure 2). De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acido-tolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, les streptocoques, les levures, etc.

Dans le deuxième compartiment, l'intestin grêle, la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies facultatives tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies.

Dans le dernier compartiment, le côlon (dépourvu d'oxygène), le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50 % du volume du contenu du côlon humain.

La microflore du côlon est très complexe et est dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp....). Tandis que les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les Enterobacteriaceae. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont peu représentées.

La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10⁴, 10³⁻⁴, 10⁵⁻⁷, 10⁷⁻⁸ et 10¹⁰⁻¹¹ UFC par g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon respectivement (Ouwehand et Vesterlund, 2003; Isolauri et al., 2004).

Trois phyla bactériens, Firmicutes, Bacteroidetes et Actinobacteria rassemblent la plus grande part des bactéries fécales dominantes (Sghir, Gramet et al., 2000). On y trouve les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les lactobacilles (2 %) (Seksik et al., 2003; Lay et al., 2005). La diversité des espèces bactériennes de chaque individu semble unique, mais demeure relativement stable au cours de la vie.

Toutefois, il faut noter qu'une fraction majoritaire des bactéries (environ 80%) demeure non cultivable et ce pour diverses raisons : méconnaissance des besoins de croissance de certaines bactéries, sélectivité des milieux de culture utilisés, stress dû aux conditions de culture, nécessité d'anaérobiose stricte et difficulté de simuler les interactions entre les bactéries et/ou les autres microorganismes et/ou les cellules de l'hôte. Celle-ci est donc moins explorée (Zoetendal et al., 2004).

Des améliorations sur la détection des bactéries intestinales ont été réalisées grâce à la biologie moléculaire basée sur l'analyse moléculaire des ADN et ARN 16S ribosomaux (Suau et al., 1999; Eckburg et al., 2005).

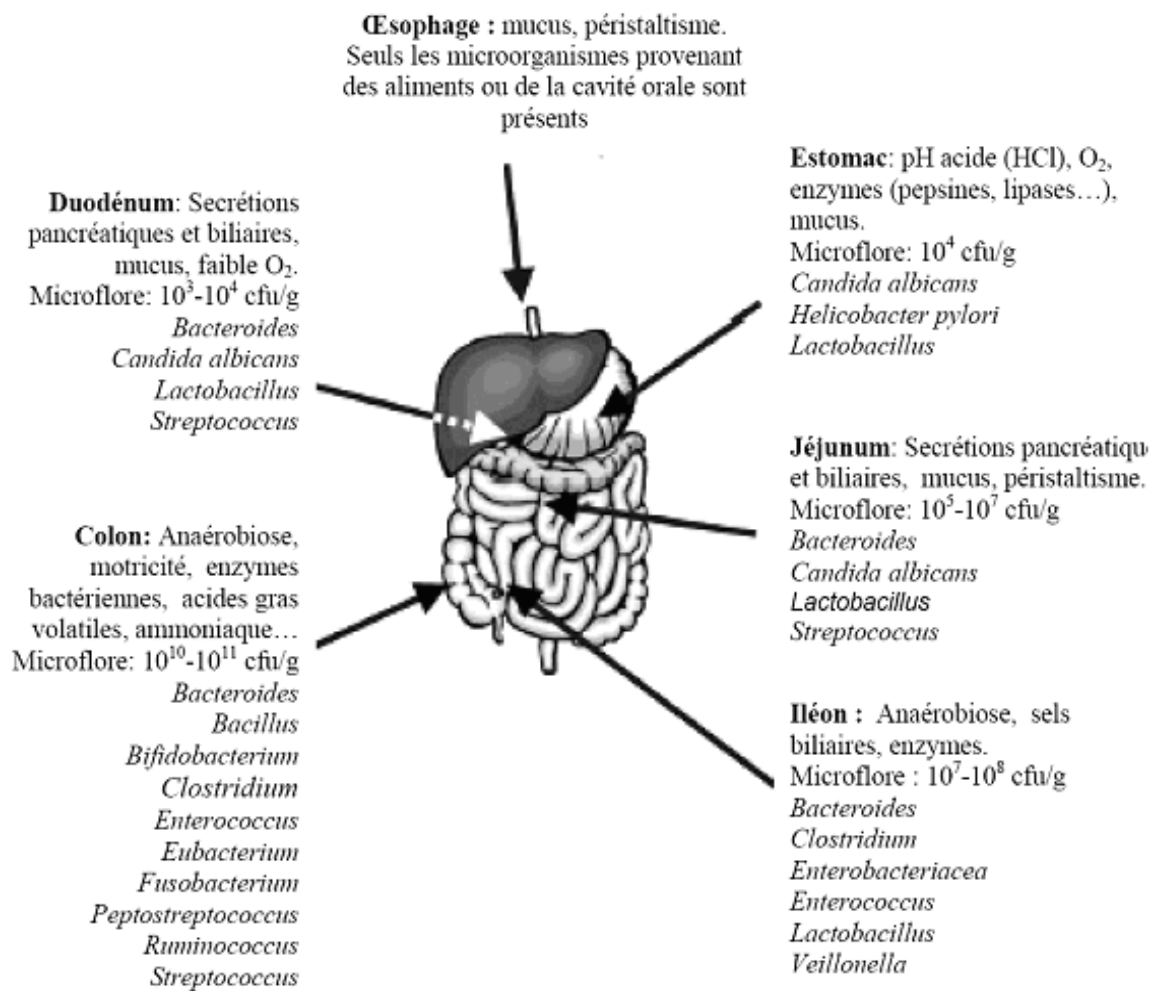


Figure 2 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores (Adapté de Ouwehand et Vesterlund, 2003)
II-4 Diversité des fonctions du microbiote

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques dont les répercussions pour l'hôte sont, pour la plupart, bénéfiques. Parmi les grandes fonctions du microbiote, la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, le rôle de barrière à la colonisation par les microorganismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal et les interactions avec les cellules épithéliales ont des rôles essentiels pour le maintien de la santé de l'hôte.

Des différences ont été mises en évidence entre animaux axéniques (sans germe) et conventionnels : les animaux axéniques présentent ainsi une vascularisation de l'intestin plus faible, des activités enzymatiques digestives réduites, ainsi qu'une couche de mucus plus importante, une susceptibilité aux infections augmentée ou encore un besoin calorique supérieur de 20 à 30 % par rapport à des animaux conventionnels (Shanahan, 2002).

De même, le renouvellement de l'épithélium colique apparaît ralenti en absence du microbiote. La vitesse de production de cellules par crypte est ainsi réduite et peut aboutir à une différence de production quotidienne d'environ cinquante cellules, le nombre de cellules par crypte étant diminué d'environ 20 % (Alam et al., 1994).

Le microbiote est capable de modifier l'expression génique des cellules de l'hôte. C'est ce qui a été montré de façon globale en comparant, à l'aide de puces à ADN, les profils d'expression génique de l'intestin grêle distal de souris axéniques et conventionnelles (Hooper et al., 2001). Cette étude a ainsi mis en évidence une centaine de gènes dont l'expression est modulée, positivement ou négativement, par la présence du microbiote.

L'inoculation de différentes espèces bactériennes chez des souris axéniques a par ailleurs montré, avec cette même technique, que les profils d'expression génique de la muqueuse intestinale diffèrent en fonction de la bactérie testée (Hooper et al., 2001).

Une autre étude, menée à l'aide de souris initialement axéniques, a permis de mettre en évidence l'importance du microbiote intestinal dans l'angiogénèse intestinale (Stappenbeck et al., 2002). Les réseaux de vaisseaux sanguins des villosités intestinales de souris adultes axéniques et conventionnelles ont été comparés, montrant que ce réseau est deux fois moins dense chez des souris axéniques en raison d'un développement stoppé prématurément chez ces dernières.

Il avait été observé que des rongeurs axéniques avaient besoin de 30 % de calories supplémentaires pour maintenir leur masse corporelle par rapport à des animaux conventionnels.

Les mécanismes permettant d'expliquer cette observation restèrent inconnus jusqu'à des travaux récents menés par l'équipe de Gordon suggérant que le microbiote intestinal contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides (Bäckhed et al., 2005; Sonnenburg et al., 2005) et régule le stockage des graisses (Bäckhed et al., 2004).

Il a ainsi été montré que des souris axéniques âgées de huit semaines présentent un volume du tissu adipeux réduit par rapport à des souris conventionnelles. La colonisation de ces souris axéniques avec un microbiote intestinal aboutit à une augmentation de 60 % de la masse grasse et l'émergence d'une insulino-résistance en deux semaines malgré une réduction de la prise alimentaire de 30 %. Les deux mécanismes mis en jeu ont été révélés par cette étude. D'une part, le microbiote intestinal augmente l'absorption de monosaccharides et induit ainsi une lipogenèse hépatique. D'autre part, l'inoculation du microbiote intestinal inhibe sélectivement la protéine Fiaf (Fasting-induced adipocyte factor), elle-même inhibitrice de la lipoprotéine lipase. La présence du microbiote aboutit donc à une activité lipoprotéine lipase plus élevée et ainsi à une augmentation du stockage de triglycérides dans les adipocytes (Bäckhed et al., 2004).

Par ailleurs, il a également été observé que le microbiote intestinal des souris obèses présentait une proportion plus importante de Firmicutes associée à une plus faible population de *Bacteroides* (Ley et al., 2005).

Ces données récentes suggèrent ainsi l'existence potentielle d'un lien entre la composition du microbiote intestinale et une pathologie d'importance croissante qui est l'obésité.

II-5 Microbiote intestinal et système immunitaire

Le système immunitaire intestinal, dont les fonctions peuvent sembler contradictoires, joue un rôle très important dans la physiologie des mammifères. Il doit d'abord développer des réponses protectrices cellulaires et humorales envers les virus, bactéries ou parasites entéropathogènes (Mowat, 2003).

La réponse humorale est réalisée essentiellement grâce à la sécrétion d'anticorps spécifiques des muqueuses, les IgA, bloquant l'adhésion de bactéries pathogènes, la multiplication virale dans l'entérocyte et neutralisant les entérotoxines. La réponse cellulaire,

quant à elle, fait appel aux lymphocytes intra-épithéliaux qui permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal.

Parallèlement à cette fonction protectrice, le système immunitaire intestinal doit également empêcher l'induction de réponses immunes envers les composants des aliments et des bactéries commensales présentes dans le tube digestif. Ce phénomène est nommé la tolérance orale (Mowat, 2003).

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. Les animaux axéniques présentent en effet de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer, nombre de lymphocytes intraépithéliaux réduits, concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées. Les anomalies observées ne se limitent cependant pas à l'épithélium intestinal puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées (Macpherson et Harris, 2004).

L'ensemble de ces anomalies peut-être « réparé » en quelques semaines en inoculant un microbiote de souris conventionnelle à ces souris axéniques. Certains des mécanismes mis en jeu ont été établis et il a par exemple été montré que le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* était capable, à lui seul, d'induire la maturation du système immunitaire de souris axéniques (Mazmanian et al., 2005).

La stimulation permanente du système immunitaire par le microbiote intestinal est en fait nécessaire non seulement pour son développement et sa maturation mais également pour le maintien de l'homéostasie intestinale, de la fonction de barrière de l'épithélium ou encore de l'équilibre entre réponses pro et anti-inflammatoires, la figure 3 qui va suivre met en évidence le système immunitaire associé à l'intestin.

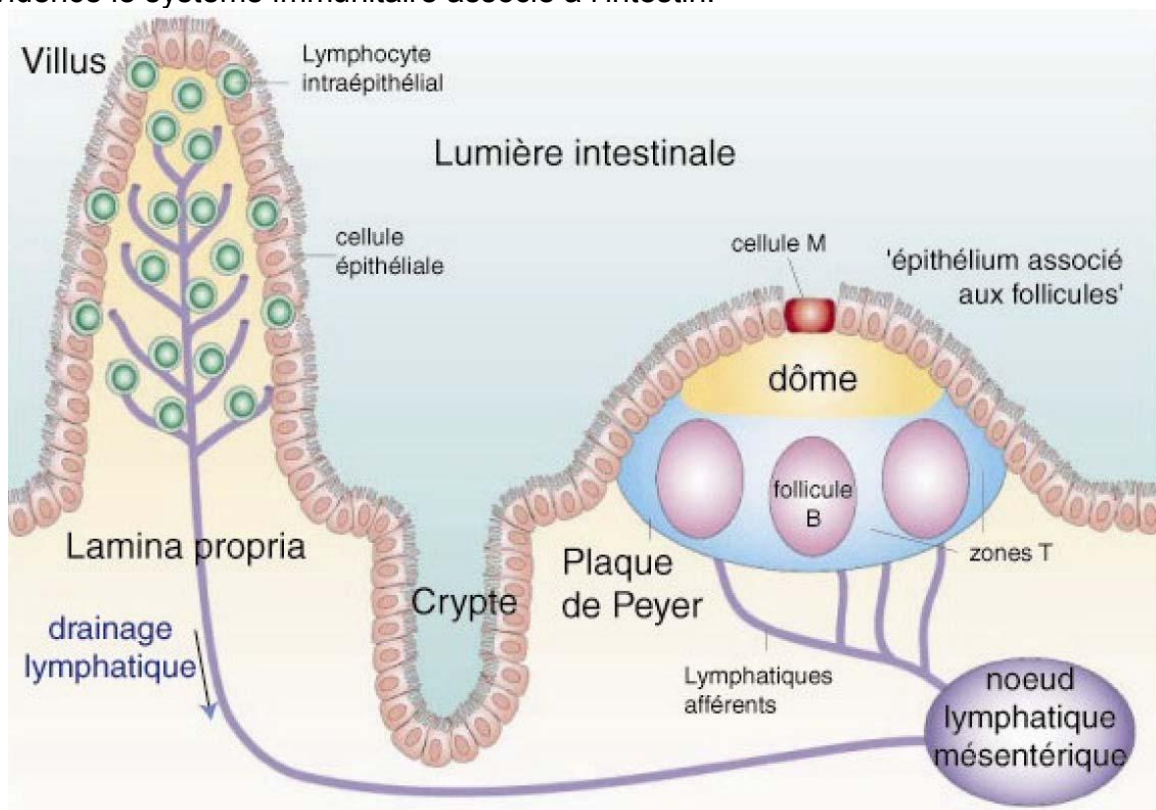


Figure 3 : Le système immunitaire associé à l'intestin (Cuibai, 2008)

II-6 Influence de l'alimentation sur la flore intestinale

Parmi les facteurs environnementaux susceptibles d'influencer l'équilibre de l'écosystème microbien, la nature et la quantité des substrats disponibles pour la fermentation par le microbiote intestinal a un rôle majeur. Les principales sources de carbone et d'énergie du microbiote sont représentées par les glucides et les protéines d'origine alimentaire (fibres alimentaires), non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif et parvenant au côlon, ainsi que par les sécrétions endogènes (mucopolysaccharides, débris cellulaire, enzymes, stérols ...). Une grande variété de substrats est donc disponible pour le microbiote colique, celle-ci contribuant au maintien de la diversité microbienne au sein de l'écosystème (Christl et *al.*, 1992; Robert et Bernalier-Donadille, 2003).

La biotransformation de ces différents substrats par le microbiote colique implique, de plus, l'existence de nombreuses activités métaboliques des microorganismes en présence.

Les processus microbiens de dégradation et de fermentation de ces composés génèrent ainsi la production d'une diversité de métabolites parmi lesquels les AGCC, les gaz ou l'ammoniaque. L'ensemble de ces réactions de fermentation permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires. Ces activités microbiennes sont, de plus, importantes pour l'hôte puisque les métabolites formés sont, pour la plupart, absorbés et utilisés dans l'organisme et ont ainsi des répercussions sur la nutrition et la santé.

Un changement de régime alimentaire modifie, au moins partiellement, le niveau des fonctions du microbiote digestif. Par exemple, la production de gaz par le microbiote est consécutive à la consommation d'aliments fermentescibles (chou, haricots secs). Paradoxalement ce changement ne semble pas se refléter directement au niveau des espèces du microbiote puisque l'on observe une grande stabilité du microbiote au cours du temps pour chaque individu (Zoetendal et *al.*, 1998).

II-7 Les micro-organismes en transit, ingérés (volontairement) par voie orale

Les plus importantes consommations bactériennes proviennent des yaourts et des laits fermentés puisque le nombre est de l'ordre de 10⁸ bactéries / gramme et que la consommation journalière dépasse souvent les 200 mL. Depuis plus d'une dizaine d'années de nouvelles bactéries ont été introduites dans ces produits. Elles en modifient le goût ou la texture mais surtout elles sont choisies pour induire des effets bénéfiques sur la santé humaine. On les appelle des probiotiques, c'est à-dire des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au delà des effets nutritionnels traditionnels.

Il existe de nombreuses revues sur les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé humaine ((par exemple, (Mercenier et *al.*, 2002; Marteau et Shanahan, 2003)).

À l'exception d'une levure probiotique ayant un rôle de médicament (*Saccharomyces boulardii*), les probiotiques sont principalement des bactéries lactiques qui fermentent le lactose du lait en acide lactique. Ils sont souvent présents dans des laits fermentés mais on trouve aussi des produits contenant de grandes quantités de probiotiques sous forme de compléments alimentaires.

Il faut aussi prendre en compte que les effets dépendent des souches (par exemple la souche *Bifidobacterium bifidum* BB12 n'est pas équivalente à tous les *Bifidobacterium bifidum*, jusqu'à preuve du contraire).

III-implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique

III-1. Implication de la flore dans la modification du stockage énergétique et la favorisation de l'adiposité

Les fonctions biologiques contrôlées par la flore intestinale semblent être en relation avec l'efficacité des bactéries à récupérer l'énergie ingérée mais non digérée par l'hôte. L'homéostasie du poids corporel dépend de mécanismes finement régulés au cours du temps. Un excès énergétique de moins de 1 % par rapport aux besoins énergétiques pourrait être suffisant pour entraîner une augmentation du poids corporel sur une période équivalente à plusieurs années (Hill, 2006).

Par conséquent, tous les mécanismes impliqués dans la disponibilité de l'énergie provenant de l'alimentation pourraient contribuer à l'équilibre du poids corporel. Plusieurs études américaines émanant du laboratoire de Gordon ont suggéré l'implication de la flore intestinale dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Servin, 2007).

Il y a quelques années, F. Backhed et ses collaborateurs ont mis en évidence le fait suivant : de jeunes souris élevées de façon classique possèdent – malgré un apport alimentaire en calories moins important - une masse adipeuse plus développée (+ 40 %) que celle des souris exemptes de flore intestinale (souris axéniques) (Backhed et al., 2004).

Dans le même ordre d'idée, les auteurs ont démontré que les souris dépourvues de flore intestinale à la naissance, puis colonisées avec une flore intestinale émanant de souris normales, développent davantage de masse grasse (environ + 60 %) et présentent une diminution de la sensibilité à l'insuline deux semaines après l'instauration de la flore.

Plusieurs mécanismes sont évoqués, qui pourraient contribuer à l'augmentation du poids corporel en présence des bactéries de la flore : une augmentation de l'absorption du glucose par l'intestin ; une augmentation de la disponibilité de l'énergie *via* la fermentation en acides carboxyliques à chaîne courte des composés non digestibles de l'alimentation et /ou une augmentation de l'insulinémie qui contribue à l'anabolisme (Foufelle et al., 2005).

De façon intéressante, le fait de coloniser l'intestin des souris axéniques avec une flore conventionnelle provoque également une augmentation généralisée de l'activité de l'enzyme LPL.

Cette dernière catalyse la libération des acides gras à partir des triglycérides associés aux lipoprotéines circulantes, permettant ainsi aux acides gras d'être captés par le muscle ou le tissu adipeux. Les auteurs ont proposé que cette augmentation soit la conséquence de la suppression de l'expression d'un facteur dérivé de l'intestin : le *fasting-induced adipose factor* (FIAF), un inhibiteur de l'activité de la LPL. La diminution de l'expression de FIAF observée chez les souris colonisées, participerait à l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux.

Ces expériences ont démontré pour la première fois que les bactéries intestinales pouvaient réguler le stockage d'énergie chez l'hôte qu'elles colonisent (Backhed et al., 2004).

Les impacts de la flore intestinale dans le changement du métabolisme énergétique sont détaillés dans la figure 4 qui suit.

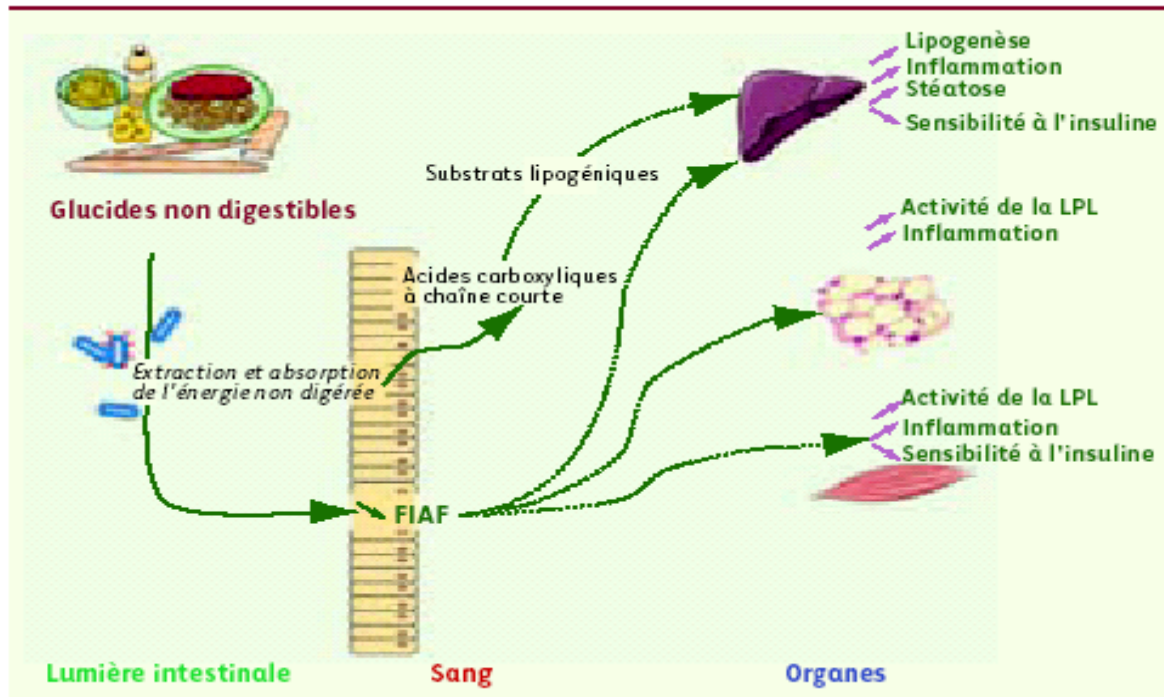


Figure 4 : Rôle de la flore intestinale dans le développement des maladies métaboliques associées à l'obésité (Nathalie et al., 2008).

Théorie de la rentabilité énergétique de l'aliment et du FIAF. L'énergie contenue dans les glucides non digestibles - échappant à la digestion par les enzymes du tractus digestif supérieur-peut être rendue disponible pour l'hôte grâce à l'intervention des bactéries intestinales, qui les fermentent en acides carboxyliques à chaînes courtes. Ces derniers peuvent être utilisés comme substrats lipogéniques et gluconéogéniques par le foie. Par ailleurs, la flore intestinale régule l'expression de la protéine FIAF - la diminution de l'expression de FIAF augmentant l'activité de la lipoprotéine lipase, permettant aux acides gras d'être captés par les tissus périphériques pour être stockés ou oxydés (Nathalie et al., 2008).

IV – généralité sur les cobayes (souris)

IV –1. Environnement.

La cage doit être disposée dans une pièce répondant à certains critères environnementaux tant pour le bien-être des animaux que pour les performances zootechniques de l'élevage et la santé des animaux.

IV –1.1. La température.

IV –1.1. Intervalle recommandé

La température optimale de la pièce où se trouvent les souris se situe dans un intervalle compris entre 22 et 24°C. Cependant, un intervalle entre 18 et 26°C reste

acceptable sauf pour les nouveau-nés ou les animaux nus chez qui la température doit être absolument maintenue entre 22 et 24°C.

IV –1.2. Les dangers

Les variations brutales de la température sont à éviter dans un sens comme dans l'autre car elles prédisposent les animaux à faire un coup de froid ou un coup de chaleur, tous deux étant potentiellement fatals. Rappelons que la souris possède des mécanismes physiologiques de thermorégulation peu efficaces et qu'ils ne peuvent reproduire certains comportements sauvages en cage.

De plus, il faut se méfier du type de chauffage utilisé et mesurer parallèlement l'hygrométrie. Par exemple, le chauffage électrique a tendance à assécher l'air ambiant

IV –1.2. L'humidité.

IV –1.2.1. Valeur recommandée

L'humidité relative optimale est comprise entre 45 et 55 %. Selon certains auteurs, l'humidité relative reste acceptable entre 40 et 70%. (Allmann-iselin, 2000 ; Bulliot, 2004).

IV –1.2..2. Risques sanitaires liés à une humidité trop élevée ou faible

Une hygrométrie trop élevée peut favoriser le développement de certains germes dans l'environnement de l'animal et donc l'apparition de maladies infectieuses. Une hygrométrie trop basse peut entraîner une irritation des muqueuses respiratoires et oculaires, directement ou indirectement par l'augmentation de la mise en suspension de la poussière issue de la litière et de l'alimentation. Chez les jeunes non sevrés ou en post sevrage, une humidité faible (< 30%) associée ou non à une température ambiante basse peut être responsable d'une affection de la queue : la "ring tail". Cette désignation est liée au fait que des lésions nécrotiques annulaires se forment à proximité de sa base. Si l'humidité ambiante n'est pas normalisée, le bout de la queue situé en aval de la constriction enfle, se dévitalise puis tombe par défaut de vascularisation (ischémie) (Berghoff, 1990 ; Tremblay, 2001).

IV –1.3. La qualité de l'air : le taux d'ammoniac et la ventilation

IV –1.3.1. Le taux d'ammoniac

IV –1.3.1.1 Rôle toxique de l'ammoniac et recommandation

Le taux d'ammoniac joue directement sur la santé des animaux puisque à partir d'une concentration de 8 ppm il devient irritant pour les voies respiratoires et les yeux et à partir de 25 ppm il devient toxique pour l'organisme. Lorsque la concentration devient supérieure à 100 ppm, les animaux présentent des éternuements, un ptyalisme et une inflammation des muqueuses, les animaux sont prédisposés aux affections respiratoires et digestives et ils peuvent présenter des troubles de la reproduction. Le rat est tout particulièrement sensible. Ce taux doit donc être maintenu inférieur à 8 ppm (Ephrati et Pizzinat, 2003).

IV –1.3.1.2. Origine de l'ammoniac et mesures préventives

Le taux d'ammoniac est lié à la production et à l'accumulation d'urines. En effet, l'urée présente dans les urines se transforme en ammoniac au contact de l'air ambiant et en présence de bactéries synthétisant une enzyme spécifique, l'uréase.

En pratique, il faut changer la litière à une fréquence suffisante (2 à 3 fois par semaine) voire enlever tous les jours les souillures et assurer une bonne ventilation (Ephrati et Pizzinat, 2003).

IV –1.4. L'éclairage.

IV –1.4.1. La photopériode

L'éclairage doit être assuré pendant 10 à 12 heures par jour voire pendant 14 à 16 heures en continu pour optimiser les performances de reproduction. Il est important de respecter la photopériode et une intensité lumineuse nulle à quasi nulle (< 1 lux) durant la phase d'obscurité. En effet, des études ont démontré qu'une modification de la photopériode entraîne des troubles dans le rythme chrono biologique des femelles avec des répercussions sur la reproduction.

Enfin, supprimer la phase d'obscurité c'est-à-dire éclairer pendant 24 heures/ 24 produit un œstrus quasi-permanent avec un hyper-oestrogénisme, la présence de kystes ovariens et une hypertrophie de l'endomètre, associé à une diminution de la consommation alimentaire (Barthold et Kohn, 1984; Baldwin et *al.*, 1986).

IV –1.4.2. Le spectre lumineux

La cage doit être placée dans une pièce lumineuse, de préférence avec une lumière artificielle.

Si cela n'est pas possible, la cage ne doit pas être éclairée directement par les rayons du soleil en particulier pour les animaux albinos qui sont prédisposés à développer une atrophie de la rétine et les animaux nus qui sont plus sensibles aux rayons solaires. (Baker, 1979 ; Allen et *al.*, 1996; Baldwin et *al.*, 1996).

IV –1.5. La densité animale

La densité animale préconisée dépend du mode d'élevage, mais une surpopulation peut entraîner une instabilité sociale se traduisant par une augmentation des agressions. De plus, mettre plus de 30 souris ensemble est dangereux car elles ont l'habitude de dormir les unes sur les autres et celles situées tout en bas et au milieu de la pyramide peuvent mourir suffoquées (Lane-Peter, 1976; Barthold et Kohn 1984).

IV –1.5.1. La dominance chez les souris

Dans un groupe social, un seul mâle est dominant. Il conserve son statut pendant quelques mois. Le reste de la hiérarchie est linéaire. Lors de la mise en place de la hiérarchie, des combats (parfois jusqu'à la mort) peuvent avoir lieu.

La dominance se traduit par des mordillements des poils et mâchonnement des moustaches des autres souris ; seul à conserver ses moustaches intactes c'est pourquoi on

le nomme "souris barbier" ; dominé : moustaches peu fournies +/- dépilations sur le train arrière à la base de la queue (Colemann et *al.*, 1966; Beaudoin, 1980).

IV –1.6. L'ambiance et le bruit.

IV –1.6.1. L'ambiance

L'ambiance doit être calme et permettre aux animaux bien-être et confort. Ceci est vrai tout particulièrement lors de l'arrivée de nouveaux individus dans un élevage ou une animalerie, un repos de 48 heures dans un local très calme est souhaitable avec une ration composée de foin les premières 24 heures (Ephrati et Pizzinat, 2003).

IV –1.6.2. Le bruit

IV –1.6.2.1. Intensité sonore

Certains auteurs préconisent un fond musical qui apaiserait les souris et diminuerait leurs réactions de stress lors de stimuli sonores intenses et/ ou brutaux. Dans tous les cas, le fond sonore ne doit pas excéder 85 dB (Allmann-Iselin, 2000).

IV –1.6.2.2. Intensité sonore en pratique

Il faut éloigner au maximum la cage de tout appareil pouvant émettre des ondes sonores de haute fréquence (non audibles pour nous) tels que les appareils TV, vidéo, alarme ou les radios et les enceintes. De plus, une habitude au bruit peut être tentée en laissant durant la période lumineuse un fond musical puisqu'il semblerait que les souris habituées à un niveau sonore présentent des réactions de stress moins intenses et moins longues que les autres (Baldwin et *al.*, 1996).

IV –2. L'alimentation

Il est difficile d'estimer les besoins alimentaires des souris du fait de la grande variabilité des souches (génétique, croissance, efficacité métabolique...), de l'utilisation des animaux (en laboratoire, en semi- liberté...), des modes d'élevage et des statuts physiologique et sanitaire. Toutefois, il est important de s'en approcher le plus afin de ne pas avoir de répercussions sur les performances de l'élevage d'une part et sur la santé des animaux d'autre part. En effet, certaines carences ou excès peuvent entraîner une diminution de la fertilité voire une infertilité complète ou une augmentation des pertes embryonnaires.

De même, l'alimentation est une des causes majeures rentrant dans les diagnostics différentiels du syndrome "anorexie/ amaigrissement/ déshydratation" et de la malocclusion. Aussi, elle est un point clé dans l'élevage des souris.

IV –2.1. Comportement alimentaire et conséquences pratiques

Les souris sont des animaux crépusculaires à nocturnes. Ils consomment une grande variété d'aliments dont les produits céréaliers comme l'avoine, le riz ou le blé sont les favoris.

L'alimentation est une activité cyclique qui se déroule 24 heures sur 24 mais qui atteint un pic pendant la nuit c'est pourquoi :

- L'alimentation à volonté semble plus adaptée que le rationnement ;
- L'alimentation fraîche doit être distribuée le soir pour éviter qu'elle ne reste trop longtemps dans la cage avant d'être mangée. Les restes sont enlevés au matin.

Ils peuvent s'alimenter directement dans la mangeoire notamment la nuit lorsqu'ils sont au calme et en confiance mais le plus souvent ils effectuent des réserves pour se nourrir plus tard (généralement au même endroit). En effet, les souris divisent leur cage en aires dévolues spécifiquement à une activité telles que l'aire de couchage, l'aire d'alimentation et l'aire d'élimination.

Le fait de faire des réserves semble être un besoin et non un signe d'un manque alimentaire et est lié à la qualité de proie de ces animaux pour de nombreux prédateurs.

Ils sont coprophages c'est-à-dire qu'ils ingèrent une partie de leurs fèces. Ce comportement leur permet de récupérer des vitamines du complexe B, de la vitamine K et d'autres nutriments synthétisés par la flore digestive pendant le transit. Cependant, cela ne leur permet de couvrir qu'une partie de leurs besoins.

Enfin, rappelons que la souris est un rongeur et qu'elle passe une partie de son temps à ronger, ce qui contribue à équilibrer la pousse continue des incisives (Cunliffe-Beamer, 1987 ; Rosse, 1999 ; Tremblay, 2001).

IV –2.2. Généralités et rappels sur la physiologie digestive

La souris est un animal monogastrique omnivore.

L'estomac est divisé en 2 parties : une partie non glandulaire, la portion cardiaque, et une partie glandulaire, la portion pylorique. Il ne possède pas de proventricule ce qui explique que ni la souris ni le rat ne peuvent vomir. De plus, les sécrétions gastriques sont continues que les animaux s'alimentent ou non.

Le cæcum est peu développé.

Le transit gastro-intestinal dure entre 8 et 14 heures. Cette rapidité ainsi que le très haut métabolisme de base font qu'ils ont besoin d'ingérer des quantités très importantes de nourriture.

Ainsi, il est estimé qu'une souris adulte doit ingérer en entretien 15 % de son poids quotidiennement.

IV –2.3. La flore de la souris

La souris est un des animaux de laboratoire les plus utilisés. La microflore de la souris est caractérisée par une grande dominance des bactéroïdes dans le cæcum et le gros intestin (Schaedler et Dubos, 1962; Smith, 1965; Spears et Freter, 1967). La microflore autochtone de la souris est constituée essentiellement de *Lactobacillus* et streptocoques anaérobies

(Dubos et *al.*, 1963; Dubos et *al.*, 1965) qui apparaissent en premier après la naissance et persistent en plus grand nombre dans tout l'intestin et l'estomac (Savage et *al.*, 1968; Tannock, 1997; Pena et *al.*, 2004). On trouve également des streptocoques, des microcoques et *Clostridium welchii*, et la présence de levures est souvent constatée (Schaedler et Dubos, 1962; Smith, 1965; Savage et Dubos, 1967). *E. coli* est trouvé constamment, mais parfois en quantité proche de celui des lactobacilles et parfois en quantité bien plus faible (Smith, 1965). Enfin certaines espèces, par exemple les *Flavobacterium*, apparaissent très transitoirement et uniquement dans l'intestin grêle, puis disparaissent rapidement ensuite (Ducluzeau, 1969).

IV –2.4. Souris adultes à l'entretien, en gestation, en lactation et souriceaux sevrés en croissance

IV –2.4.1. Recommandations

Les recommandations citées sont issues du National Research Council datant de 1995 et figurent sous forme de tableaux, les tableaux 1 et 2.

IV –2.4.1.1. Besoin énergétique selon le statut physiologique des rats et des souris

Les besoins énergétiques des souris et des rats selon leurs différents stades physiologiques sont résumés dans Le tableau 1.

Tableau 1 : Calcul du Besoin Energétique (BE) des souris et des rats selon leurs statuts physiologiques (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995).

Statut physiologique	Espèce	Besoins énergétiques estimés par jour (BE)
Adulte à l'entretien	Souris	BE = 160 kcal EM x PV 0,75
	Rat	BE = 114 kcal EM x PV 0,75 (- 15% si obèse)
Jeune sevré en croissance	Souris (J21 à J42)	BE = 263 kcal EM x PV 0,75
	Rat (J21 à J49)	BE ≥227 kcal EM x PV 0,75
Femelle en gestation	Souris	1er tiers : BE = 160 kcal EM x PV 0,75 3ème tiers : BE = 360 kcal EM x PV 0,75 (si portée nombreuse)
	Rat	1er tiers : BE = 143 kcal EM x PV 0,75 3ème tiers : BE = 265 kcal EM x PV 0,75
Femelle en lactation	Souris	BE = 310 à 430 kcal EM X PV 0,75 au pic (J10) Puis décroissance jusqu'au sevrage (BE entretien)
	Rat	Au pic de lactation (J12-J14) : BE ≥311 kcal EM x PV 0,75

Ces formules ne sont que des approximations du fait de la grande variabilité entre les souches (croissance plus ou moins rapide, portée plus ou moins nombreuse, métabolisme de base plus ou moins élevé, ...). Toutefois, elles donnent un ordre d'idée sur les différences considérables des besoins selon le statut physiologique.

IV –2.4.1.2. Densité énergétique de la ration

Chez les animaux adultes à l'entretien, la densité énergétique brute de la ration doit être supérieure à 2700 kcal / kg pour les souris sinon la capacité d'ingestion ne peut pas couvrir leurs besoins.

Chez les femelles en fin de gestation et jusqu'au pic de lactation, l'augmentation des besoins énergétiques (et en eau) vont de paire avec une diminution du temps imparti à cette occupation du fait de l'arrivée des petits d'où une quantité ingérée (et bue) limitée. Ceci explique que la densité énergétique de la ration doit être augmentée pendant cette période critique le tableau 2 renferme la recommandation alimentaires pour les différents stades de développements chez les souris.

Tableau 2 : Recommandations alimentaires chez la souris avec une densité énergétique comprise entre 3800 et 4100 kcal EM/ kg d'aliment et une humidité d'environ 10%(Gersende-Morgane et DOUMERC S., 2004).

Nutriments	Unités	Quantité / kg d'aliment			
		Entretien	Croissance	Gestation	Lactation
Matières grasses	g	30 à 50	30 à 50	30 à 50	30 à 50
Acide linoléique	g	6,8	6,8	6,8	6,8
Protéines	g	>50 à 70	180 à 200	180	180
Acides aminés :					
Arginine	g	3	3	3	3
Histidine	g	2 à 4	2 à 4	2 à 4	2 à 4
Isoleucine	g	4	4	4	4
Leucine	g	7	7	7	7
Lysine	g	4	4	4	4
Méthionine	g	5	5	5	5
Thréonine	g	4	4	4	4
Tryptophane	g	1	1	1	1
Valine	g	5	5	5	5
Phénylalanine	g	7,6	7,6	7,6	7,6
Minéraux :					
Calcium	g	5	5	5	5
Phosphore	g	3	3	3	3
Sodium ou chlore	g	0,5	0,5	0,5	0,5
Magnésium	g	0,5	0,5	0,5	0,7
Potassium	mg	2	2	2	2 à 8
Fer	mg	35	35	35	75
Cuivre	mg	6	6	8	8
Zinc	mg	10	10	30	30
Manganèse	mg	10	10	10	10
Iode ou molybdène	µg	150	150	150	150
Sélénium	µg	150	150	150	150
Vitamines :					
A	mg	0,72	0,72	0,72	0,72
	UI	2400	2400	2400	2400
D	mg	0,025	0,025	0,025	0,025
	UI	1000	1000	1000	1000
E	mg	22	22	22	22
	UI	32	32	32	32
K	mg	1	1	1	1
B1 (thiamine)	mg	5	5	5	5
B2 (riboflavine)	mg	7	7	7	7
B3 (niacine)	mg	15	15	15	15
B5 (pantothénate)	mg	16	16	16 à 36	16 à 36
B6 (pyridoxine)	mg	1	1	8	8
B8 (biotine)	mg	0,2	0,2	0,2	0,2
B9 (acide folique)	mg	0,5	0,5	0,5	0,5
B12	µg	10	10	10	10
Choline bi tartrate	g	2	2	2	2

**CHAPITRE 2:
GENERALITES SUR LA
SPIRULINE**

I. Définition

La spiruline est considérée comme une algue bleu-verte planctonique microscopique souvent de forme spiralée, ce pour plusieurs raisons (König, 2007) :

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

Plus précisément c'est une cyanobactérie filamenteuse, c'est-à-dire une bactérie réalisant la photosynthèse (présence de chlorophylle). Née il y a plus de 3 milliards et demi d'années si l'on en croit les traces de cyanobactéries trouvées dans des stromatolithes en Afrique du sud. (Perez, 1997).

Il existe à ce jour 200 genres et environ 1500 espèces de cyanobactéries connues étant très difficiles à détecter, il en reste sans doute encore beaucoup à découvrir (Fox et *al.* 1999). Les scientifiques étudiant la spiruline ont donc d'abord pensé qu'il existait de nombreuses espèces d'*Arthrospira* ; en fait, l'analyse de leurs caractéristiques génétiques, effectuées par Scheldeman et *al.* en 1999, basées sur l'ARDA n'a fait apparaître que deux espèces presque identiques d'*Arthrospira*. Ils supposent donc que de ces deux espèces dérivent plusieurs souches. C'est deux espèces sont : *Arthrospira platensis* initialement originaire du Kanem (Tchad) et *Arthrospira geitleri* ou *maxima*, originaire du Mexique (Antenna technologies, 2007).

La spiruline est la plus connue de toutes ; d'un point de vue taxonomique elle appartient à : (Vidalo, 2008)

Règne: Monera;

Sous règne: *Procaryota*; *Phylum: Cyanophyta*

Classe: *Cyanophyceae*

Ordre: *Nostocales*; Famille: *Oscillatoriacelae*;

Genre: *Arthrospira*.

Espèce et sous-espèce: *Platensis*, *Maxima*, *Toliara*, *Lonar*, *Crater Mexicana*, *Paracas* etc.

II –Caractéristiques structurales

Les cyanobactéries peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires; dans ce dernier cas, leurs cellules s'arrangent en amas de type colonies ou, le plus souvent, en filaments composés de cellules alignées (ces filaments sont appelés trichomes). C'est trichomes sont hélicoïdales, observables uniquement en milieu liquide, et ils sont caractéristiques du genre. C'est d'ailleurs de là que la spiruline tient son nom (Cruchot, 2008).

La taille des cellules de cyanobactéries se situe généralement entre 1 et 10 microns (Lindblad et *al.* 1998). Leur paroi est de type Gram-négatif classique. Ce sont de vrais procaryotes (organismes dépourvus de membrane nucléaire), malgré

leur système photosynthétique proche de celui des eucaryotes (Gershwin et *al.* 2008).

L'espèce *Spirulina platensis* est la plus connue et la plus utilisée lors des travaux de recherche ou lors de l'ensemencement de nouvelles cultures. Elle se compose de trichomes un peu rétrécis au niveau des articulations (figure 5). Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50 μm , diminuant légèrement vers les extrémités.



Figure 5: *Spirulina platensis* observée au microscope (Antenna technologies, 2007).

Par contre l'espèce *Spirulina maxima* se caractérise par des trichomes légèrement effilés aux extrémités et ne rétrécissent pas au niveau de l'extrémité. Ils forment une spire régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60 μm de diamètre (figure 6).



Figure 6: Filaments des deux espèces de spiruline observés au microscope optique (Elyah, 2003).

III-Croissance et reproduction de la spiruline

La spiruline est une cyanobactérie photo-autolithotrophe aérobie, grâce à ces pigments chlorophylliens. Contrairement aux photo-autolithotrophes anaérobies qui n'ont que le photosystème I, elle est dotée des photosystèmes I et II (Merceron, 2006).

Pour sa photosynthèse, la spiruline a besoin d'eau, de carbone, et d'éléments nutritifs dont l'azote en particulier. Elle assimile une source de carbone minéral (le CO_2 atmosphérique) et la convertit en énergie biochimiquement utilisable représentée par le glucose. Son point commun avec les autres cyanobactéries est qu'elle ne possède pas le cycle de Krebs complet (Fox, 1999).

Le mode de reproduction de la spiruline est la bipartition par scission simple. C'est une reproduction asexuée, par segmentation des filaments, ce processus ne

doit pas être confondu avec la mitose, laquelle n'existe que chez les eucaryotes (König, 2007).

Sa vitesse de multiplication est particulièrement rapide dès que la température dépasse 30°C à l'ombre, lorsque ces conditions sont réunies et que le milieu est favorable, le temps de génération est très court (7 heures).

IV –Aspects et intérêts nutritionnels de la spiruline

L'intérêt d'un aliment dans un programme de nutrition consiste d'une part en sa composition d'éléments nutritifs (nutriments, oligoéléments, etc.), et d'autre part en son innocuité et sa digestibilité. Pour ça, différentes analyses approfondies sur la spiruline ont été effectuées, montrant de nombreux points sur le plan nutritionnel à savoir sa composition protéique équilibrée, présence de lipides essentiels rares, de nombreux minéraux et vitamine (Ciferri, 1983).

La spiruline semble actuellement l'une des meilleures solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité. Mentionnons aussi que les conditions extrêmes (salinité et pH) dans lesquelles la spiruline se développe assurent l'hygiène des cultures, car bien peu d'autres micro-organismes sont capables de survivre dans de telles conditions.

Les différentes méthodes de culture, récolte, séchage et conservation des échantillons influencent davantage les écarts de composition biochimique de la spiruline (Falquet et al. 2006).

IV –1. Analyse nutritionnelle qualitative et quantitative

IV – .1.1.Protéines

La teneur en protéines de la spiruline varie entre 50 et 70% de sa masse sèche (Clément, 1975; Fox, 1999).

La spiruline possède la plupart des acides aminés dont les acides aminés essentiels représentent 47% du poids totales des protéines (Bujard, 1970).

Ce micro-organisme ne possède pas de paroi cellulosique mais une enveloppe relativement fragile, constituée de polysaccharides. Cette faible teneur en cellulose explique sa digestibilité de l'ordre de 75 à 83% (Costa et al. 2002). De ce fait, la spiruline ne nécessite pas de cuisson ni des traitements spéciaux pour rendre ces protéines accessibles, de surcroît, l'utilisation protéique nette de la spiruline est estimée entre 53 61%-soit 85 à 92%de celle de la caséine (Chamorro-Cevallos, 1980).

IV –1.2. Lipides

IV –1.2.1. Lipides totaux

Le pourcentage des lipides totaux est compris entre 6 et 13 % du poids sec en spiruline (Ariel, 2001, 2003).

Ils se subdivisent en deux fractions: une fraction saponifiable «ou acides gras» (83%) et une fraction insaponifiable (17%) (Clément, 1975).

IV –1.2.2. Acides gras

Avec quelques huiles végétales peu connues comme l'huile d'orange, de bourrache, de cassis, la spiruline figure parmi les meilleures sources d'acides gras essentiels (Hudson et Karris, 1974) (L'acide gamma-linolénique en constitue 10 à 20% des acides gras chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *S. platensis*) (Flaquet, 1996).

L'importance de ces acides gras essentiels tient à leur devenir biochimique : ceux sont les précurseurs des prostaglandines, des leukotriènes et des thromboxanes qui sont des médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (Flaquet, 2006).

Après le lait maternel la spiruline est l'aliment naturel le plus riche en acides gras. (Chamorro-Cevallos, 1980).

IV – 1.2.3.Fraction insaponifiable

Elle est composée de stérols, de terpènes et de paraffines. Certains de ces stérols pourraient partiellement expliquer l'activité antimicrobienne de la spiruline (Clément, 1975).

IV – 1.3.Glucides

Les hydrates de carbone, ils représentent une bonne part dans la composition des spirulines, entre 15 et 25 %, avec, fait important, une teneur en cellulose très basse (0,5 à 0,7 %), ce qui constitue un facteur favorable à l'efficacité alimentaire des protéines (Quillet, 1975).

Du point de vue nutritionnel, la seule substance glucidique intéressante par sa quantité chez la spiruline est le méso- inositol phosphate qui constitue une excellente source de phosphore organique ainsi que d'inositol (350- 850 mg/kg mat. sèche) (Challem, 1981).

IV – 1.4.Acides nucléiques

La dégradation biochimique des composants (les purines : adénine et guanine) des acides nucléiques conduit à la production d'acide urique. A un taux élevé l'acide urique produit à la longue des calculs rénaux et des crises de goutte.

Généralement la dose maximum admissible à long terme d'acides nucléiques est autour de 4 g par jour pour un adulte (Boudène, 1975). Chez *S. Platensis* comme chez *S. Maxima*, on rapporte des valeurs de 4.2 à 6% d'acides nucléiques totaux dans la matière sèche (Santillan, 1974; AFAA, 1982).

A une moyenne de 5% du taux en acides nucléiques chez la spiruline, la limite quotidienne de 4 grammes d'acides nucléiques représente le contenu de 80 grammes de spiruline sèche. Cette quantité équivaut à environ huit fois la dose de spiruline recommandée comme supplément alimentaire. On peut donc raisonnablement penser que la teneur en acides nucléiques de la spiruline ne pose pas de problèmes, même à long terme et pour des doses élevées (Boris et al. 1975).

IV – 1.5.Vitamines

La spiruline contient une large gamme de vitamines (Tableau 3):

On note une teneur très élevée en bêta-carotène. Cette provitamine A représenterait 80% des caroténoïdes totaux (Pierlovisi, 2007), le reste étant principalement composé de xanthophylle, de crypto xanthine, d'échinénone, de zéaxanthine et de lutéine.

Une étude récente de Wang et *al.* (2008) portant sur des chinois adultes montre que l'ingestion de 4.5 mg de β -carotène provenant de la spiruline apporte 1mg de vitamine A.

Même si la teneur en vitamine E de la spiruline est insuffisante pour satisfaire l'apport journalier recommandé, ses propriétés anti-oxydantes pour les acides gras insaturés expliquent la bonne conservation de ces derniers dans la spiruline séchée. (Ariel, 2001, 2003)

Parmi les vitamines hydrosolubles, on note la présence de vitamines du groupe B. la spiruline est l'une des seules sources d'origine végétale disponibles, contient quatre fois plus de vitamine B12 que le foie de bœuf cru, longtemps donné comme sa meilleure source. Cette teneur exceptionnelle la fait recommander aux personnes atteintes d'anémie pernicieuse (Belay, 1997).

Tableau 3: Teneur en vitamines en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de spiruline d'après (Falquet et Hurni, 2006) complété par d'autres références pour la vitamine E

vitamine	teneur	vitamine	teneur
Vitamines hydrosolubles		Vitamines liposolubles	
B1 (thiamine)	34-50	Provitamine A (b- carotène)	700-1700
B2 (riboflavine)	30-46	cryptoxanthine	100
B3 (niacine)	130	Vitamine E (alpha-tocophérol)	50-190
B5 (pantothénate)	4,6-25		
B6 (pyridoxine)	5-8		
B8 (biotine)	0,05		
B9 (folate)	0,5		
B12 (cobalamine)	0,10-0,34*		
C (acideascorbique)	traces		

* hors pseudo vitamine B12

IV – 1.6.Pigments et enzymes

L'origine de la couleur de la spiruline vient des différents pigments, d'où son surnom d'arc-en-ciel. Ces pigments sont :

La chlorophylle, le plus visible des pigments de la spiruline, c'est une molécule verte commune aux plantes, capable de capter l'énergie de radiations solaires- son taux d'environ 1% est l'un des plus élèves que l'on puisse trouver dans la nature (Vidalo, 2008).

La phycocyanine, d'après Vonshak, (1997), la fraction protéique pourrait contenir jusqu'à 20 % de phycocyanine. La phycocyanine aurait une activité anti-tumorale, elle induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses (Li et *al.* 2006). Elle aurait aussi une activité antioxydant (Chopra et Bishnoi, 2007; Wu Li-chen et Ho Jaan, 2007). En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel.

Les caroténoïdes, sont la plupart des provitamines A et sont indispensables aux humains et aux animaux. La spiruline est l'un des aliments les plus riches qui soient en bêta carotène- elle en contient entre 20 et 25 fois plus que la carotte.

Parmi les enzymes identifiées de la spiruline, il ya principalement le superoxyde dismutase ou SOD, qui joue un rôle d'antioxydant primaire, éliminant facilement les radicaux libres primaires dès leurs formation, avec une teneur d'environ 1,5 millions d'unités / kg de spiruline sèche (Laboratoire NATESIS, 2007).

IV – 1.7.Minéraux et oligoéléments

En quantités importantes de minéraux, on trouve :

Le fer, avec sa biodisponibilité élevée, il fait de la spiruline une source de fer particulièrement adéquate pour les femmes enceintes souvent anémiées. (Pyufoulhoux et *al.*, 2001).

Du magnésium, du calcium, du phosphore, du zinc et le sélénium, en quantités comparables à celles trouvées dans le lait. Les quantités relatives de ces éléments sont équilibrées ce qui exclut le risque de décalcification par excès de phosphore. (Falquet, 2006).

Les différents minéraux qui composent la spiruline sont mis en exergue dans le tableau 4 qui va suivre.

Tableau 4 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche d'après (Falquet et Hurni, 2006)

Minéraux	Teneur (µg/g)	Minéraux	Teneur (µg/g)
Calcium	1300-14000	Cuivre	8-10
Phosphore	6700-9000	Chrome	2.8
Magnésium	2000-2900	Manganèse	25-37
Fer	580-1800	Sodium	4500
Zinc	21-40	Potassium	6400-15400

V_ Effets secondaires et de surdosage lié à la consommation de la spiruline

Malgré sa richesse en nutriments, en micronutriments et sa digestibilité, la spiruline reste toujours un aliment, qui peut présenter des effets secondaires lors d'un surdosage (Falquet, 2006) :

- Teneur en acides nucléiques : les complications dues à des taux élevés d'acide urique à long terme produisent des calculs rénaux et de la goutte.
- Vitamines A : présente une toxicité à une forte dose, contrairement à son précurseur le bêta-carotène (présent dans la spiruline), qui est éliminé sans risque de surdosage quelque soit sa concentration et l'organisme ne transforme en vitamine A que la quantité nécessaire de bêta-carotène.
- Toxicités des minéraux : la spiruline absorbe les métaux lourds (plomb, mercure, arsenic, fluor) présents dans les milieux de culture. Ces problèmes de toxicité (d'après Falquet, 2006) semblent inexistantes pour la spiruline cultivée en milieu artificiel. Il reste donc fortement conseillé d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à l'alimentation humaine.
- Cyanotoxine: produite par d'autres algues, qui envahissant le milieu de culture de la spiruline agit sur le système nerveux et le foie. Cette contamination peut être évitée dans le cas de la spiruline cultivée.
- Contamination microbiologique : est due aux mauvaises conditions et règles d'hygiène de culture de spiruline, que certains microbes pathogènes introduits dans le milieu deviennent résistants au pH élevés. Une analyse bactériologique de vérification devrait être faite sur le produit fini de temps en temps. En raison des risques de contamination après récolte, une pasteurisation du produit fini peut être nécessaire.

VI_ La spiruline dans la pharmacopée

Quelques études cliniques suggèrent, en effet, des effets thérapeutiques tels que :

L'effet contre l'hyperlipidémie (réduction du cholestérol sanguin) par la spiruline. Confirmée par les essais réalisés sur l'homme, qui avec un régime régulier à la Spiruline de 4,2 g / jour pendant 4 semaines engendrait une diminution du cholestérol et une baisse significative de dépôts graisseux dans les artères (Kato et *al.* 1984).

Effet contre des cancers par stimulation du système immunitaire et la réduction de la toxicité des reins par les métaux lourds et les drogues, grâce à la phycocyanine (pigment bleu de la spiruline) (Fukino et *al.* 1990).

Effet sur la flore intestinale, par l'augmentation des Lactobacilles de la flore intestinale, qui facilitent la digestion et l'absorption des nutriments, protègent contre les infections et stimulent le système immunitaire (Tsuchihashi, 1987).

La protection contre les radiations, grâce aux molécules protectrices présentes dans l'extrait de spiruline, qui agissent comme facteurs stabilisant de l'ADN (Schwartz et *al.*, 1987).

Sa bonne composition en fer et en vitamine, la spiruline prévient contre l'anémie ferriprive (fer), l'anémie pernicieuse (vitamine B12), avitaminose (provitamine A).

PARTIE II :
PARTIE EXPERIMENTALE

HYPOTHÈSE ET QUESTION DE RECHERCHE

L'hypothèse que nous nous sommes proposée et que nous avons émis par intermédiaire de cette étude se résume à:

L'immense potentiel nutritionnel de la spiruline rend possible son utilisation comme prébiotique nourrissant de la flore intestinale du consommateur particulièrement la croissance des bifidobactéries connus par leur faible activité protéolytique, ainsi des doses élevées de cette algue doivent être nocives pour la santé du consommateur.

Question de recherche:

- ✓ Quelles sont les différentes doses de spiruline enrichissant l'alimentation des souris qui agissent sur leurs comportements nutritionnels ?
- ✓ Quelles conséquences peut avoir l'excès de cette algue sur la santé du consommateur ?
- ✓ La spiruline est-elle un aliment qui permet une bonne croissance de bifidobactéries, un des composants de la flore intestinale?
- ✓ L'excès de cette algue peut-être dangereux pour la santé du consommateur?

OBJECTIFS

L'objectif général assigné à notre étude est le suivant:

Contribuer à l'étude des effets de la spiruline sur la physiologie du cobaye à travers neuf lots de souris Balb/c.

Les objectifs spécifiques de cette présente étude sont les suivants:

- ✓ Identification de la souche de spiruline.
- ✓ Contribution à l'étude des conséquences de différentes doses de spiruline enrichissant l'alimentation des souris sur les paramètres suivants :
 - Le gain de poids
 - Les *Bifidobacterium* et *Echericha coli* intestinal.
 - La glycémie sanguine
 - Les globules rouges et plaquettes sanguines.

CHAPITRE I: MATERIELS ET METHODES

I- Matériels et Méthodes

I-1. Cobayes et aliments

I-1.1. Cobayes

Les expériences sont réalisées sur 54 souris consanguines de souche BALB/c fournies par l'animalerie de l'université Houari Boumediene de bab Ezouar. Ce sont des souris mâles âgées de 4 à 8 semaines au moment de la réception, acclimatées avant toute manipulation pendant une semaine sur le lieu de l'expérimentation. Les souris sont réparties aléatoirement en 9 groupes de 6 souris chacun. Chaque souris est identifiée. Chaque groupe est soumis à un régime différent.

I-1.2. Condition d'élevage

Les animaux sont hébergés dans une pièce convenablement aérée, à température variant entre 18 et 22°C, humidité relative (90±1%). Elles sont logées dans des cages en acier inoxydable, et soumises à un cycle d'environ 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. L'eau et la nourriture sont disponibles. La nourriture est renouvelée tous les jours.

I-1.3. Régimes

Toutes les souris sont nourries avec des granules pendant une semaine pour l'acclimatation. Les souris témoins reçoivent durant 6 semaines un régime à base de concentré et de pain, les autres groupes ont eu des régimes différents selon le but de chaque étape expérimentale et qui vont être mis en exergue dans ce qui suit:

I-1.4. Suivi des animaux

Des prélèvements de fèces sont réalisés en début (J0) et en fin d'expérience pour chaque régime pour les analyses bactériologiques. Des prélèvements sanguins sont également réalisés en fin d'expérience pour le dosage des globules rouges des lots témoin et expérimentaux. En fin d'expérience (après un mois) les animaux sont sacrifiés afin d'effectuer des dissections sur ces derniers et faire les observations sur les viscères des souris.

I- 2. Choix du lot

Choisir notre lot de souris de laboratoire en fonction de paramètres suivant :

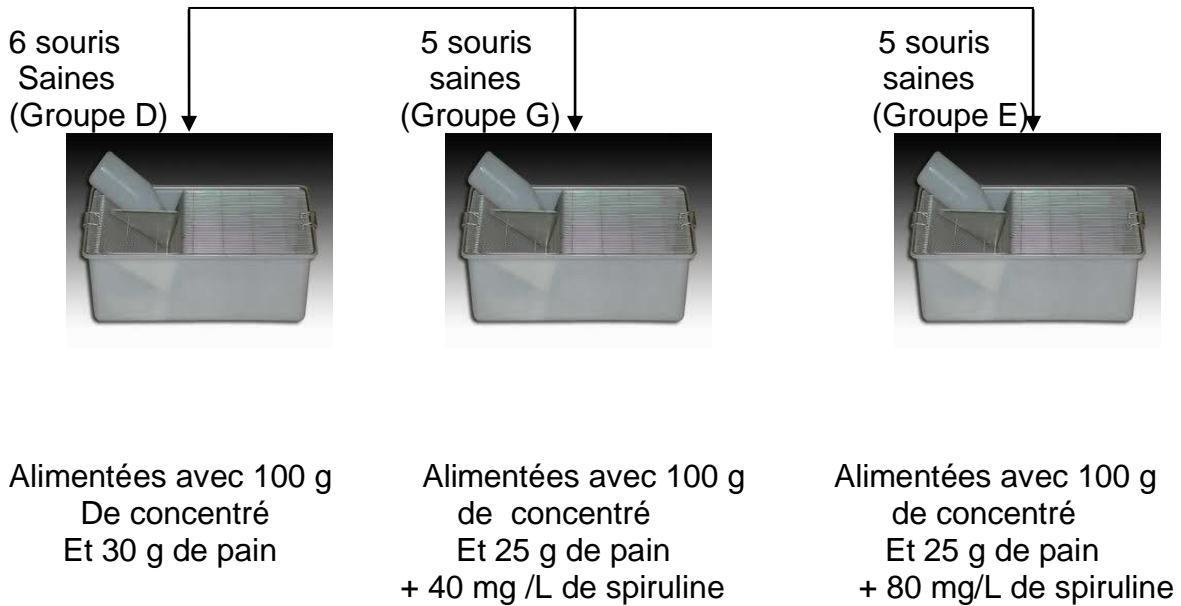
- Age : de 4 à 6 semaines
- poids : en choisissant des individus du même poids.
- Race : souris Balb/c.

Fixer leurs paramètres d'alimentation

Diviser nos lots en témoin et expérimentaux auxquels on ajoutera la spiruline (en différentes concentrations calculées à partir des informations théoriques sur les doses préconisées pour l'Homme) dans leur alimentation de la manière suivante :

- **Première étape**

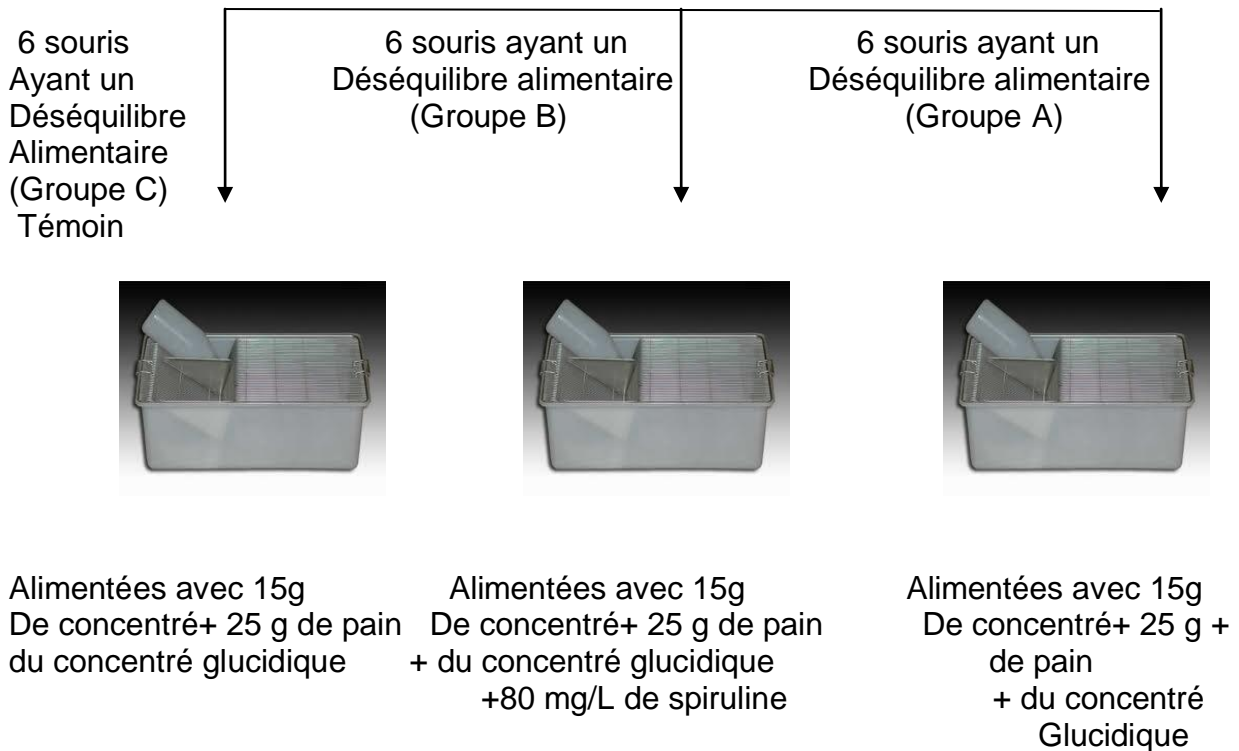
Dans chaque lot nous avons entre 5 et 6 souris, tous des males.



- **But de cette étape**

Observer l'influence de la spiruline sur la flore intestinale et sur le gain de poids.

- **Deuxième étape**



Composition du concentré glucidique :

- 110g de sucre
- 40 g d'amidon
- Huile d'olive

Le concentré glucidique se compose de l'amidon, de saccharose et une source lipidique, le but c'est d'induire un déséquilibre alimentaire hypoprotéique et hyperglucidique.

Après induction d'un déséquilibre alimentaire (durent 20 jours) nous avons reformulé l'alimentation des souris de la façon suivante :

- Groupe A : 15 g de concentré + 30 g de pain+ 80 mg/L de spiruline.
- Groupe B : 15 g de concentré + 30 g de pain+ 80 mg/L de spiruline.
- Groupe C : 15 g de concentré + 30 g de pain.

- **But de cette étape**

Observer l'impact de la spiruline sur la correction des déséquilibres alimentaires.

- **Troisième étape**

6 souris souffrant
De malnutrition grave
(Groupe X)



Alimentées avec
100g De concentré
+20 g de pain

6 souris souffrant
De malnutrition grave
(Groupe Y)

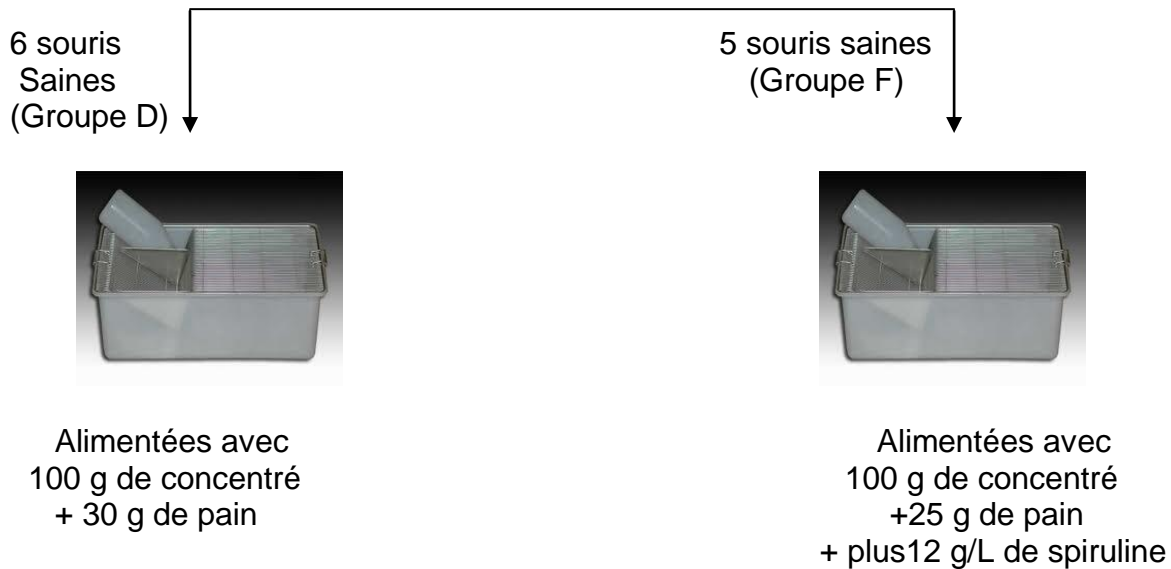


Alimentées avec
100g de concentré
+20 de pain + 800mg/L
De spiruline

- **But de cette étape**

Observer l'effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur le gain de poids.

- **Quatrième étape**



- **But de cette étape**

Observer les conséquences d'un excès en spiruline.

- **Cinquième étape**

Procéder à la dissection des souris.

- **But de cette étape**

Voir les différences de l'évolution des viscères des cobayes témoins et expérimentaux (taille, forme, couleurs ...).

Nous avons fixé l'alimentation de toutes nos souris pendant une semaine en leur donnant que du concentré et du pain afin d'homogénéiser nos lots ensuite nous avons commencé nos expérimentations.

Nous avons procédé à la pesée de nos lots chaque trois jours afin qu'on puisse noter les changements de poids.

I- 3. Échantillonnage

L'échantillonnage est une opération qui demande le plus grand soin, et doit être effectuée de manière à obtenir des échantillons représentatifs du produit.

I-3.1. Présentation des analyses

Nous avons effectué des analyses physico-chimiques sur l'aliment des souris (le concentré). ainsi que microbiologiques sur la souche de spiruline de provenance de France afin d'apprécier son innocuité et qui se résume en ce qui suit :

I- 3. 2. Analyses physico-chimiques

Le matériel destiné aux examens physico-chimiques doit être propre, sec et ne doit pas avoir d'influence sur les propriétés du produit, tel que la flaveur, la consistance, ou la composition du produit.

I- 3.3. Analyses microbiologiques

En vue d'analyses microbiologiques, le matériel doit être parfaitement propre, stérile et sec au moment de son utilisation. Le prélèvement doit se faire de manière aseptique et le récipient pour échantillon doit être fermé immédiatement après échantillonnage (norme internationale ISO).

I-3.4. Méthodes d'analyses

I- 3.4.1.1. Analyses physico-chimiques des échantillons

Le contrôle physico-chimique est réalisé par la mesure de la matière minérale, les protéines brutes, la cellulose brute, de matière sèche, la matière grasse.

I- 3. 4.1.2. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est la masse restante après dessiccation complète, elle est habituellement indiquée en fraction massique et elle est conventionnellement exprimée en pourcentage en masse.

❖ Principe

La teneur en matière sèche est la masse restante après dessiccation complète de la matière. Elle est conventionnellement en pourcentage massique (Godon et Loisel, 1991).

❖ Mode opératoire

Placer le panier contenant l'échantillon dans l'étuve à 102 ± 2 °C pendant 24 h. Refroidir au dessiccateur (figure 7) puis peser.



Figure 7: Photographie d'un dessiccateur (photographie originale)

❖ Expression des résultats

La matière sèche, est exprimée en pourcentage en masse qui est égale :

$$MS = ((M2-M0) / (M1-M0)) \times 100$$

Où

M0 : la masse en gramme du panier + couvercle

M1 : la masse en gramme du panier + couvercle+ la prise d'essai

M2 : la masse en gramme du panier + couvercle+ la prise d'essai sèche

II-3. 4.1.3. Détermination des cendres

Ce sont des substances résultant de l'incinération de la matière sèche des fourrages exprimées en pourcentages en masse.

❖ Principe

Incineration de la matière sèche à $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un lent courant d'air et pesée du résidu obtenu.

❖ Mode opératoire

Porter au four à moufle (figure 8) le creuset, plus la prise d'essai d'environ 2g de l'échantillon, chauffer progressivement, afin d'obtenir une carbonisation sans inflammation de la masse : 1h30mn à 2h30mn à $550\text{ }^{\circ}\text{C}$.

L'incinération doit être poursuivie s'il y'a lieu, jusqu'à combustion complète du carbone formé (résidu blanc ou gris clair) placer le creuset dans le dessiccateur et l'y laisser refroidir à la température ambiante. Peser à 0,1 mg près.

❖ Expression des résultats

Les cendres de l'échantillon, exprimées en pourcentage en masse doivent être égales à :

$$\frac{(M2-M0)}{M1-M0} \times 100$$

Où

M0 : la masse en gramme du creuset

M1 : la masse en gramme du creuset+ la prise d'essai

M2 : la masse en gramme du creuset+ la prise d'essai sèche



Figure 8: Photographie d'un four à moufle (photographie originale)

II-3. 4.1.4. Détermination des protéines brute

❖ Principe

L'azote total est dosé par titrimétrie, après minéralisation (selon la méthode Kjeldahl, 2001) et distillation.

❖ Mode opératoire

1. Prise d'essai : introduire dans les matras environ 0,5 à 1 g de l'échantillon suivant la teneur présumée en azote et le degré de l'homogénéisation du produit.
2. Minéralisation : placer le matras sur le dispositif de chauffage, après avoir ajouté environ 1 à 2 g de catalyseur et 12,5 mL d'acide sulfurique concentré, chauffer doucement en agitant de temps en temps. Augmenter la température progressivement jusqu'à ce que le liquide devienne limpide et de coloration verte stable. Poursuivre le chauffage environ 2 heures et laisser refroidir les matras. Compléter en ajoutant 100 mL d'eau distillée.
3. Distillation : mettre le matras dans l'appareil à distillation (figure 9). Alcaliser le milieu en introduisant lentement dans le matras environ 50 ml de solution NaOH (soude à 47%), il se produit un échauffement notable du produit, peser 333 g de NaOH puis ajouter de l'eau distillée préalablement refroidie, puis mélanger avec le verre en verre puis mettre sur l'agitateur pour avoir un mélange homogène dilué avec l'eau distillée (333g de NaOH dans 1L d'eau distillée).
L'entraînement de l'ammoniac commence peu après. L'ammoniac libéré par l'alcalisation est distillé. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer contenant 20 ml de la solution absorbante (solution d'acide borique et l'indicateur : rouge de méthyle+ vert de bromocrésol). Poursuivre la distillation jusqu'à récupération d'environ 100ml de distillat.
4. Titrage : le titrage doit être effectué aussi rapidement après la distillation par une solution d'acide sulfurique à 0,1 N jusqu'à persistance du point de titrage. Un essai à blanc doit être inclus dans chaque série de dosage.

❖ Expression des résultats

La teneur en azote total exprime en gramme d'azote pour 100g d'échantillon est donnée par la formule :

$$((V1-V0) \times 14/m) \times 100$$

Où

V1 : volume en millilitre de la solution d' H_2SO_4 utilisée pour la prise d'essai.

V0 : volume en millilitre de la solution d' H_2SO_4 utilisée pour l'essai à blanc.

M : la masse en gramme de la prise d'essai. Le résultat de la détermination est exprimé en protéine après multiplication de la teneur en azote total par un coefficient approprié correspondant à la position du produit 6,25.



Figure 9: Photographie d'un distillateur d'azote (photographie originale)

I- 3.4.1.5. Détermination de la cellulose brute

❖ Principe

Cette méthode est basée sur la solubilisation des composants non cellulosiques par des solutions d'acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium. (Weende, 1989)

❖ Mode opératoire

Placer 1 g de l'échantillon, l'introduire dans un creuset a porosité 0,2 μ et placer le tout sur le fibertec (figure 10) qui est menu d'un réfrigérant. Ajouter 100 ml d'une solution aqueuse contenant 12,5g d'acide sulfurique pour 1000 ml.

Chauffer pour obtenir une ébullition rapide et maintenir 30minutes.

- Après 30minutes laver à l'eau le résidu à plusieurs reprises jusqu'à ce que l'eau de lavage ne soit pas acide, refaire l'opération avec la solution NAOH 12,5g de soude dans 1000 ml
- Mettre creuset +résidu à l'étuve à 105 °C jusqu'à poids constant
- Effectuer les peser après refroidissement au dessiccateur.
- Incinérer dans le four à moufle à 400 °C durant 5h puis refroidir au dessiccateur et peser à nouveau.

❖ Expression des résultats

La différence de poids entre les deux pesées représente les matières cellulosiques, une grande partie de cellulose vraie, une partie de la lignine et les résidus d'hémicellulose.

$$\text{CB \%MS} = ((A-B) / (C \times MS)) \times 100$$

Où

A : poids du creuset + résidu après dessiccation

B : poids du creuset après incinération

C : Poids de l'échantillon de départ



Figure 10: Photographie d'un Fibertech (photographie originale)

I- 3.4.1.6. Détermination de la matière grasse

❖ Principe

Le solvant organique (extracteur) est très peu polaire, il extrait les triglycérides et les acides gras libres à chaînes longues.

❖ Mode opératoire

Après préparation du système Soxhelt, nous pesons 1 g de l'échantillon (P_0) dans une cartouche en cellulose et nous mettons 150 ml d'éther de pétrole dans un ballon préalablement lavé séché et tiré (P_1).

La cartouche est placée dans le système Soxhelt, le ballon est placé dans le bain-marie qui est réglé à une température égale à celle du degré d'ébullition du solvant (95°C).

L'extraction se fait par ébullition du solvant et condensation de ses vapeurs par un réfrigérant, le système de siphonage assure le passage des gouttelettes de la matière grasse vers le ballon.

Cette extraction dure environ 6 heures, et l'éther peut être récupéré avant la fin de l'opération.

Après les 6 heures, les ballons sont retirés et mis dans une étuve réglée à la même température de celle du bain-marie afin d'évaporer l'excès d'éther.

Le ballon est ensuite refroidi jusqu'à poids constant dans un dessiccateur et pesé de nouveau (P_2) (Norme Algérienne 654- 1994).

❖ Expression des résultats

Le pourcentage de la matière grasse est calculé par différence de pesée du ballon :

$$\text{MGT (\%)} = ((P_2 - P_1) / P_0) \times 100$$

Où

P₀ : la prise d'essai de l'échantillon

P₁ : poids du ballon

P₂ : poids du ballon contenant l'extrait gras

I- 3.4.2. Analyses microbiologiques

I- 3.4.2.1. Préparation des dilutions décimales

Pour la spiruline, pesée aseptiquement 25 g dans un récipient stérile et taré ; ajouter ensuite 225 ml d'eau physiologique pour obtenir la dilution 10⁻¹, puis homogénéiser à l'aide avec les mains en agitant.

Toutes les manipulations s'effectuent avec un maximum de précision et de manière aseptique.

À l'aide d'une nouvelle pipette pasteur stérile, prélever 1 ml de la dilution 10⁻¹ précédente et l'introduire dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique. Le tube est agité manuellement pour rendre la dilution homogène et on obtient une dilution de 1/100^{ème} ou 10⁻². On jette la pipette utilisée au bout d'une fois.

On procède de la même manière pour les autres dilutions.

I- 3.4.2.2. Recherche et démembrement de la flore microbienne

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

- ✓ La recherche et le dénombrement de la flore mésophile totale qui est indice de l'état général de la qualité du produit ;
- ✓ La recherche et le dénombrement des groupes de germes indicateurs de contamination fécale:
 - ✓ Les coliformes;
 - ✓ Les Clostridium sulfito-réducteurs;
 - ✓ La recherche des germes pathogènes:
 - ✓ Les salmonelles;
 - ✓ Les staphylocoques (*Staphylococcus aureus*);
 - ✓ La recherche des levures et moisissures;
 - ✓ La recherche des streptocoques fécaux.

I- 3.4.2.3. Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale

C'est l'ensemble des microorganismes aptes à se multiplier à l'air libre avec une croissance optimale située entre 25 et 45°C. Cette flore est un indicateur de la qualité générale du produit à analyser (Guiraud, 1998)

❖ But

Le dénombrement de ces germes reste la meilleure méthode permettant d'estimer l'indice de salubrité et de qualité des aliments dans un contrôle.

Un aliment dont la flore totale est en dessus des normes présentera de mauvaises conditions de conservation et sera considérée comme impropre à la consommation.

❖ Principe

Le milieu utilisé est une gélose nutritive de type PCA exempte d'inhibiteur et d'indicateur, après incubation cette flore apparaît sous forme de colonies lenticulaires (Graud et Galzy, 1980).

❖ Mode opératoire

À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} mettre aseptiquement 1 ml dans une boîte de pétrie vide et stérile. Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose PCA, puis faire des mouvements circulaires en forme de 8 pour permettre à l'inoculum de se mélanger avec la gélose, laisser solidifié sur la pailasse, les boîtes ensuite sont incubés à 30°C pendant 72 heures (Bourgeois et Leveau, 1980).

❖ Lecture

Retenir les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 à 300. Les résultats sont exprimés en nombre de germes par ml, elles sont données par la formule suivante:

$$X = N \cdot 1/D \cdot 1/V.$$

X: Nombre de germes par ml de produit.

N: Nombre de colonies.

V: Volume de dilution.

D: Facteur de dilution ou la dilution considérée.

I- 3. 2.2.2. Recherche et dénombrement de coliformes totaux

Ils appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, ceux sont des bacilles Gram-, asporules, oxydase-, aéro-anaérobies facultatifs, capables de se développer en présence des sels biliaires, et de fermenter le lactose avec production de gaz. Ces bactéries sont vivantes naturellement dans l'intestin. La présence de ces germes dans le produit à analyser traduit une contamination fécale récente (Giraud, 1998).

❖ Technique

À l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), on l'ensemence dans des boîtes de pétries stériles puis compléter avec environ 20 mL de gélose désoxycholate à 1‰ fondue et refroidie, faire ensuite des mouvements circulaires pour permettre de mélanger l'inoculum avec la gélose.

Après refroidissement, on incube les boîtes à 37°C pendant 24 h.

❖ Lecture

Le nombre de colonies doit être compris entre 30 et 300 (Giraud et Galzy, 1980).

I- 3.4.2.4. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les coliformes fécaux (*Echerichia coli*) sont des bacilles Gram- aéro-anaérobie facultatifs, thermo-tolérants, ils fermentent le lactose et produisent de l'indole a 44°C. (Bourgeois et Leveau, 1980).

❖ Technique

On suit les mêmes étapes pour le dénombrement des coliformes totaux mais les boites sont incubées à 44°C pendant 24 heures.

❖ Lecture

Dénombrer les boites contenant entre 30 et 300 colonies.

I- 3. 2.2.4. Recherche et dénombrement de staphylocoques dore

Les staphylocoques appartiennent à la famille des *Micrococaceae*, ceux sont des cocci Gram positif associés en amas ou en chaînettes, non sporules, apéro-anaérobies facultatifs (Bourgeoi et Leveau, 1980).

Il s'agit des bactéries qui contaminent fréquemment les aliments et peuvent entraîner des dégradations et des problèmes sanitaires (Giraud, 1998).

❖ Principe

Le milieu utilisé est le milieu gélose Braid Parker qui contient de cloures de lithium, du tellurite et une concentration en glycines comme agents sélectifs, le glycolle et le pyruvate agissent comme accélérateur de croissance pour les staphylocoques et en fin, le jaune d'œuf qui joue un rôle nutritif et révélateur enzymatique.

_Réduction de tellurite en tellure donne un noircissement des colonies.

_Hydrolyse des lipoprotéines du jaune d'œuf signale par le halo d'éclaircissement entourant leurs colonies noires (Bourgeoi et Leveau, 1980).

❖ Mode opératoire

Mettre à l'aide d'une pipette stérile 0.1ml de dilution 10^{-1} , à la surface de la gélose préalablement fondue et refroidie, étaler l'inoculum avec un râteau, la boite sera incubée à 37°C pendant 48 h (figure 11).

❖ Lecture

Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaît sur le milieu de couleur noire brillante avec une bordure blanche et mince entourée d'un halo clair.

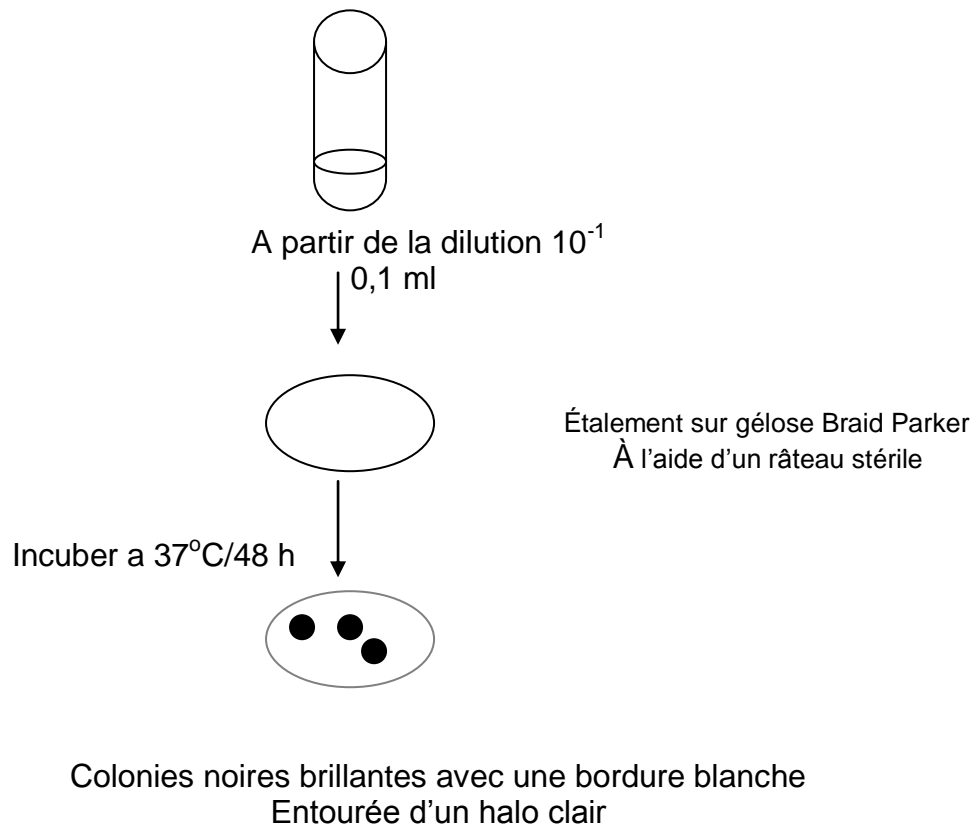


Figure 11 : Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

I- 3.4.2.5. Recherche et dénombrement des *Clostridium sulfito-réducteur*

Ces bactéries appartiennent à la famille des bacillaceae, ce sont des bacilles Gram positifs sporulés, et anaérobies stricts. Elles réduisent le nitrate en nitrite et fermentent le lactose avec production de gaz. Elles peuvent contaminer les produits alimentaires dans des conditions d'anaérobiose ainsi que les conserves où peuvent facilement proliférer grâce à leurs spores, c'est les seuls êtres vivants après pasteurisation (Bourgeois et Leveau, 1980)

❖ But

L'intérêt de la recherche de ces germes en bactériologie alimentaire repose d'une part, sur leurs capacités à produire les toxines, d'autre part sur leurs capacités à sporuler donc à survivre aux processus de conservation des aliments. La recherche vise à confirmer la présence des spores, après destruction des formes végétatives par chauffage des dilutions dans un bain Marie à 80°C pendant 10 mn.

Deux espèces sont responsables de toxi-infections alimentaires:

- ✓ *Clostridium perfringens*, toxigène et pathogène, responsable de septicémies chez l'Homme et les animaux ;
- ✓ *Costridium botulinum*, responsable du botulisme chez l'Homme.

❖ Principe

Le milieu utilisé est la gélose viande-foie (VF), additionnée de sulfite de sodium et d'alun de fer, l'action des germes sulfita-réducteurs conduit à la réduction du sulfite de sodium en présence d'alun de fer en sulfure, donnant la couleur noire aux colonies (Bourgeois et Leveau, 1980).

❖ Mode opératoire

Introduire 5 ml de la dilution 10^{-1} dans deux tubes vides et stériles et également 1 ml de cette dilution qui va être complétée avec 4 ml d'eau physiologique stérile.

Ces trois tubes sont portés au bain-marie 80°C pendant 10 minutes, afin d'éliminer la forme végétatif et de ne laisser que la forme sporulant. Les tubes sont aussitôt refroidis à l'eau du robinet avant de faire couler aseptiquement la gélose viande-foie fondue et refroidie à 45°C additionnée de sulfite de sodium (5 ml) et d'alun de fer (2 ml, les tubes sont à nouveau refroidis à l'air ambiant et incubés à 37°C pendant 72 h (Figure 12).

❖ Lecture

Les colonies apparaissent entourées d'un halo noir. Les résultats sont exprimés par nombre de spores par ml de produit.

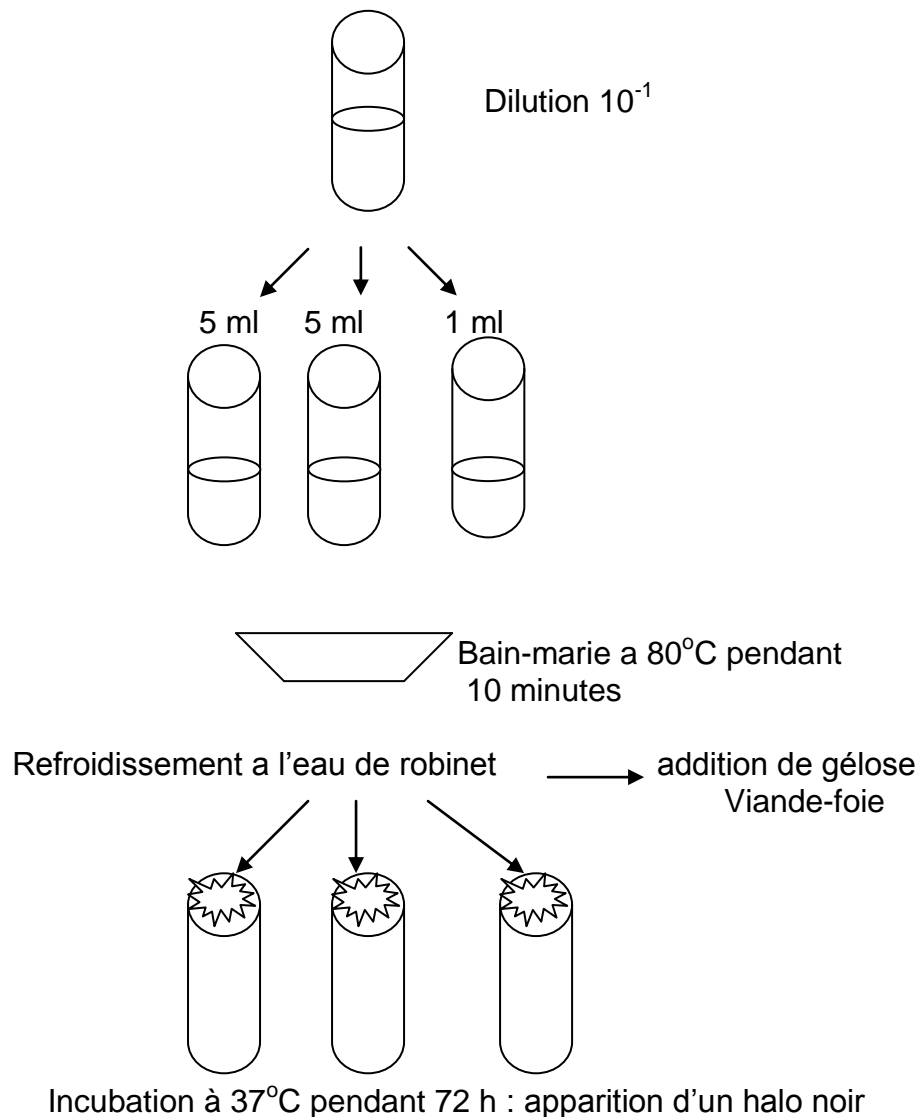


Figure 12: Recherche et dénombrement des *Clostridium sulfito-réducteurs*

I- 3.4.2.6. Recherche des Salmonelles

❖ But

La recherche de ces germes est très importante, car leur effet est très fréquemment mis en cause dans les toxi-infections collectives.

❖ Principe

Le sucre, extrait de levure et de peptone constitue la gélose Hectoene qui favorise l'isolement des bactéries du genre *Salmonella* qui sont en effet des entérobactéries pathogènes, ce milieu est rendu sélectif par la présence des sels piliers qui inhibent le développement des *proteus* (Bourgeois et Leveau1980).

❖ Mode opératoire

La recherche des Salmonelles se fait en trois étapes.

Pré enrichissement

Introduire 25 ml de l'échantillon à analyser dans 100 ml de BLMT puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

• Enrichissement

Prélever 1 ml de milieu de pré-enrichissement et le mettre dans 10 ml de milieu SFB puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

• Isolement

À partir de milieu SFB positif (présentant un trouble microbien), ensemercer par stries une boîte de pétrie contenant la gélose Hectoene. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures (Figure 13).

❖ Lecture

Les Salmonelles se présentent sous forme de colonies et de couleur bleue verdâtre avec un centre noire. Les résultats sont exprimés par présence ou absence de germes.

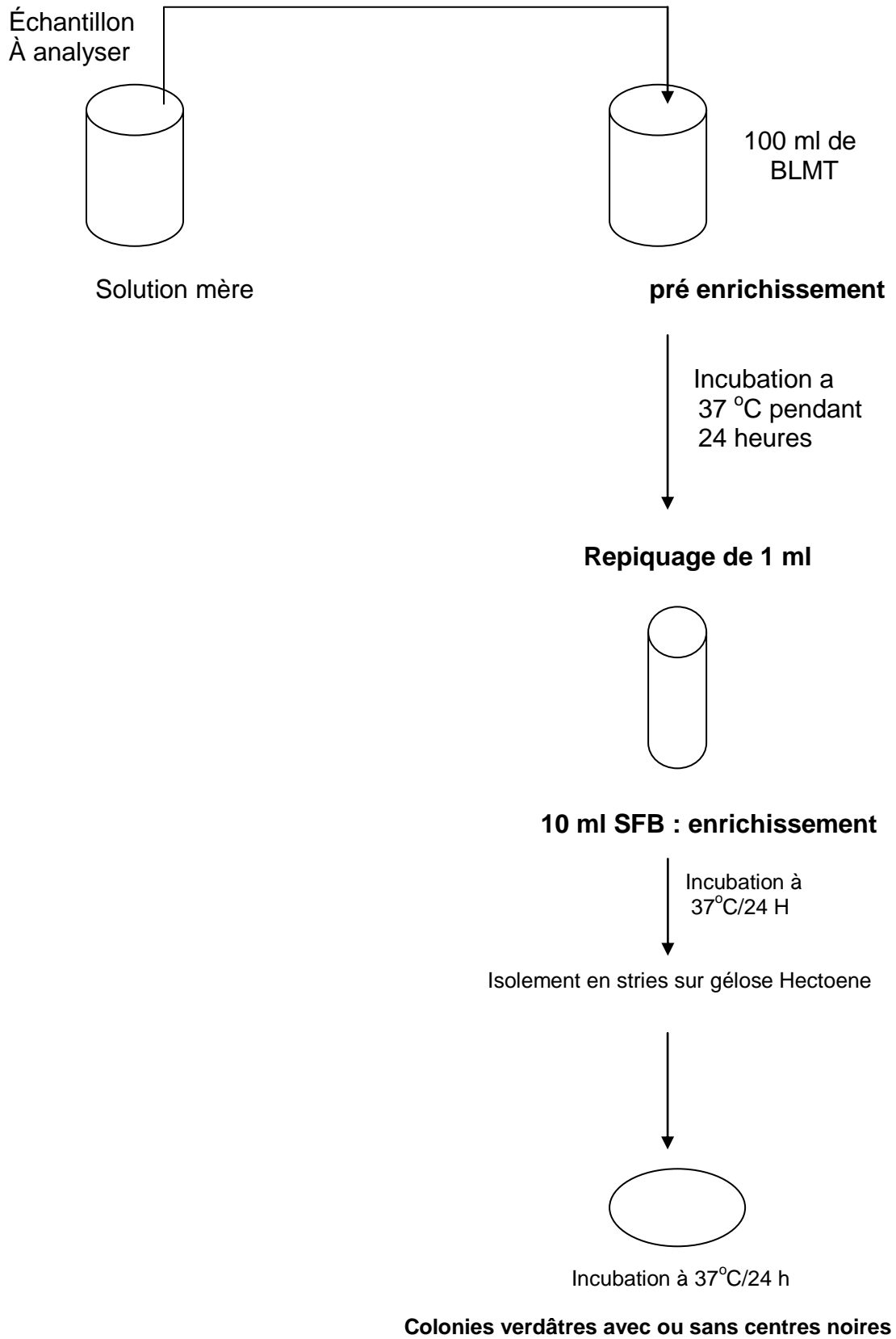


Figure 13: Recherche des Salmonelles

I- 3.4.2.7. Recherche des Streptocoques fécaux

Les Streptocoques fécaux sont des Streptocoques des matières fécales. Ils appartiennent essentiellement au genre Enterococcus, ceux sont des cocci Gram+, micro-aerophiles caractérisés par la voie homo-fermentaire (Guiraud, 1998).

Leur présence dans les produits est considérée comme indice de contamination fécale.

❖ Principe

Le dénombrement se fait en milieu liquide sélectif. Le nombre de streptocoques étant en général peu élevé, on utilise dans un premier temps un milieu d'enrichissement relativement sélectif, le milieu de Roth (azide de sodium comme agent sélectif) pour réaliser le teste présomptif. Dans le cas positif (apparition d'une souche microbienne dans le tube présomptif), on réalise le teste confirmatif, en utilisant le milieu Litsky qui contient l'acide de sodium et le cristal violet comme agent sélectif (Guiraud, 1998).

❖ **Mode opératoire:** deux tests sont préconisés.

• Test de présomption

La recherche se fait sur milieu Roth (D/C, S/C) dans des tubes à essai à raison de 10 ml dans chaque tube.

On ensemence les tubes à essai dans le milieu Roth comme suit :

- 3 tubes de Roth D/C sont inoculés avec 10 ml de l'échantillon à analyser.
- 3 tubes de Roth D/C sont inoculés avec 1 ml de l'échantillon à analyser.
- 3 tubes de Roth D/C sont inoculés avec 0,1 ml de l'échantillon à analyser.

L'incubation des tubes se fait à 37°C pendant 24 à 48 h.

Le test de présomption est positif quant il y a apparition d'un trouble microbien dans le milieu Roth.

• Test de confirmation

Si le test de présomption est positif, un repiquage sur milieu Litsky est effectué l'incubation des tubes est réalisée à 37°C pendant 24 h. Le test positif se réduit par l'apparition d'un trouble microbien et d'une pastille violette au font du tube (Figure 14).

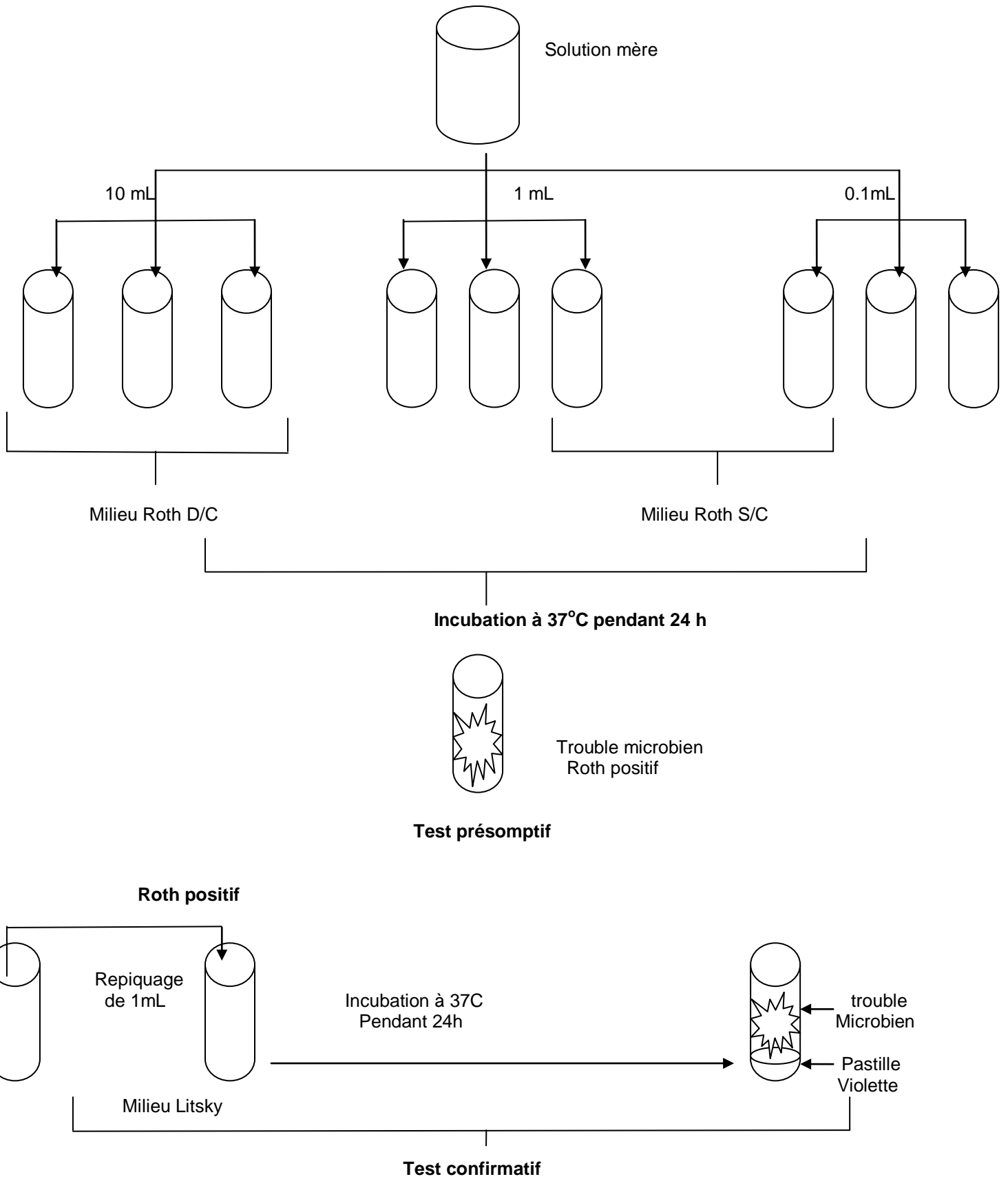


Figure 14: Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

I- 3.4.2.8. Recherche et dénombrement des levures et moisissure

Ces champignons sont capables de se développer en milieu acide et au froid. Ils provoquent des défauts de fabrication qui se traduisent par des altérations nutritionnelles et organoleptiques des produits (Bourgeois et Leveau, 1980).

❖ Principe

Le milieu utilisé doit inhiber la croissance de toutes les bactéries, il doit renfermer donc une substance inhibitrice de leur développement (antibiotique) la substance choisie est donc l'oxytétracycline pour OGA et le chloramphénicol pour Sabouraud (SBA) (Guiraud, 1998).

❖ Mode opératoire

À partir de la dilution décimale 10^{-1} , ensemencer aseptiquement 0.1ml dans une boîte de pétrie contenant de la gélose Sabouraud. Étaler cette suspension à l'aide d'un râtelier stérile, Puis incuber à 25°C pendant 3 à 5 jours (Figure 15)

❖ Lecture

Les colonies de levures ressemblent à celles des bactéries mais plus grandes, elles sont brillantes, rondes, bombées et de couleurs différentes, alors que celles des moisissures, ont un aspect velouté, de couleur blanche ou pigmentée de tailles plus grandes que les précédentes. Les résultats sont exprimés en nombre de germe par ml ou gramme de produit

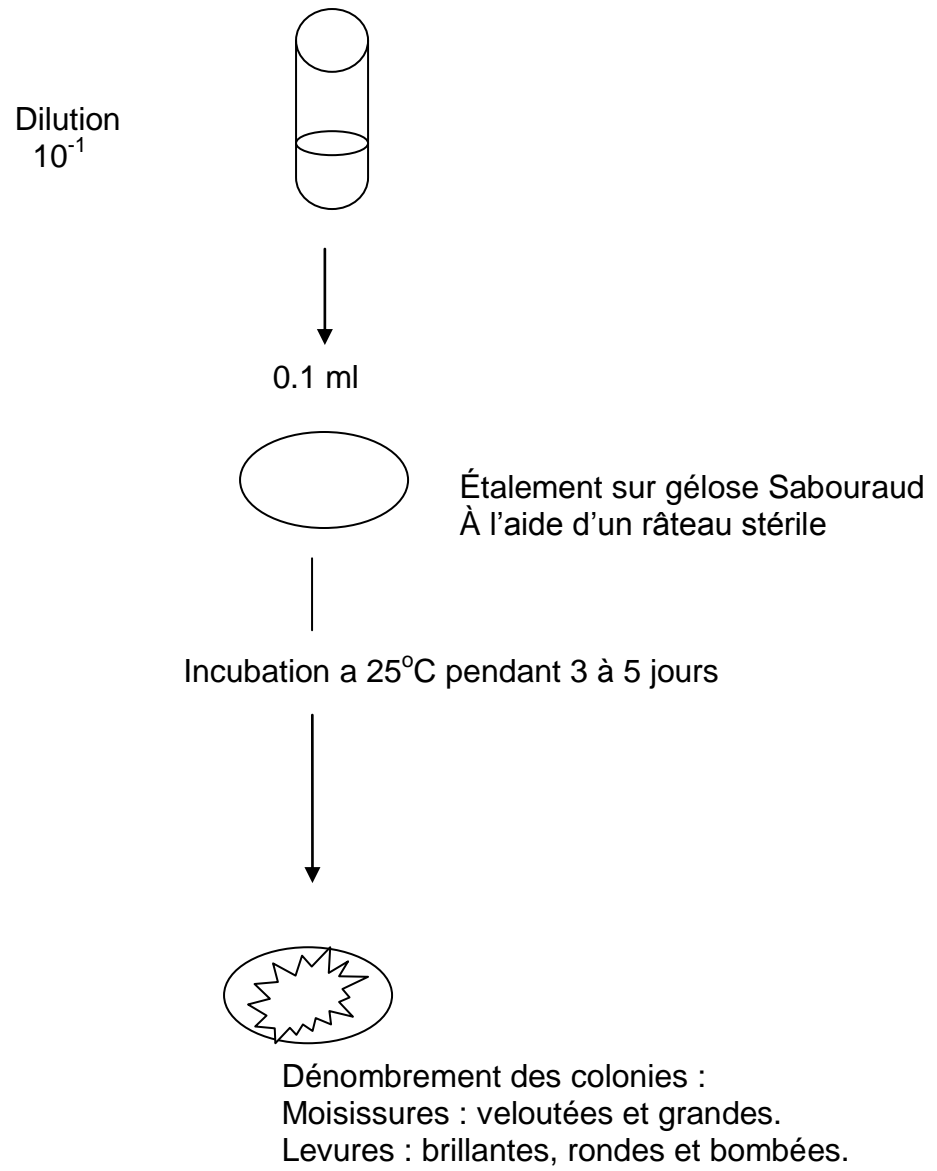


Figure 15: Recherche et dénombrement des levures et moisissures

II- Contrôle de la pureté de la souche de spiruline

En vue d'analyses microbiologiques, le matériel doit être parfaitement propre, stérile et sec au moment de son utilisation. Le prélèvement doit se faire de manière aseptique et le récipient pour échantillon doit être fermé immédiatement après échantillonnage (norme internationale ISO 07.100.30).

II-1. Présentation des analyses

Nous avons effectué des analyses pour le Contrôle de la pureté de la souche de spiruline afin d'apprécier ses caractéristiques et qui se résume en ce qui suit :

II-2. Méthodes d'analyses

II-2.1. Coloration de Gram

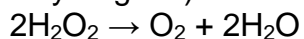
La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme. L'opération effectuée sur la souche de spiruline de provenance de France suit les étapes suivantes:

- En premier lieu procéder à la fixation de la cyanobactérie en la plongeant en contact avec de l'alcool pendant quelques secondes puis la sécher avec le bec benzène.
- Mettre une goutte contenant l'algue à identifier dans une lame stérile et l'imprégner avec le violet de Gentiane entre 30 secondes à 1 minute puis rincer avec l'eau.
- Ajouter quelques gouttes de Lugol pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer avec de l'alcool.
- Ajouter de la fuschine pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer avec de l'eau.
- Laisser sécher la lame puis mettre une goutte de vaseline sur la lame et faire la lecture sous l'objectif 100.

Lecture des résultats : les bactéries Gram + apparaissent en bleu noir et les Gram – apparaissent en rouge.

II-2.2. Teste catalase

La catalase est un enzyme catalysant la dite mutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène):



Cet enzyme est utilisé en bactériologie systématique pour l'identification des bactéries. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée . Une effervescence (due à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase.

❖ Technique

- Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H_2O_2 , puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur ou une anse plastique à usage unique. Il ne faut pas utiliser une anse en métal car elle serait alors oxydante.
- Si formation de bulle, la bactérie possède la catalase.

Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

III-Analyse de la flore intestinale

Nous avons effectué des analyses bactériologiques des intestins des souris en aval de l'expérimentation pour analyser l'évolution du rapport *Bifidobacterium/Escherichia coli* après l'introduction de la spiruline pendant 20 jours dans l'alimentation des souris.

Le prélèvement des bactéries à partir du rectum des souris (figure 16) s'est déroulé dans les conditions d'asepsies avec un matériel stérile puis déposer dans un tube contenant de l'eau physiologique, pour former la dilution 10^{-1} .



Figure 16 : Photographie du prélèvement bactérien rectal (photographie originale)

L'inoculation des bactéries a été faite de la dilution mère, L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cystéiné à 37°C. Après 48 h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram (Tamime et al. 1995). La pureté des souches est contrôlée par la coloration de Gram, test de la catalase, test physiologique et test biochimique de la galerie API 20A.

La souche d'*Escherichia coli* est ensemencée en profondeur dans la gélose au désoxycholate à 1‰. Les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 44 °C. / 24 h, La pureté des souches est contrôlée le test biochimique de la galerie API 20 E.

IV- Détermination du Taux de glycémie après l'introduction de la spiruline dans l'alimentation des souris

Les prélèvements sanguins ont été effectués à partir des veines caudales des souris Balb/c, ensuite les gouttes de sang ont été déposés au niveau du lecteur de glycémie sur lequel sont indiquées les valeurs de la glycémie sanguine (figure 17).



Figure 17 : Photographie du lecteur de glycémie

V- Détermination de la formule numéraire sanguine

La formule numéraire sanguine est lue directement sur l'hématimètre (figure 18) et cela afin de mettre en évidence l'impact des différentes doses de la spiruline sur le taux des globules rouges, et des plaquettes sanguines, elle a été faite après 28 jours d'expérimentation.

Les prélèvements sanguins ont été effectués après sectionnement de la jugulaire des souris, le sang recueilli dans des tubes contenant des liquides anticoagulants que l'on dépose au niveau de l'hématimètre pour faire la lecture de la formule numéraire sanguine.



Figure 18 : Photographie d'un hématimètre (photographie originale)

VI- Dissection des souris

La dissection a été effectuée sur les souris du groupe D et les souris du groupe F afin de voir les différentes évolutions des viscères des cobayes témoins et expérimentaux (taille, forme, couleurs...).

Rajouter des photos originales

VII- analyse statistiques

L'analyse statistique est effectuée par le logiciel STATICF du département d'Agronomie de l'Université de Blida.

VII-1. Le principe de l'analyse de la variance

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

Puis en fonction de chaque dispositif expérimental, on procède à l'établissement de l'ANOVA par le calcul de:

- ✓ La moyenne générale
- ✓ SCE: La somme des carrés des écarts
- ✓ SCE_r : La somme des carrés des écarts résiduels
- ✓ $CM_{F_1}; CM_{F_2}$: Les carrés moyens factoriels
- ✓ CM_{F_1, F_2} : Les carrés moyens inter factoriels
- ✓ CM_R : Les carrés moyens résiduels
- ✓ $F_{obs} = F_{F_1} = \frac{CM_{F_1}}{CM_R}$; $F_{F_2} = \frac{CM_{F_2}}{CM_R}$; $F_I = \frac{CM_I}{CM_R}$
- ✓ Puis on résume tout dans un tableau appelé: tableau de l'analyse de la variance.

VII-2. Le plan expérimental

Le plan expérimental retenu pour évaluer et comparer l'influence des différentes doses de spiruline incorporées dans l'alimentation des souris Balb/c sur les paramètres suivant :

- Le gain de poids
- La glycémie sanguine
- Le taux des plaquettes rouges et des globules rouges
- La flore intestinale
- L'alimentation

CHAPITRE II: RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Résultats

I.1. Contrôle de la qualité physicochimique de l'aliment des souris (concentré)

Le tableau 5 regroupe les résultats des analyses physicochimiques effectuées sur l'aliment des souris et cela afin d'apprécier sa composition et son taux de recouvrement en ce qui concerne les besoins de nos cobayes.

Tableau 5 : Résultats des analyses de la qualité physicochimique de l'aliment des souris

Analyse	Résultats de l'analyse (%)	Norme de la méthode
Matières sèches	87,19	NA 1291- 1994
Matières minérales	4,69	NA 650- 1994
Protéines brutes	18,76	NA 652- 1994
Cellulose brute	4,76	NA 6138- 1994
Matières grasses	3,39	NA 654- 1994

NA : Normes Algériennes

D'après les résultats des analyses de l'aliment des souris et d'après le stade physiologique de nos cobayes qui sont en croissance nous remarquons que le concentré présente un apport adhérent à l'intervalle de leurs besoin en protéines et en matière grasse et un excédent en matière minérale qui est de 3 % ce qui pourrait induire un déséquilibre alimentaire.

I.2. Contrôle de la qualité bactériologique de la spiruline de provenance de France

Des analyses microbiologiques ont été effectuées sur la spiruline de provenance de France (figure 19) afin d'apprécier son innocuité. Le tableau 6 résume les résultats de ses analyses.

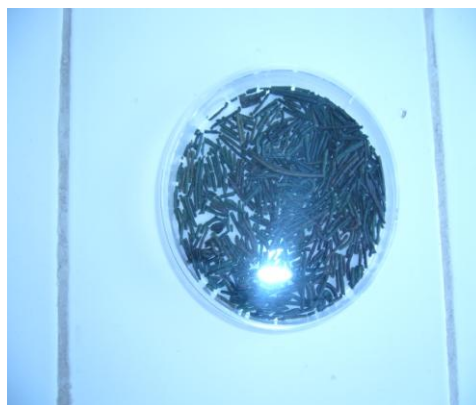


Figure 19 : Photographie de la spiruline (photographie originale)

Tableau 6: Résultats des analyses bactériologiques effectuées sur la souche de spiruline

Germes	Germes/mL de la spiruline de France (de la ferme SPIRU-VIE) en Hérault
Mésophiles totaux	A dilution 10^{-1} : indénombrable. A dilution 10^{-2} : 98 A dilution 10^{-3} : 19
Coliformes totaux	A dilution 10^{-1} : indénombrable. A dilution 10^{-2} : 17 A dilution 10^{-3} : 10
Coliformes fécaux	A dilution 10^{-1} : indénombrable. A dilution 10^{-2} : 10 A dilution 10^{-3} : 10
Staphylocoques dorés	Absence
Clostridium sulfito – réducteur	Présence
salmonelles	Absence
Streptocoques fécaux	Absence
Levures et moisissures	Absence

D'après les résultats obtenus:

- ✓ Tout d'abord, la présence des germes mésophiles et des coliformes sont dans l'intervalle de tolérance (selon J.O.R.A N°35,1998), mais nous notons la présence de *Clostridium* sulfito-réducteurs de façon indénombrable, dans ce cas la spiruline est d'une mauvaise qualité bactériologique, probablement dues aux conditions de conservations.
- ✓ Vu la présence de germes pathogènes dans la spiruline, et pour éviter un déséquilibre bactériologique au niveau des intestins des souris, il faut éliminer les spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs à l'aide d'un traitement thermique (stérilisation à 120° pendant 10 minutes).

II- Confirmation de l'identification de la souche de spiruline et de bifidobactéries

II- 1. La coloration de Gram

En ce qui concerne la souche de spiruline, le test n'a donné de coloration violette, ce qui prouve que la souche de spiruline est une cyanobactérie à Gram négatif (figure 20), Ces résultats confirment les travaux de Lindblad et *al.* (1998), concernant les colonies bactériennes qui sont colorées en violet et d'après les formes des colonies en Y et en V ce qui prouve que notre souche isolée est bien une bifidobactérie à Gram positive (figure 21).



Figure 20: Photographie d'une spirale de spiruline après coloration De Gram (photographie originale)

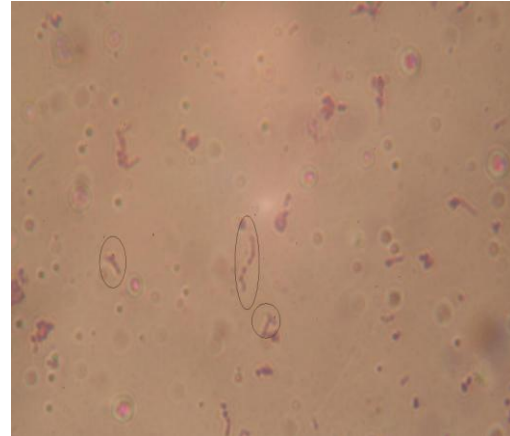


Figure 21: Photographie d'une colonie de *Bifidobacterium* après coloration De Gram (photographie originale)

II- 2. Le test catalase

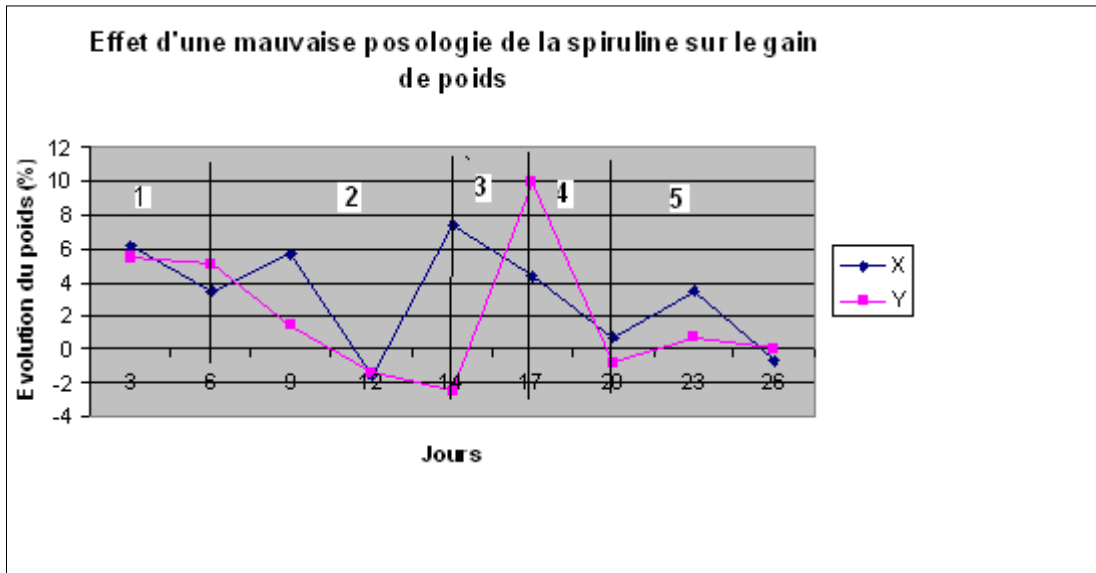
Le test catalase effectué sur la spiruline s'est révélé négatif, car il n'y a pas eu d'effervescence dans la colonie lors de son contact avec l'eau oxygénée donc il n'y a pas eu de dégagement gazeux (du dioxygène) ainsi la bactérie ne catalyse pas le H₂O₂.

III- Evolution du poids des souris après prise d'une ration alimentaire standard seule ou enrichie avec la spiruline

Dans ce qui va suivre, nous allons observer les multiples influences de cette algue sur l'évolution du poids des souris, après l'incorporation de la spiruline à différentes concentrations dans l'alimentation des cobayes.

III- 1. Effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur le gain de poids

De par sa richesse en protéine, la spiruline est un aliment à consommer avec modération, et ne doit pas dépasser les besoins du consommateur, les figures 22 et 23 illustrent respectivement les effets d'une surconsommation de la spiruline sur le gain de poids et sur l'alimentation des sujets.



X : Souris souffrent de malnutrition grave (lot témoin)

Y : Souris souffrent de malnutrition grave (lot expérimental ayant reçu 800 mg de spiruline/L d'eau)

Figure 22: Effet d'une surconsommation de la spiruline sur le gain de poids

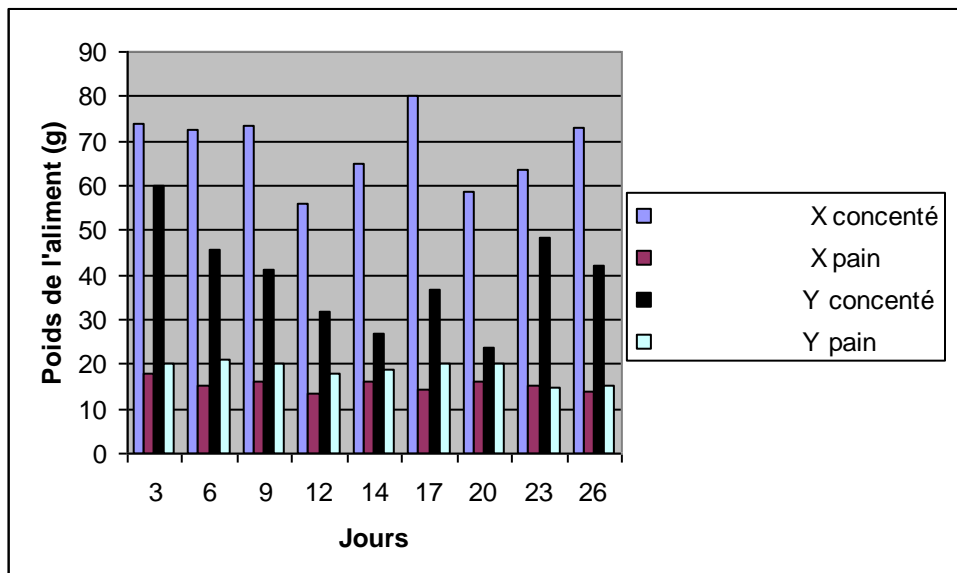


Figure 23: Effet d'un mauvais dosage de la spiruline sur l'alimentation des souris

Les résultats de la cinétique du gain de poids des groupes x et y suivis chaque trois jours et durant 26 jours, montrent que le gain de poids des souris suit en général la même cinétique.

La cinétique du gain de poids des sujets n'ayant pas reçu la spiruline dans leur alimentation est supérieure à celle des souris l'ayant reçu (800 mg de spiruline/L d'eau).

La cinétique du gain de poids du groupe peut être divisée en cinq parties:

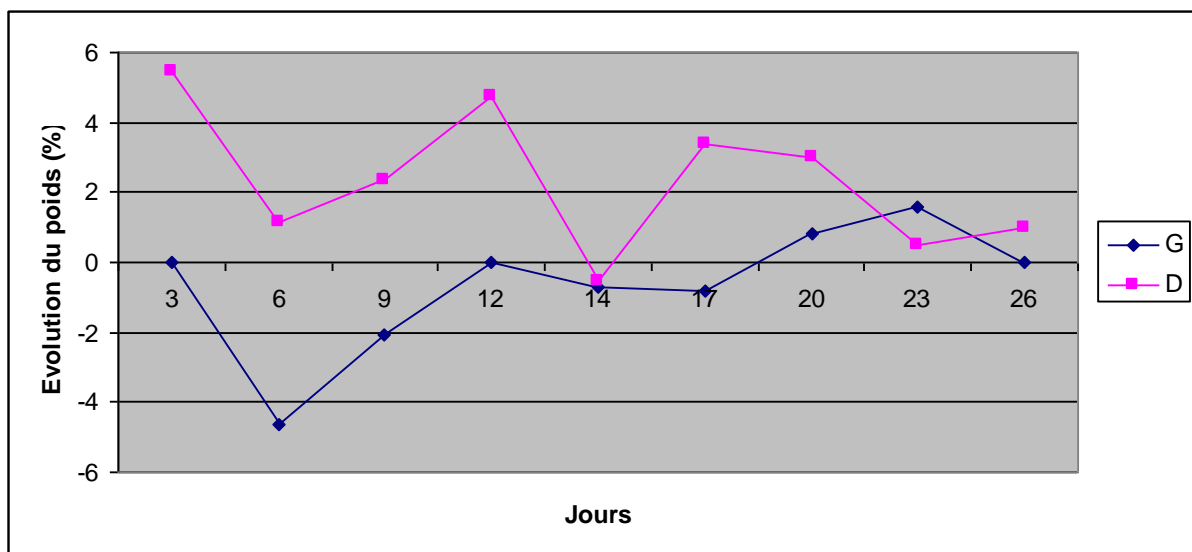
- De trois à 6 jours nous remarquons que le gain de poids à cette période est élevé par rapport à celui du groupe x.
- La deuxième partie de 6 à 14 jours nous remarquons une diminution progressive du poids.
- Du jour 14 au 17^{ème} jour nous remarquons une forte augmentation du gain de poids en seulement 3 jours et qui est de l'ordre de 12 %.
- Du 17 au 20^{ème} jour nous remarquons une forte diminution du poids qui tend vers le négatif en seulement 3 jours.
- De 20 à 26 nous remarquons une légère augmentation du gain de poids qui est de l'ordre de 0,75 %, puis une stabilité jusqu'au 26^{ème} jour.

Nous remarquons aussi dans la figure 23 l'histogramme des doses moyennes du concentré et du pain consommés chaque 3 jours par les groupes X et Y, ainsi nous observons que les souris du lot X consomment environ une moyenne de 40% plus de concentré que le groupe Y et 20% moins de pain comparé au groupe Y.

Nous remarquons aussi entre le 14 et 17^{ème} jours une augmentation d'environ 11 g de concentré par jour et 0,75 g de pain pour une augmentation d'environ 12,31 % du gain de poids pour ces trois jours pour le groupe Y, alors que pour environ la même proportion de concentré et de pain supplémentaire dans l'alimentation du groupe X nous avons une augmentation du gain de poids de seulement 9 % entre le 12^{ème} et 14^{ème} jours, nous pouvons donc supposer que la spiruline est responsable de la diminution de l'appétence du groupe Y et elle contribue dans le gain de poids de ce dernier .

III- 2. Effet de la spiruline sur l'évolution du poids

Les figures 24 et 25 qui suivent montrent respectivement les effets de la spiruline sur la diminution du gain de poids et sur l'alimentation des souris.



D : Lot témoin

G : Lot expérimental (ayant reçu 40 mg de spiruline dans /L d'eau)

Figure 24: Effet de la spiruline dans diminution de la prise de poids

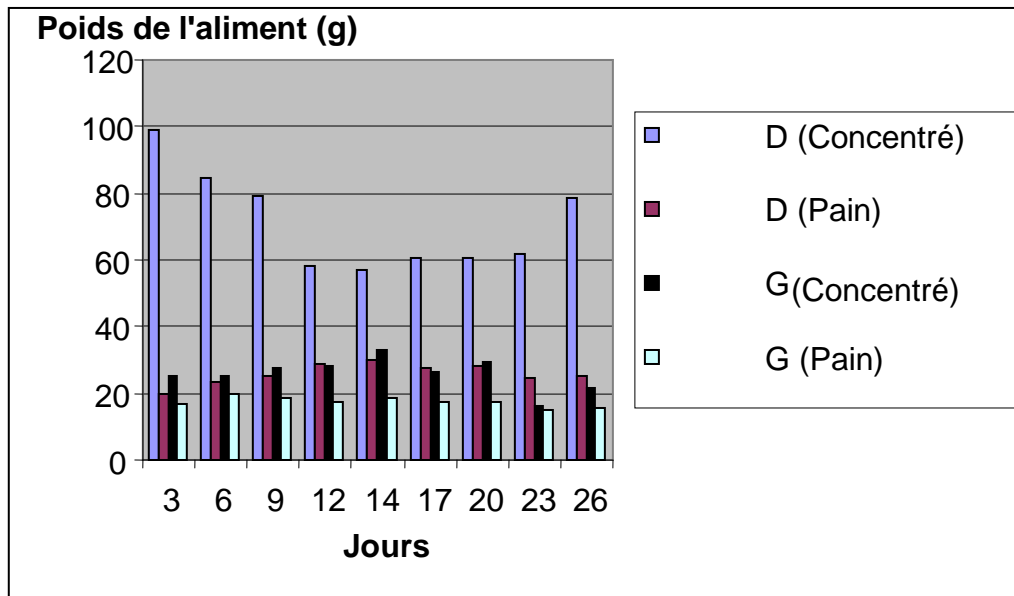


Figure 25: Effet d'un mauvais dosage de la spiruline sur l'alimentation des souris

La figure 24 montre la cinétique du groupe témoin (D) et le groupe (G) expérimentale ayant reçu 40 mg/l de spiruline dans son eau d'abreuvement. Les deux courbes suivent la même cinétique (avec un gain de poids élevé pour le groupe D) sauf en trois parties :

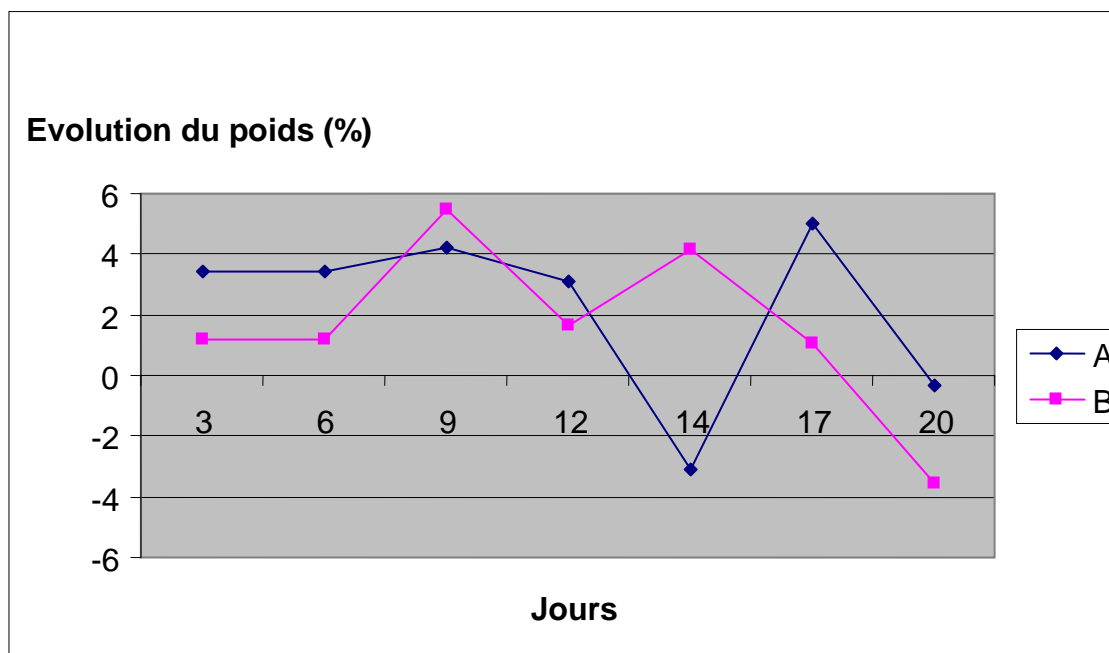
- De 12 au 17^{ème} jour ou nous remarquons une légère diminution du gain de poids des sujets qui a mené à une perte de poids des sujets du groupe G qui est de l'ordre de 1,52 %.
- De 17 au 23^{ème} jour nous remarquons une augmentation progressive du gain de poids des sujets qui est de l'ordre de 3,19 %.
- De 23 au 26^{ème} jour nous remarquons une rechute du gain de poids des souris qui est de l'ordre de 0 %.

Nous remarquons aussi dans la figure 25 l'histogramme des doses moyennes du concentré et du pain consommés chaque 3 jours par les groupes D et G, ainsi nous observons que les souris du lot D consomment environ une moyenne de 35% plus de concentré que le groupe G et 10% moins de pain comparé au groupe G.

Nous remarquons aussi entre le 20 et 23^{ème} jours une diminution d'environ 2,5 g de concentré par jour et une diminution d'environ 0,3 g de pain pour une augmentation de 2,38 % du gain de poids pour ces trois jours pour le groupe G, alors que pour environ la même proportion de concentré et de pain supplémentaire consommée par le groupe D nous avons une augmentation du gain de poids de seulement 1,47 % entre le 23 et 26^{ème} jours, nous pouvons donc conclure que la spiruline est responsable de la diminution de l'appétence du groupe G et elle contribue fortement dans le gain de poids de ce dernier .

III- 3. Effet de la spiruline dans la prévention des déséquilibres alimentaires

La figure 26 montre l'évolution du gain de poids de deux groupes le A témoin et le B dont la spiruline est incorporée dans son alimentation, tous deux souffrant d'un déséquilibre alimentaire.



A : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot témoin)

B : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot expérimental ayant reçu 80 mg de spiruline/L d'eau)

Figure 26: Influence de la spiruline dans la prévention des déséquilibres alimentaires

La figure 26 montre la cinétique du gain de poids du groupe témoin (A) et le groupe (B) expérimental ayant reçu 80 mg/l de spiruline dans son eau d'abreuvement.

La courbe A indique un fort ralentissement du gain de poids (soit -6,14%) pour finalement chuter et atteindre -3,07% entre le 12^{ème} et 14^{ème} jour, nous remarquons aussi une forte fluctuation de la cinétique du gain de poids en comparant avec la deuxième courbe (B) où nous avons une forte perte de vitesse (-1,55%/ jours entre le 14^{ème} et le 20^{ème} jours) du gain de poids de 7,73 % (vers le 18^{ème} jour elle tend vers le négatif (-3,58%)) et une faible fluctuation de la cinétique du gain de poids.

Nous pouvons supposer que la spiruline est responsable de l'atténuation des variations du gain de poids des souris.

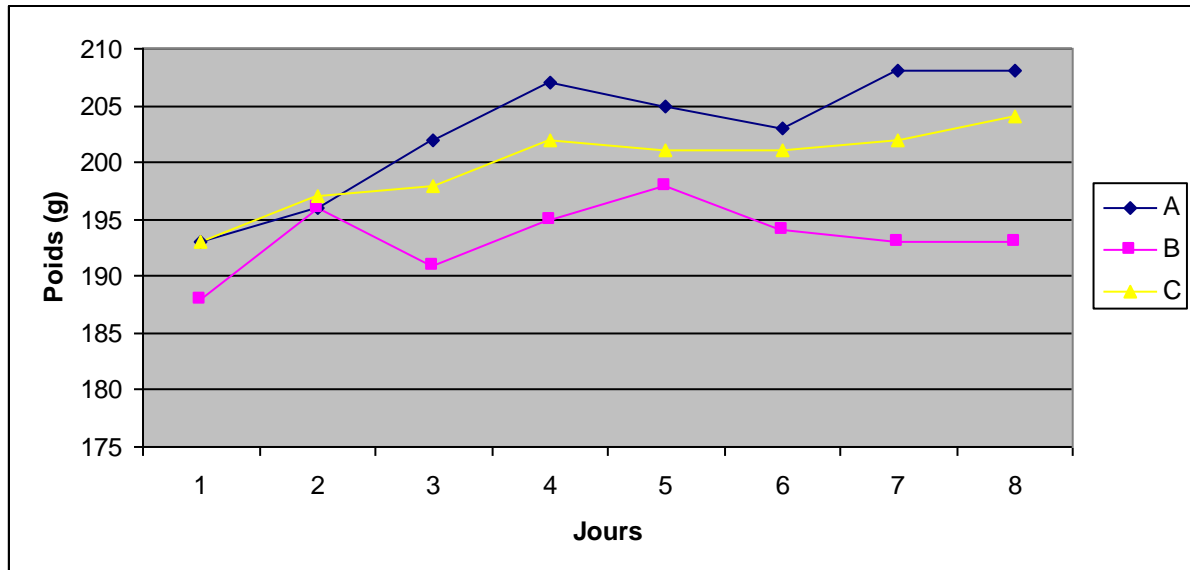
D'après les résultats obtenus nous remarquons que la spiruline incorporée dans l'alimentation des souris, influence sur physiologie de ces dernières.

Nous avons remarqué dans les figures 22, 24 et 26, que la cinétique d'évolution du poids des souris ayant consommées de la spiruline est plus faible que celle des groupes témoins. Ceci peut s'expliquer par la baisse de l'appétence des groupes qui consomment cette micro-algue. Les figures 23 et 25 illustrent l'évolution

du poids selon le type du régime alimentaire. Ainsi la faible consommation en concentré des groupes expérimentaux peut s'expliquer par le taux importants en protéines et en phénylalanine (de la spiruline), qui régularaient l'appétit selon Charpy et al. (2008), ceci a entraîné la chute du poids de ces souris.

III- 4. Effet de la spiruline dans la correction des déséquilibres alimentaires

L'impact de la spiruline dans la correction des déséquilibres alimentaire est mis en exergue dans la figure 27.



A : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot expérimental ayant reçu 80 mg de spiruline/L d'eau)

B : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot expérimental ayant reçu 80 mg de spiruline/L d'eau pendant 20 jours avant l'expérimentation)

C : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot témoin)

Figure 27: Effet de la spiruline dans la correction des déséquilibres alimentaires

Chaque jour nous avons suivi le gain de poids des groupes A, B et C, après 8 jours nous remarquons que le gain de poids a atteint les valeurs suivantes :

- 208 g pour le groupe A ayant reçu 80 mg/L de spiruline après l'induction du déséquilibre alimentaire.
- 193 g pour le groupe B ayant reçu 80 mg/L de spiruline Pendant et après l'induction du déséquilibre alimentaire.
- 204 g pour le groupe C n'ayant pas reçu spiruline dans son alimentation.

Le plus haut poids atteint (208g) est celui du groupe A ayant reçu la spiruline qu'après l'induction du déséquilibre alimentaire.nos résultats peuvent être expliqués comme suit :

La spiruline prise en quantité adéquate au niveau du groupe A apporte les protéines en quantité nécessaire pour une croissance normale et favorise la prise de poids. Contrairement au groupe B qui a reçu de la spiruline pendant l'induction du déséquilibre alimentaire ce qui a atténué la carence en protéines, et après la régulation de l'alimentation les carences ont très vite disparues. Ceci peut être

expliqué par le fait que l'excès en phénylalanine a fini par réguler l'appétit et favoriser la diminution du gain de poids.

La figure 27 illustre le suivi du gain en poids des groupes A, B et C, après 8 jours d'expérimentation *in vivo*, nous remarquons que leur gain de poids a atteint les valeurs suivantes:

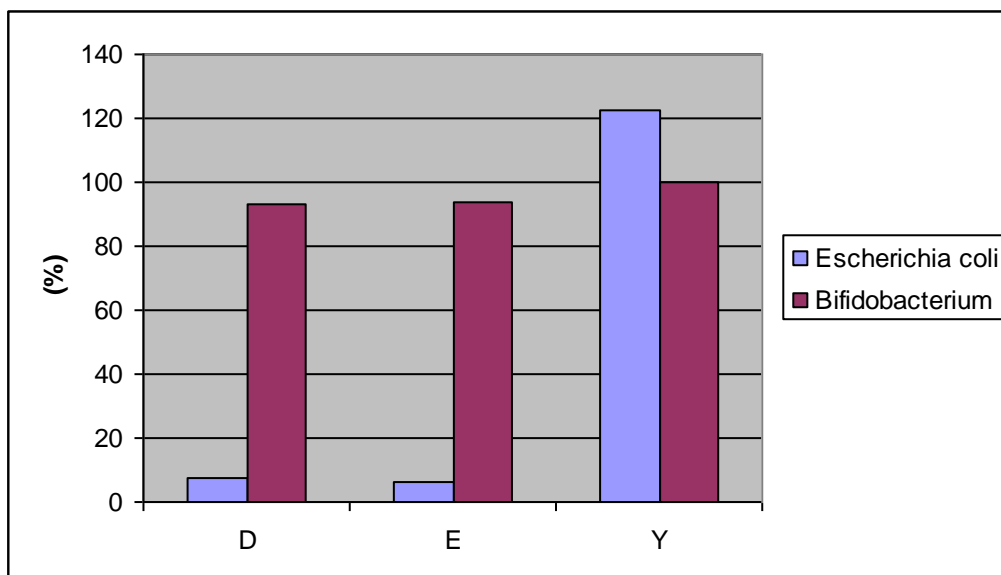
- 208 g pour le groupe A ayant reçu 40 mg/l de spiruline après l'induction du déséquilibre alimentaire.
- 193 g pour le groupe B ayant reçu 40 mg/l de spiruline Pendant et après l'induction du déséquilibre alimentaire.
- 204 g pour le groupe C n'ayant pas reçu spiruline dans l'alimentation.

Le plus haut poids atteint est de 208g obtenu chez le groupe A ayant reçu la spiruline qu'après l'induction du déséquilibre alimentaire. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la spiruline prise en quantité adéquate est source de quantités de protéines suffisante et favorise la prise de poids contrairement au groupe B qui a reçu de la spiruline pendant l'induction du déséquilibre alimentaire ce qui a atténué la carence en protéines, et après la régulation de l'alimentation les carences ont très vite disparues. L'excès en phénylalanine a fini par réguler l'appétit et favoriser la diminution du gain de poids (Charpy et al., 2008).

IV – Influence de la spiruline dans la modification du rapport *Escherichia coli*/*Bifidobacterium* intestinal

La spiruline a un impact sur la flore intestinale notamment sur les *Bifidobacterium*, elle peut donc être utilisée comme prébiotique selon les travaux de Bouzar et Benamirouche (2009).

La figure 28 met en évidence l'influence de la spiruline sur le rapport *Escherichia coli*/*Bifidobacterium* intestinal.



D : Lot témoin

E : Lot expérimental (ayant reçu 80 mg de spiruline dans /L d'eau)

Y : Lot expérimental (ayant reçu 800 mg de spiruline dans /L d'eau)

Figure 28: Influence de la spiruline dans la modification du nombre des *Escherichia coli* et *Bifidobacterium* intestinale

L'histogramme du groupe E ayant reçu 80 mg/L de spiruline dans son alimentation montre une augmentation du rapport *Escherichia coli/Bifidobacterium coli* en comparaison avec l'histogramme du groupe D (témoin) n'ayant pas reçu de spiruline dans son alimentation. Des études sont toujours en cours sur la spiruline et il semblerait également que celle-ci agisse favorablement sur la flore intestinale, stimulant le développement de la flore bifide et des lactobacilles. La spiruline empêcherait ainsi la croissance pathologique d'*Escherichia coli* et *Candida albicans* (Christophe, 2011).

L'histogramme du groupe Y ayant reçu une dose de spiruline de 800 mg/L montre une augmentation du rapport *Escherichia coli/Bifidobacterium*. Ce dernier est de l'ordre de 6/5 en comparaison avec l'histogramme du groupe D (témoin) qui est de l'ordre de 0,4/5, et étant dans un mauvais état sanitaire montrent une forte augmentation du rapport *Escherichia coli/Bifidobacterium* en comparaison avec l'histogramme du groupe D (témoin) et cela peut s'expliquer par le fait que *Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie opportuniste, qui s'avère le plus souvent sans danger grave pour les personnes en bonne santé, mais qui peut générer des problèmes sérieux à celles dont le système immunitaire est affaibli. La bactérie *E. coli* se trouve normalement dans les excréments des humains et des animaux à sang chaud et fait partie du groupe de bactéries dites « coliformes » qui peuvent causer divers types d'infections intestinales (Phaneuf, 2009).

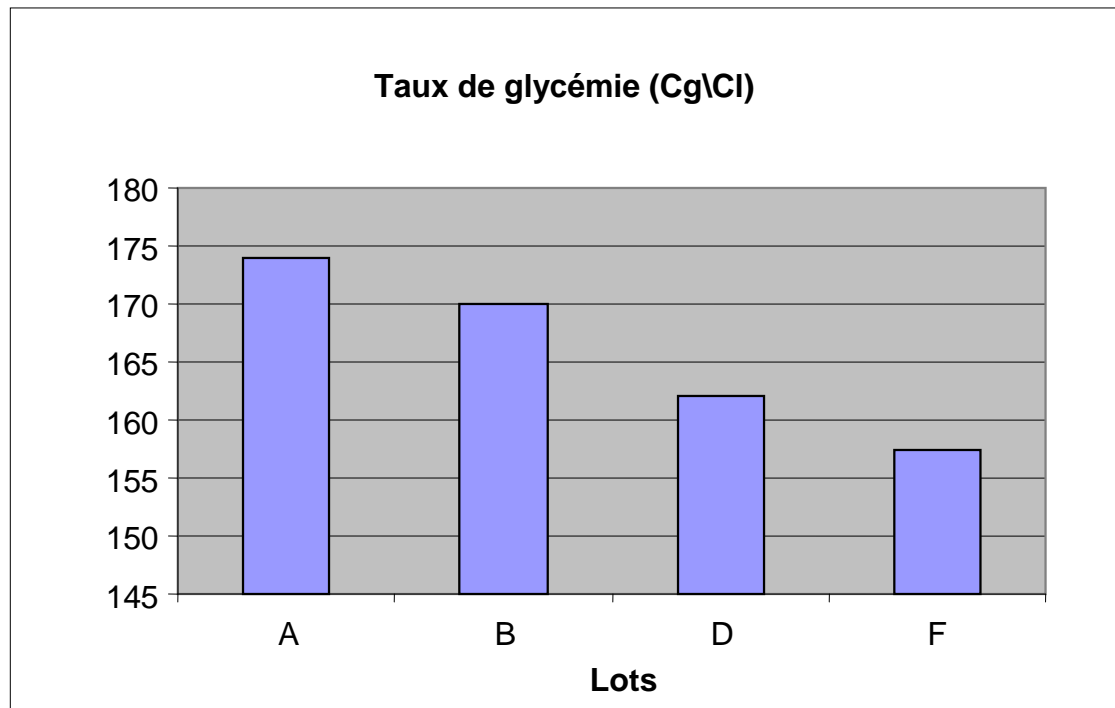
La spiruline est la source végétale la plus fertile et la plus connue pour son taux de protéines de 60 à 70 % et ses Acides Aminés essentiels de 47%. Qui sont toutes assimilables.

Aussi nous remarquons que le groupe E ayant reçu 80 mg de spiruline /L d'eau présente une diminution du rapport *Escherichia coli/Bifidobacterium* qui est de l'ordre de 0,3/5 en le comparant au groupe D (témoin) qui est de l'ordre de 0,4/5.

On peut supposer que la spiruline à une dose adéquate favorise le développement des *Bifidobacterium* au détriment d'*Escherichia coli* (Bouzar et Benamirouche, 2009). Par contre la prise de spiruline à une dose élevée inverse ce rapport, ce qui devient néfaste pour la santé du consommateur.

V- Détermination du Taux de glycémie après l'introduction de la spiruline dans l'alimentation des souris

Parmi les vertus de la spiruline nous avons la diminution du diabète chez l'homme (Parikh et al., 2001), la figure 29 exprime l'influence de la spiruline sur la glycémie des souris.



A : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot témoin)

B : Souris ayant un déséquilibre alimentaire (lot expérimental ayant reçu 80 mg de spiruline/L d'eau)

D : Lot témoin

F : Lot expérimental (ayant reçu plus de 12 g de spiruline dans /L d'eau)

Figure 29: Influence de la spiruline sur la glycémie chez les souris

L'histogramme du groupe F (figure 29) ayant reçu 12 g/l de spiruline dans l'alimentation montre une valeur de glycémie sanguine de 157,5 cg/cl, cette dernière est plus faible que celle du groupe D (témoin) n'ayant pas reçu de spiruline dans l'alimentation et qui est de l'ordre de 162 cg/cl.

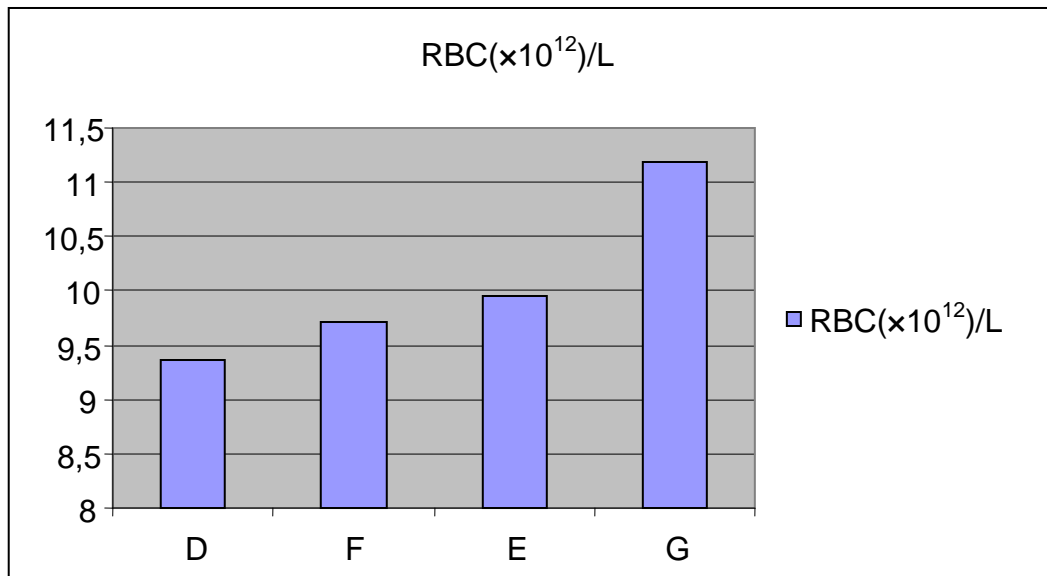
Ainsi les deux histogrammes des groupes A et B ayant reçu un régime hyper glucidique avec un supplément de 80 mg/ de spiruline pour le groupe B montrent une faible valeur de glycémie sanguine pour le groupe B (ayant reçu la spiruline) qui est de l'ordre de 170 cg/cl, par rapport au groupe A (témoin) n'ayant pas reçu de spiruline dans l'alimentation, et qui est de l'ordre de 174 cg/cl.

Le diabète résulte de troubles au niveau des taux sanguins d'insuline - hormone pancréatique qui permet de transformer le sucre présent dans le sang en énergie. Le diabète type 1 survient à un âge jeune résulte d'un manque d'insuline. Le diabète type 2 dit non insulino-dépendant survenant à l'âge adulte résulte de l'incapacité de l'organisme à fabriquer l'hormone de manière efficace (Capet et al., 1999). C'est le type le plus répandu. Il a été prouvé que la spiruline agit sur ce type de diabète en réduisant le taux sanguin de sucre et de cholestérol. L'ingestion quotidienne de spiruline est recommandée pour le contrôle du taux glycolipidique chez les diabétiques (Mani et al., 1996) et d'après Taka et al. (1991), la fraction soluble de spiruline dans l'eau a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum. Par ailleurs, Becker et al. (1986) ont montré qu'un complément alimentaire à base de spiruline de 2,8 g pris 3 fois par jour pendant 4 semaines entraînait une

réduction du poids corporel chez les obèses. Iwate et *al.* (1990) ont remarqué une suppression de l'hypertension chez les rats, suite à un apport en spiruline. On peut supposer que la spiruline diminue le taux de glycémie sanguine. Elle participe à la diminution du diabète chez l'homme (Parikh et *al.* 2001)

VI - Détermination du taux des globules rouges et des plaquettes sanguines

Les figures 30 et 31 montrent l'influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline sur le taux des globules rouges et des plaquettes sanguines chez les souris.



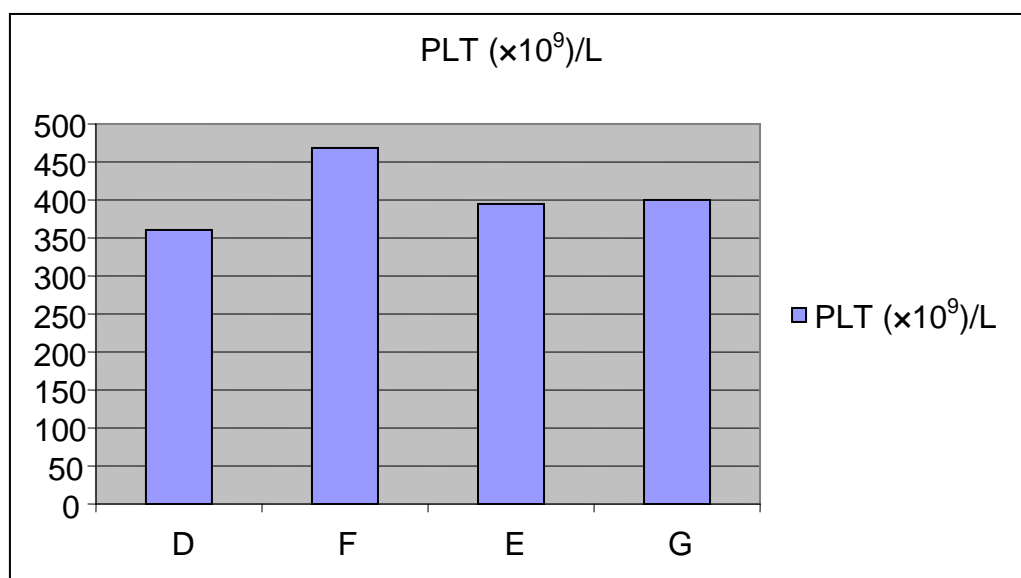
D : Lot témoin

F : Lot expérimental (ayant reçu plus de 12 g de spiruline dans /L d'eau)

E : Lot expérimental (ayant reçu 80 mg de spiruline dans /L d'eau)

G : Lot expérimental (ayant reçu 40 mg de spiruline dans /L d'eau)

Figure 30: Influence de la spiruline sur le taux des globules rouges chez les souris



D : Lot témoin

F : Lot expérimental (ayant reçu plus de 12 g de spiruline dans /L d'eau)

E : Lot expérimental (ayant reçu 80 mg de spiruline dans /L d'eau)

G : Lot expérimental (ayant reçu 40 mg de spiruline dans /L d'eau)

Figure 31: Influence de la spiruline sur le taux des plaquettes sanguines chez les souris

Remarque : au cours de notre expérimentation nous avons remarqués que les souris du groupes F et des souris d'autre groupe présenté des signes d'infections cutanés et dont on savais les causes de ses derniers.

De par la très forte teneur en fer de la spiruline cultivée (550-6000 mg/kg), sa richesse en fer est à souligner doublement du fait que les carences en fer très répandues (anémies ferriprives), Dans le cas de cette dernière, la biodisponibilité élevée du fer a été démontrée tant chez le rat (Johnson, 1986; Kapoor, 1993) que chez l'homme (Puyfoulhoux, 2001), ainsi les figures 30 et 31 illustrant les histogrammes des groupes F,E et G (ayant reçu la spiruline dans leur alimentation) indique des valeurs plus élevées en globules rouge et en plaquettes sanguine comparé à celui du groupe D n'ayant pas reçu de spiruline dans son alimentation, aussi la présence de la phycocyanine dans la spiruline stimule de la production de sang(Colloque international sur la spiruline, 2008).

On peut supposer que la spiruline augmente le taux des hématies et des plaquettes sanguines chez les souris qui en consomment.

VII- Dissection des souris

La dissection des souris a été effectuée sur le groupe D (témoin) et le groupe F ayant reçu un excès de spiruline dans son alimentation (figures 32 et 33).



Figure 32: Photographie de la dissection des souris et la mise en évidence de leurs reins (photographie originale)

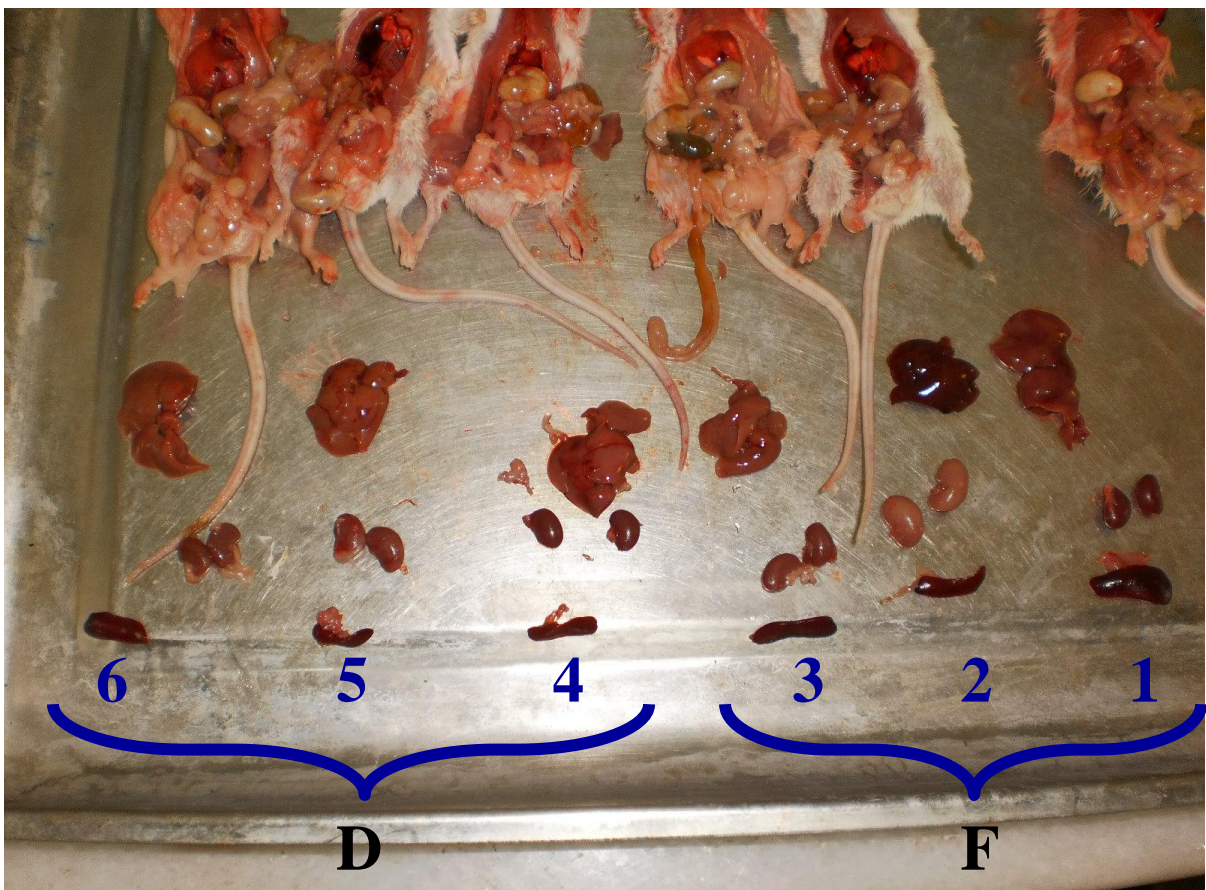


Figure 33: Photographie de la dissection des souris et la mise en évidence de leurs reins, foies et pancréas (photographie originale)

La figure 33 met en évidence l'aspect anatomique (taille et couleur) des reins, foies et pancréas des souris (les trois souris à droite sont celles du groupe F les autres sont celles du groupe D).

Nous remarquons que la couleur des reins de la souris 1 est plus vive que celle du groupe D et la taille des reins de la souris 2 est supérieure à ceux du groupe D, signe d'une plus grande activité rénale qui pourrait être expliqué par l'augmentation de l'acide urique dans le sang et une forte concentration protéique sanguine.

Nous remarquons aussi que les foies des souris 1 et 2 sont d'une couleur plus vive que ceux des souris du groupe D ce qui pourrait être expliqué par le fait que la spiruline agit sur les souris en réduisant leur taux de sucre dans le sang, qui a induit à une forte glycogénèse du foie, car la spiruline permet la diminution du diabète chez l'homme (Parikh et *al.*, 2001).

Aussi nous remarquons que la taille des pancréas des souris du groupe F est plus conséquente que celle du groupe D, ce qui pourrait être expliqué par une forte production du suc pancréatique contenant des protéases et peptidases pour la dégradation des protéines de la spiruline.

Une étude américaine récente, puisqu'elle n'a été publiée que le 19 février 2002, explicite le rôle antioxydant joué par l'acétyl-L-carnitine et l'acide alpha-lipoïque au niveau de la mitochondrie, ce qui se manifeste par une baisse marquée des symptômes liés à l'âge, sur une population d'animaux vieillissants :

- protection des cellules cérébrales,
- amélioration de la mémoire et de l'audition,
- augmentation du niveau d'acides nucléiques dans les tissus.

Nous ne résistons pas au plaisir de citer le commentaire du Docteur Ames lui-même : « Avec ces deux suppléments ensemble, les rats âgés se sont levés et ont dansé la Macarena » (Christophe, 2011).

Nous citons ces travaux pour bien démontrer que la spiruline, bien que dépourvue d'acide alpha-lipoïque et d'acétyl-L-carnitine, n'en contient pas moins d'autres antioxydants à forte concentration, et qu'elle occupe une place de choix dans notre arsenal anti-âge (Christophe, 2011).

Une enquête a été menée au Burkina-Faso dans la province de Koudougou pour évaluer l'efficacité de la spiruline auprès d'enfants malnutris dont le Z-score pour l'âge était inférieur à 2 ans. Trois groupes ont été constitués par tirage au sort dans cinq centres: nutrition habituelle (groupe 1), nutrition habituelle + spiruline à la dose quotidienne de 5 g j⁻¹ (groupe 2), nutrition habituelle + spiruline + poissons (groupe 3). Cent quatre vingt deux enfants âgés de 3 mois à 3 ans ont été inclus ; six sont décédés (3,3 %) et 11 hospitalisés ont été exclus. Au total, l'étude a été menée sur 165 enfants pendant 3 mois. Les critères de jugement étaient l'évolution des indices taille/âge, poids pour la taille et les mesures correspondant en Z-score, à 60 j et 90 j. À l'inclusion, les enfants étaient âgés de 14,6 mois en moyenne avec un poids de 6,7 kg (soit -3,2 de Z-score poids/âge), une taille de 71,4 cm (-2,0 de Z-score taille/âge) et un poids pour la taille de -2,5 de Z-score. 9,4 % avaient des œdèmes. Au terme de l'étude, il n'y avait pas de différences observées entre les groupes pour la prise de poids, la prise de taille et la prise de poids pour la taille. En conclusion la spiruline à la dose de 5 g j⁻¹ n'apporte aucun bénéfice par rapport à la renutrition traditionnelle sur 90 j. De plus, elle est actuellement coûteuse et la lutte contre la malnutrition du jeune enfant ne repose pas sur un seul élément, mais sur une politique nationale ou locale fondée sur la formation, l'éducation, l'aide

économique et les soins avec des centres de renutrition et des traitements des infections (Branger et *al.*, 2003).

Aussi Une étude récente (Simpore et *al.*, 2006) a permis de comparer l'intérêt nutritionnel de régimes composés de Spiruline (*Spirulina platensis*) cultivée artificiellement au Burkina Faso, et/ou de Misola. (Le Misola est une mixture composée de millet (60%), de soja (20%), de cacahouète (10%), de sucre (9%) et de sel (1%).

Les travaux ont porté sur 550 enfants malnutris d'Ouagadougou, âgés de moins de 5 ans. 455 et atteints de marasme sévère, 57 de marasme à sévérité moyenne et 38 de kwashiorkor associé au marasme (forme mixte). Les enfants ont été divisés aléatoirement en 4 groupes (A, B, C, D) et chacun des groupes a reçu une ration alimentaire différente distribuée 4 fois par jour (6h30, 10h30, 14h30, 18h30), cela pendant 8 semaines. Le groupe D est constitué d'enfants exclusivement nourris de millet, fruits et légumes (nourriture traditionnelle) selon le souhait de leurs mères. Il constitue ainsi le groupe témoin. Le statut initial anthropométrique est sensiblement le même pour l'ensemble des groupes, à l'exception du HAZ pour le groupe B (-2,64)

Une amélioration du poids en fonction de la taille (WHZ) et de l'âge (WAH), est observée chez tous les enfants, particulièrement ceux du groupe C (62,90% pour le WHZ et 38% pour le WAZ), dont le régime alimentaire était constitué de Spiruline et de Misola. Le gain de poids quotidien des enfants est respectivement de 20g j-1, 25g j-1 et 34g j-1 pour les groupes A, B, et C contre seulement 15g j-1 pour le groupe D.

L'étude conclut que la spiruline additionnée à la nourriture traditionnelle ou additionnée au Misola sont de bons régimes alimentaires pour les enfants sévèrement malnutris. Le régime associant spiruline et Misola donne les meilleurs résultats car il associe le Misola avec un fort apport calorique (410 kcal/100g contre 13,84% avec 338 kcal/100g pour la Spiruline) et la Spiruline avec une grande richesse en protéine (57,10% dans l'étude contre 16% pour le Misola). Cette association donne 767±5 kcal.j-1 et 33,3±1,2 g.j-1 de protéine.

Dans le chapitre « Essais nutritionnels chez l'homme » de Falquet et Hurni (2006), des expériences positives de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline sont rapportées. Parmi celles-ci :

- l'expérience de nutrition infantile portant sur près de 600 enfants de Bangui (RCA) de 0-5 ans, avec un mélange 5g Spiruline+sardine (Dupire, 1998)
- l'expérience de Seshradi et *al.* (1993) montrant la disparition spectaculaire de la « tache de Bitot » après l'administration quotidienne à 5000 enfants en âge pré-scolaire, de 1g de Spiruline pendant 5 mois
- l'expérience de réhabilitation nutritionnelle comparative portant sur 84 enfants HIVpositifs et 86 HIV-négatifs (Simpore et *al.*,2005) montrant l'impact favorable de la Spiruline dans la nutrition d'enfants infectés par le virus du SIDA.

VIII -Analyses statistiques

Une étude statistique a été réalisée grâce au logiciel STATI CF sur l'effet de la spiruline sur les paramètres suivants :

- Le gain de poids
- Le taux de glycémie sanguine
- Le taux des globules rouges
- Le taux des plaquettes sanguines
- Le taux de *Bifidobacterium*
- Le taux d'*Escherichia coli*
- La ration alimentaire (quantité de concentré et de pain ingérées)

Le tableau 7 résume les Résultats des Analyses statistiques du facteur dose de spiruline ($D_0= 0$ mg de spiruline / L d'eau, $D_1= 80$ mg de spiruline / L d'eau, $D_2= 12$ g de spiruline / L d'eau) sur les différents paramètres cités si dessus.

NB : pour le paramètre glycémie sanguine et pour le groupe E nous avons supposé une valeur logique d'après la littérature scientifique et d'après notre expérimentation pour pouvoir effectuer l'étude statistique.

Tableau 7 : Résultats des Analyses statistiques du facteur dose de spiruline sur les différents paramètres physiologiques

Poids							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
2,33	0,52	0,93	0,0057	0,22	40,2	19,16	19,1
Glycémie sanguine							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
162	160	157,5	0,0002	0,16	370	19,161	0,1
Plaquettes sanguines							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
360	393,5	468,25	0,0000	0,42	36194	19,16	0,1
Globules rouges							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
9,37	9,96	9,75	0,7849	0,42	0,27	19,16	4,5
<i>Bifidobacterium</i> intestinal							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
92,95	93,88	83,56	0,0004	0,51	241,9	19,16	0,6
<i>Escherichia coli</i> intestinal							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
7,46	6,11	16,43	0,0000	0,20	1544	19,16	2,0
Consommation de concentré							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
68,32	43,32	24,36	0,0000	0,17	32438	19,16	0,4
Consommation de pain							
Doses			Probabilité	ET	F _{obs}	F _{th}	CV %
D ₀	D ₁	D ₂					
26,2	17,08	18,28	0,0000	0,12	2471	19,16	0,6

D'abord on lit les valeurs de F_{th} sur le tableau de Fisher-Snédecor (en annexe)

On a deux facteurs à étudier:

Facteur dose de spiruline incorporée dans l'alimentation des souris Balb/c sur différents paramètres physiologique (Le gain de poids, Le taux de glycémie sanguine, Le taux des globules rouges, Le taux des plaquettes sanguines, Le taux de *Bifidobacterium* intestinal, Le taux d'*Escherichia coli* intestinal, La ration alimentaire)

On remarque que F_{obs} des paramètres Plaquettes sanguines, *Escherichia coli* intestinal, Consommation de concentré, Consommation de pain se situ entre 1544 et 36194 et ce qui est $\gg \gg F_{th}$ (19,16), donc le facteur dose a un effet sur ces différents paramètres et que $P=0.000 < 0.001$ donc l'effet du facteur dose est très hautement significatif.

On remarque aussi que F_{obs} des paramètres Poids, Glycémie sanguine et de *Bifidobacterium* intestinal se situ entre 40,2 et 370 et ce qui est $> F_{th}$ (19,16), donc le facteur dose a un effet sur ces différents paramètres et que $P=0.0057 < 0.05$ donc l'effet du facteur dose est hautement significatif.

Il est mentionné dans le tableau que F_{obs} (0,27) des Globules rouges $> F_{th}$ (19,16), donc le facteur dose n'a pas d'effet sur les globules rouges et que $P=0,7849 > 0.05$ donc l'effet du facteur dose n'est pas significatif pour le paramètre des globule rouge et cela pourrait être dû au fait que le logiciel STATI CF avec lequel nous avons travaillé est dépassé et n'intègre pas plus de deux chiffres après la virgule et ne travaille pas avec la puissance (10^x).

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale et Perspectives

Le suivi nutritionnel a été réalisé sur neuf lots de souris Balb/c ceci dans le but pour d'étudier l'influence de l'ingestion de la spiruline à différentes doses et sur différents paramètres physiologiques et anatomiques.

Nous avons incorporé dans l'eau d'abreuvement des souris différentes doses de spiruline prévenant de France afin de mettre en exergue l'action de cette algue à différents concentrations.

Les souris ayant reçu une concentration de 80mg/l de spiruline ont eu une réponse rapide envers leur régime alimentaire se traduisant par un faible gain de poids, un faible taux de glycémie sanguine, un taux plus élevé du rapport de *Escherichia coli* / *Bifidobacterium* et un taux de globules rouges et de plaquettes sanguines plus élevé et cela en comparaison avec notre lot témoin.

Une concentration supérieure à 12 g/l de spiruline incorporer dans l'alimentation des souris semble être une surdose entraînant une hyper activité des fonctions rénale, hépatique et pancréatique qui pourrais entraîner avec le temps des complications physiologiques.

Un apport excessif de spiruline dans l'alimentation des souris peut ne pas avoir un effet correcteur de carences mais provoquer une dangereuse chute de poids et cela pourrait être dû à un excès en protéines et en phénylalanine qui diminue l'appétit des cobayes.

Un apport de spiruline dans l'alimentation des souris favorise la consommation d'aliment ayant un apport énergétique élevé. Et qui peut s'expliquer par un besoin élevé en énergie pour la digestion des multiples protéines apportées par la spiruline.

Les résultats obtenus au cours de cette recherche nous permettent d'être optimiste en ce qui concerne les nombreuses utilisations de cette algue comme complément alimentaire en quantité appropriée en vue d'optimiser son impact sur le comportement nutritionnel des consommateurs, et de couvrir les carences d'une éventuelle mal nutrition ou prévenir contre des maladies comme les maladies cardiovasculaire et cela dès un très jeune âge.

Nos perspectives et recommandations actuelles sont d'effectuer des recherches plus approfondies sur cette algue qui contient une multitude de vertus mais qui demeure encore mystérieuse sur plusieurs plans, ainsi son utilisation nous procure plusieurs avantages dont nous allons citer quelques uns :

- Utilisation d'un produit biologique.
- Minimisation de l'utilisation des produits de synthèses.
- Prévention au lieu de la guérison.
- Apport des nutriments naturels à moindre coût.
- L'équilibrer alimentaire.

Des études ultérieures pourraient évaluer la quantité adéquate de spiruline qui doit être ajoutée à l'alimentation des consommateurs afin d'optimiser ses bienfaits et de minimiser ses inconvénients sur le comportement nutritionnel en général. Ces mêmes études pourraient évaluer l'appétit de cette algue à se combiner à différents aliments notamment ceux qui jouent un rôle curatif ou préventif contre certain dérèglement physiologique comme par exemple le yaourt. Il serait intéressant d'utiliser la spiruline dans la lutte thérapeutique ou préventive vis-à-vis des maladies d'origine alimentaire et autres.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- AFAA (Association française pour l'algologie appliquée), 1982**-Actes du premier symposium sur la spiruline *Spirulina Platensis* (Gom.) Geitler de l'AFAA.
- Alam M., Midvedt T., Uribe A.1994** - Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats.Scand. J. Gastroenterol, 29 : 445-451 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Allen A.M., Gerrity L.W., Knapka J.J. et al. 1996** - *Laboratory Animal Management, Rodents*. 1st ed. Washington, D.C.: National Academy Press,180p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Allmann-Iselin I. Husbandry. 2000** In : KRINKE GJ, editor. *The Laboratory Rat*. 1st ed. London : Academic Press, 45-55 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Antenna Technologies. 2007**- Malnutrition. Spiruline : quelques bases scientifiques in <http://www.antenna.ch/documents/biologie.pdf>
- Backhed F, Ding H, Wang T, et al. 2004** - The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 : 15718-23 in Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *MEDECINE/SCIENCES* ,24 : 505-10.
- Bäckhed F., Ding H., Wang T. et al. 2004** - The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 101, 15718-15723 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.F., Peterson D.A., Gordon J.I. 2005** - Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307 : 1915-1920 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- BAker DE. 1979** - Reproduction and breeding. In : BAKER HJ, LINDSEY JR, WEISBROTH SH, editors. *The Laboratory Rat, Volume I, Biology and diseases*.1st ed. New York : Academic Press, 153-166 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.

- Baldwin R.L., Bayne K.A., Clarl J.D., et al. 1996** - *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 1st ed. Washington, D.C. : National Academy Press, 140 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Barthold SW, Kohn DF. 1984** - Biology and Diseases of Rats. *In : Laboratory Animal Medicine*. 1st ed. : Academic Press, 91-120 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Beaudoin AR. 1980** - Embryology and teratology. *In : BAKER HJ, LINDSEY JR WEISBROTH SH, editors. The Laboratory Rat, Volume II Research applications*. 1st ed. New York : Academic Press, 75-90 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerdc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Belay A., 1997**-Mass culture of *Spirulina platensis* - The Earthrise farms Experience In "Spirulina platensis (Arthrospira)" Ed. Avigad Vonshak, Taylor & Francis, Londre, pp.131-158.
- Berghoff P.C. 1990** - *Les petits animaux familiers et leurs maladies*. 1ère éd. Paris :éditions Maloine, 132 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Bjursell M.K., Martens E.C., Gordon J.I. 2006** - Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. J Biol Chem. In press In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert,13 p.
- Bories G. et Tulliez J., 1975**-Détermination du 3,4-benzopyrène dans les algues spirulines produites et traitées suivant différents procédés Ann. Nutr. Aliment. 29, 573-575.
- Boudène C., Collas E., Jenkins C., 1975**-Recherche et dosage de divers toxiques minéraux dans les algues spirulines de différentes origines, et évaluation de la toxicité à long terme chez le rat d'un lot d'algues spirulines de provenance mexicaine. Ann.Nutr.Aliment. 1975 ; 29 : 577-87.
- Bouzar A C et Benamirouche K . 2009** – Etude de la spiruline comme aliment fonctionnel nourrissant la flore intestinale. Memoire d'ingénieur, 98 P.
- Bujard-E., U. Braco-U., Mauron-J., Mottu-F., Nabholz-A., Wuhrmann-JJ. et Clément-G. 1970**-Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (Spirulina) and their Possible Use in Food Formulations 3rd.international Congress of Food Science and Technology, Washington.

- Bulliot C. 2004** - Les NAC et la Législation : ce qu'il faut savoir. *In : Comptes rendus du congrès de la C.N.V.S.P.A. spécial NAC*, Belle-Ile 4-6 juin 2004. Paris : C.N.V.S.P.A, 39-42 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Challem-JJ, Passwater-RA, Mindell-EM, 1981**- Spirulina. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut.
- Chamorro-cevallos, 1980**-Toxicologic Research on the Alga Spirulina United Nations Organisation for Industrial Development, 24 Oct. 1980.
- CAPET F, DEBAILLIE R, TAFFOREAU J. et VAN OYEN H. 1999** -« Définitions et symptômes du diabète. » Diabète : situation actuelle et éléments pour le développement d'une politique de santé ; Centre de Recherche Opérationnelle en Santé Publique – Episérie N°19 ; P8-12 in ELYAH Ariel. 2001 – 2003 – quel avenir pour la spiruline ? Mémoire bibliographique, Institut National des Sciences et Techniques de la Mer Montpellier II, 30 P.
- Charpy I., LangladeM.J. and Romain Alliod R. 2008**-La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Institut de Recherche pour le Développement UR 167 (CYROCO) algae, Final Report to the National Science Foundation, Sanitary Eng.Res. lab., Univ. Calif. Berkeley
- Chopra and Bishnoi M, 2007**-Antioxydant Profile of Spirulina: A Blue-Green Microalga in Spirulina.In Gershwin & Belay (ed.) Spirulina in Human Nutrition and Health: 101-118.
- Christophe G A, 2011** – dumenat phyto-agromatherapie. Cours, *faculté de médecine Paris XIII*, 32 P.
- Clément G. 1975**-Production et constituants caractéristiques des algues Spirulina platensis et Spirulina maxima. *Ann.Nutr.Aliment* ; n°29 : 477-87.
- Ciferri, 1983**-Spirulina, the Edible Microorganism." *Microbiol. Rev.* 47, 551-578.
- Colemann D.L., Dagg C.P., Fuller J.L. et al. 1966** - *Biology of the Laboratory Mouse*. 2nd ed. New York : McGraw-Hill Book Company, 706 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA SPIRULINE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SPIRULINA, 2008** – La spiruline et le développement – formation et transfert de technologie , en matière de culture de la spiruline. *Toliara sud – ouest de M A D A G A S C A R* . 191 P.
- Costa J.A.V., Colla L.M., Duarte P., Kabke K. and Weber A. 2002**-Modelling of Spirulina platensis growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 603-607.

Christl S.U., Murgatroyd P.R., Gibson G.R., Cummings J.H. 1992 - Production, metabolism and excretion of H₂ in the large intestine. *Gastroenterology*, 102 : 1269-1277 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.

Cruchot H. 2008-La spiruline bilan et perspectives (thèses)

Cuibai F. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.

Cunliffe-Beamer TL, Les EP. 1987 - The Laboratory Mouse. *In* : POOLE TB, editor. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 6th ed. Harlow, UK : Longman Scientific and Technical, 275-295 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.

Dubos R, Schaedler R. W et al. 1965 - Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*, **122**: 67-76 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.

Ducluzeau R. 1969 - Influence of the zoological species on the microflora of the gastrointestinal tract. *Rev Immunol Ther Antimicrob*, **33**(6): 345-83 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.

Duobos R, Schaedler R. W et al. 1963 - Composition, Alteration, and Effects of the Intestinal Flora. *Fed Proc*, **22**: 1322-9 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.

Dupire J. 1998- Objectif : malnutrition. Paris: Similia: 224.

Eckburg P.B, Bik E.M, Bernstein C.N, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill S.R, Nelson K.E, Relman D.A. 2005 - Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308 : 1635-1638 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.

- Eckburg, P. B, Bik E. M et al. 2005** - Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**(5728): 1635-8 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Elyah A. 2003**-Quel avenir pour la spiruline ? Disponible sur : [http://elyah-partenariat.iquebec.com/autres/26 biblio spiruline.pdf](http://elyah-partenariat.iquebec.com/autres/26_biblio_spiruline.pdf).
- Ephrati C., Pizzinat N. 2003** - *Guide des professionnels de l'animalerie*. 1ère éd. Paris : ANIWA S.A, 698 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Falquet J. 1996**-Spiruline : aspects nutritionnels. Genève : Antenna Technologies ; Disponible sur <http://www.technaspiruline.org/datas/Aspectsnutritionnels.doc>
- Foufelle F, Hegarty B, Bobard A, et al. 2005** - Un nouveau rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique. *Med Sci (Paris)* ; 21 : 569-71 in Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *MEDECINE/SCIENCES* ,24 : 505-10.
- Fox D. et R. 1999**-Spiruline technique pratique et promesse. Aix en Provence : Edisud ; 1999.
- Falquet J., Hurni J.P. 2006**-Spiruline, Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies: 41 p. In : [http : //www.antenna.ch/malnutrition/aspects-nutritionnels.html](http://www.antenna.ch/malnutrition/aspects-nutritionnels.html)
- Finegold S.M., Attebery H.R., Sutter V.L. 1974**- Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nut*, 27,1456-1469 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert,13 p.
- Fukino et al., 1990**-Effect of spirulina on the renal toxicity induced by inorganic mercury and cisplatin *Eisei Kagaku*, 36:5.
- Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004** - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Gershwin ME., Belay A., 2008**-Spirulina in Human Nutrition and Health, CRC Press edts: 328pp.
- Hill JO. 2006** - Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev*, 27 : 750-61in Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *MEDECINE/SCIENCES* ,24 : 505-10.

- Hooper L.V., Wong M.H., Thelin A., Hansson L., Falk P.G., Gordon J.I. 2001** - Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291: 881-884 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Hudson B.J.F. and Karis I.G. 1974**-The lipids of the alga *Spirulina*. *J. Sci. Food Agric* 25: 759-763.
- Isolauri, E, Salminen S et al. 2004** - Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **18**(2): 299-313 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- JOHNSON P. et SHUBERT E, 1986** - Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green algae. *Nutrition Research*, N°6 : 85-94 in J. Falquet J et. Hurni. J.-P.2006 – Spiruline Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies : 41 P.
- Kapoor R et Mehta U. 1993** - Utilization of beta-carotene from *Spirulina platensis* by rats *Plant-Foods-Hum-Nutr.* 43(1): 1-7 in J. Falquet J et. Hurni. J.-P.2006 – Spiruline Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies : 41 P.
- Kato T. and Takemoto K., 1984**-Effects of spirulina on hypercholesterolemia and fatty liver in rats. *Saitama Medical College. Pub. in Japan Nutr. Foods Assoc. Journal.* 37:323. Japan.
- König C., 2006**-Les algues : première lignée végétale. Disponible sur : http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/lesalgues-premiere-lignee-vegetale_523/c3/221/p2/
- Laboratoire NATESIS. 2007**-Les phytonutriments majeurs de la Spiruline. Disponible sur http://www.natesis.com/boutique/page_actus_page.fr
- Lane-Peter W. 1976** - The Laboratory Mouse. In : the Staff of UFAW, editor, *The UFAW HANDBOOK on the Care and Management of Laboratory Animals*. 5th ed. New York : Churchill Livingstone, 193-205 in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Lay C, Sutren M, et al.2005** - Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol*, **7**(7): 933-46 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.

- Lay C., Sutren M., Rochet V., Saunier K., Doré J., Rigottier-Gois L. 2005** - Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. Environ Microbiol, , 7: 933–946 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J I. 2006** - Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell, 124: 837-48946 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Li B., Gao M.H., Zhang X.C. and Chu X.M. 2006**-Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. Biotechnology and Applied Biochemistry 43(3): 155-164.
- Lindberg E., Adlerberth I., Hesselmar B., Saalman R., Strannegård I.L., Åberg N., Wold A.E. 2004** - High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. J. Clin. Microbiol, 42: 530-534 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Lindblad P., Oxelfelt F., Tamagnini P., Troshina O. 1998**-Cyanobacterial Biotechnology Nostoc PCC 73102 and H2: Knowledge, Research and Biotechnological Challenges .Cyanobacterial biotechnology: proceedings of the International Symposium, september 18-21 1996. Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD. P 11 - 13.
- Macpherson A.J., Harris N.L. 2004** - Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat. Rev. Immunol, 4 : 478-485 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Marteau P., Shanahan F. 2003** - Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects. Best Practices and Research Clinical Gastroenterology, 17 : 725-740 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- MANI U.V, SANGEETA S, IYER U.M. et SUBRAMANIAN S.R. 1996** - « Studies on the effect of spirulina supplementation in Control of Diabetes Mellitus » Cyanobacterial biotechnology : proceedings of the International Symposium, Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD. P301-304 in ELYAH Ariel. 2001 – 2003 – quel avenir pour la spiruline ?. Mémoire bibliographique, Institut National des Sciences et Techniques de la Mer Montpellier II, 30 P.
- Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L.2005** - An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell, 122 : 107-118 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.

- Mercenier A., Pavan S., Pot B. 2002** - Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, , 8, 99-110
In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Merceron M. 2006**-Les bactéries photosynthétiques productrices d'oxygène. Disponible sur : [http://membres.lyco.fr/neb5000/Bacteriologie/Groupes Bactériens/ Bactéries photosynthétiques productrices d oxygene.html](http://membres.lyco.fr/neb5000/Bacteriologie/Groupes/Bactériens/Bactéries%20photosynthétiques%20productrices%20d%20oxygène.html)
- Meynier M. 2003** – Physiologie,90 p in
- Midtvedt A.C., Midtvedt T. 1992** - Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*, 15 : 395-403 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Mowat A.M. 2003** - Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev.Immunol*, 3 : 331-341 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert,13 p.
- Nathalie M. Delzenne, Patrice D. Cani. 2008** – Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *MEDECINE/SCIENCES*, 24 : 505-10.
- National Research Council. 1995** - Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 4th ed. Washington, DC : National Academy Press Inc, 173 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Nowrouzian F., Hesselmar B., Saalman R., Strannegård I.L., Åberg N., Wold A.E., Adlerberth I. 2003** - *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr. Res*, 54: 8-14 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Ouwehand A et Vesterlund S. 2003** - Health aspects of probiotics. *IDrugs* 6(6): 573-80 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat,INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Parikh P., Mani U. and Iyer U. 2001**- Role of Spirulina in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food* 4: 193-199.

- Pena J. A, Li S. Y et al. 2004** - Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis. *Appl Environ Microbiol*, **70**(1): 558-68 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- PEREZ R. 1997**-Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. Editions IFREMER.
- Phaneuf M et Gadbois C. 2009** - Agir ensemble pour des milieux cliniques sains et sécuritaires : de l'analyse des risques à la prévention des infections nosocomiales. Cours, 26 P.
- Pierlovisi C. 2007**-L'Homme et la Spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques. Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris (162).
- Puyfoulhoux G, Rouanet JM, Besançon P, Baroux B, Baccou JC, Caporiccio B. 2001**-Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J Agric Food Chem*. 49: 1625-9.
- Quillet M. 1975**- Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les Spirulines. *Ann. Nutr. Alim*. 29: 553-561.
- Rawls J.F., Mahowald M.A., Ley R.E., Gordon J.I. 2006** - Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, 127: 423-33 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Rigottier-Gois L., Le Bourhis A.G., Gramet G., Rochet V., Doré J. 2003** - Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 43 : 237-245 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Robert C., Bernalier-Donadille A. 2003** - The cellulolytic microflora of the human colon: evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiol. Ecol*, 46 : 81-89 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Rofidal T. 2006** – La physiologie de la digestion. Cours, 21 p.

- Rosse D.J. 1999** - Alimentation des Rongeurs et Lagomorphes de compagnie. Thèse Méd.Vét, n°10, 113 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Santillan C. 1974**-Cultivation of the Spirulina for Human Consumption and for Animal Feed. International Congress of Food Science and Technology.
- Scheldeman P, Baurain D, Bouhy R, Scott M, Belay A, Wilmotte A. et al. 1999**- Arthrospira (Spirulina) strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. FEMS Microbiol Lett; 172 (2): 213-22.
- Savage, D. C et Dubos R. J. 1967** - Localization of Indigenous Yeast in the Murine Stomach J Bacteriol, **94**(6): 1811-1816 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Savage D. C, Dubos R et al.1968** - The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. J Exp Med, **127**(1): 67-76 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. These de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Schwartz-J., Shklar-G. 1987**-Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts.J-Oral-Maxillofac-Surg. 1987 Jun; 45(6): 510-5.
- Seksik, P, Rigottier-Gois L et al.2003** - Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut **52**(2): 237-42 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren M., Pochart P., Marteau P. et al. 2003** - Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut, **52** : 237-242 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Servin AL. 2007** - Ça « chat » entre la microflore intestinale et l'hôte. *Med Sci (Paris)*, **23** : 229-30 in Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *MEDECINE/SCIENCES* ,**24** : 505-10.

- Sghir A, Gramet G et al. 2000** - Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, **66**(5): 2263-6 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Sghir, A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Doré J. 2000** - Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 2263-2266 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, 13 p.
- Shanahan F. 2002** - The host-microbe interface within the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, **16**: 915-931 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Simpore J., Zongo F., Kabore F., Dansou D., Bere A., Nikiema J.B. Pignatelli S., Biondi D., Ruberto G., Musumeci S. 2005-** Nutrition Rehabilitation of HIV-Infected and HIVNegative Undernourished Children Utilizing Spirulina. *Ann Nutr Metab* **49**: 373-380
- Simpore J., Kabore F., Zongo F., Dansou D., Bere A., Pignatelli S., Biondi D.M., Ruberto G., Musumeci S. 2006-** Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutrition journal* [electronic resource]. **5**: 3
- Smith H. W. 1965** - Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition. *J Pathol Bacteriol*, **89**: 95-122 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Sonnenburg J.L., Xu J., Leip D.D. et al. 2005** - Glycan foraging in vivo by an intestine-adaptated bacterial symbiont. *Science*, **307**, 1955-1959 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert,13 p.
- Spears R. W. et Freter R.1967** - Improved isolation of anaerobic bacteria from the mouse cecum by maintaining continuous strict anaerobiosis. *Proc Soc Exp Biol Med*, **124**(3): 903-9 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.

- Stappenbeck T.S., Hooper S.V., Gordon J.I. 2002** - Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 99: 15451-15455 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Suau A, Bonnet R et al. 1999** - Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl Environ Microbiol, **65**(11): 4799-807 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J.J, Gibson G.R, Collins M.D, Doré J. 1999** - Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl. Environ. Microbiol.,. 65,4799-4807 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.
- Tannock, G.1997** - Normal microbiota of the gastrointestinal tract of rodents. . Gastrointestinal microbiology. R. I. Mackie and B. A. White. New York, N.Y., Chapman & Hall Microbiology series in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Tremblay M. 2002** - *Le hamster*. 1ère éd. Québec : Le Jour, éditeur, 178 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Tremblay M. 2001** - *La souris*. 1ère éd. Québec : Le Jour, éditeur, 213 p in Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc. 2004 - Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en france. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT, 276 p.
- Tsuchihashi N, Watanabe T, Takai Y., 1987**-Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats. Bull Chiba Hygiene College. 5 : 27-30.
- Vidalo J.L. 2008**- Spiruline l'algue bleue de santé et de prévention. ED. Dauphin : 1-318.
- Vonshak A. 1997**-*Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology Cell biology and biotechnology. Taylor & Francis LTD.

- Wang J., Wang Y., Wang ZX., Li L., Qin J., Lai WQ., Fu Y., Suter P.M., Russell R.M., Grusak MA., Tang GW. and Yin S.A. 2008**-Vitamin A equivalence of spirulina beta-carotene in Chinese adults as assessed by using a stable-isotope reference method. *American Journal of Clinical Nutrition* 87:1730-1737.
- Wu L.c., Ho J-a .A. 2007**-Antioxoydative and Hepatoprotective Effects of Spirulina In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina in Human Nutrition and Health* : 119-151.
- Zoetendal E. G, Collier C. T et al. 2004** - Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*, **134**(2): 465-72 in FAN Cuibai. 2008 - L'influence de la lactoferrine, de probiotiques et du SM3 (extrait enrichi en sphingolipides) sur des fonctions immunitaires de la souris. Thèse de doctorat, INRA-AgroParisTech, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, 193 p.
- Zoetendal, EG, AD Akkermans, and WM de Vos. 1998** - Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of actives bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 64 : 3854-3859 In Corthier G .2007 - Flore intestinale et santé : quels enjeux ?, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 13 p.

ANNEXES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I. Digestion du monogastrique	
I. Progression d'un repas dans le tube digestif de l'homme.....	3
I.1.1. La mastication et la déglutition	3
I.1.2. Les mouvements de l'estomac et de l'intestin grêle.....	3
I.1.3. Les mouvements du gros intestin.....	3
I.2. Les phénomènes chimiques.....	4
I.3. L'absorption.....	4
II – Flore intestinale	6
II-1 Diversité du microbiote intestinal	6
II-2 Installation du microbiote intestinal.....	7
II-3. Distribution des bactéries dans le tube gastro-intestinal humain.....	8
II-4 Diversité des fonctions du microbiote.....	10
II-5 Microbiote intestinal et système immunitaire.....	11
II-6 Influence de l'alimentation sur la flore intestinale.....	13
II-7 Les micro-organismes en transit, ingérés (volontairement) par voie orale.....	13
III-implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique.....	14
III-1. Implication de la flore dans la modification du stockage énergétique et la favorisation de l'adiposité	14
IV – généralité sur les cobayes (souris).....	16
IV –1. Environnement	16
IV –1.1. La température.....	16
IV –1.1. Intervalle recommandé.....	16
IV –1.2. Les dangers.....	16
IV –1.2. L'humidité.....	16
IV –1.2.1. Valeur recommandée.....	16
IV –1.2.2. Risques sanitaires liés à une humidité trop élevée ou faible	16
IV –1.3. La qualité de l'air : le taux d'ammoniac et la ventilation.....	17
IV –1.3.1. Le taux d'ammoniac.....	17
IV –1.3.1.2. Origine de l'ammoniac et mesures préventives	17
IV –1.4. L'éclairage.....	17
IV –1.4.1. La photopériode	17
IV –1.4.2. Le spectre lumineux	18
IV –1.5. La densité animale	18
IV –1.5.1. La dominance chez les souris	18
IV –1.6. L'ambiance et le bruit.....	18
IV –1.6.1. L'ambiance.....	18
IV –1.6.2. Le bruit.....	18
IV –1.6.2.1. Intensité sonore.....	18
IV –1.6.2.2. Intensité sonore en pratique	19
IV –2. L'alimentation	19
IV –2.1. Comportement alimentaire et conséquences pratiques.....	19
IV –2.2. Généralités et rappels sur la physiologie digestive.....	20
IV –2.3. La flore de la souris.....	20
IV –2.4. Souris adultes à l'entretien, en gestation, en lactation et souriceaux sevrés en croissance.....	20
IV –2.4.1. Recommandations.....	20
IV –2.4.1.1. Besoin énergétique selon le statut physiologique des rats et des souris.....	21
IV –2.4.1.2. Densité énergétique de la ration.....	21

Chapitre II. Généralités sur la spiruline

I. Définition.....	23
II –Caractéristiques structurales.....	23
III-Croissance et reproduction de la spiruline.....	24
IV –Aspects et intérêts nutritionnels de la spiruline.....	25
IV –1. Analyse nutritionnelle qualitative et quantitative.....	25
IV – .1.1.Protéines.....	25
IV –1.2. Lipides.....	26
IV –1.2.1. Lipides totaux.....	26
IV –1.2.2. Acides gras.....	26
IV – 1.2.3.Fraction insaponifiable.....	26
IV – 1.3.Glucides.....	26
IV – 1.4.Acides nucléiques.....	26
IV – 1.5.Vitamines.....	27
IV – 1.6.Pigments et enzymes.....	28
IV – 1.7.Minéraux et oligoéléments.....	29
V_ Effets secondaires et de surdosage lié à la consommation de la spiruline.....	29
VI_ La spiruline dans la pharmacopée.....	30

PARITE 2 : EXPERIMENTATION ET RESULTATS

Problématique de recherche et objectifs.....	31
--	----

Chapitre I : matériels et méthodes

I- Matériels et Méthodes.....	32
I- 1 Cobayes et aliments.....	32
I- 1.1. Cobayes.....	32
I- 1.2. Condition d'élevage.....	32
I- 1.3. Régimes.....	32
I- 1.4. Suivi des animaux.....	32
I- 2. Choix du lot.....	32
• Première étape.....	33
• But de cette étape.....	33
• Deuxième étape.....	33
• But de cette étape.....	34
• Troisième étape.....	34
• But de cette étape.....	34
• Quatrième étape.....	35
• But de cette étape.....	35
• Cinquième étape.....	35
• But de cette étape.....	35
I- 3. Échantillonnages.....	35
I- 3.1. Présentation des analyses.....	35
I- 3.2. Analyses physico-chimiques.....	36
I- 3.3. Analyses microbiologiques.....	36
I-3.4. Méthodes d'analyses.....	36
I- 3.4.1.1. Analyses physico-chimiques des échantillons.....	36
I- 3.4.1.2. Détermination de la matière sèche.....	36
❖ Principe.....	36
❖ Mode opératoire.....	37
❖ Expression des résultats.....	37
I-3. 4.1.3. Détermination des cendres.....	37
❖ Principe.....	37
❖ Mode opératoire.....	37

❖ Expression des résultats.....	38
I-3. 4.1.4. Détermination des protéines brute.....	38
❖ Principe.....	38
❖ Mode opératoire.....	38
❖ Expression des résultats.....	39
I- 3.4.1.5. Détermination de la cellulose brute.....	40
❖ Principe.....	40
❖ Mode opératoire.....	40
❖ Expression des résultats.....	40
I- 3.4.1.6. Détermination de la matière grasse.....	41
❖ Principe.....	41
❖ Mode opératoire.....	41
❖ Expression des résultats.....	42
I- 3.4.2. Analyses microbiologiques.....	42
I- 3.4.2.1. Préparation des dilutions décimales.....	42
I- 3.4.2.2. Recherche et démembrement de la flore microbienne.....	42
I- 3.4.2.3. Recherche et dénombrement de la flore mésophile totale.....	43
❖ But	43
❖ Principe.....	43
❖ Mode opératoire.....	43
❖ Lecture.....	43
I- 3. 2.2.2. Recherche et dénombrement de coliformes totaux.....	43
❖ Technique.....	43
❖ Lecture.....	44
I- 3.4.2.4. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux.....	44
❖ Technique.....	44
❖ Lecture.....	44
I- 3. 2.2.4. Recherche et dénombrement de staphylocoques dore.....	44
❖ Principe.....	44
❖ Mode opératoire.....	44
❖ Lecture.....	45
I- 3.4.2.5. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium sulfito-réducteur</i>	46
❖ But	46
❖ Principe.....	46
❖ Mode opératoire.....	46
❖ Lecture.....	46
I- 3.4.2.6. Recherche des Salmonelles	48
❖ But	48
❖ Principe.....	48
❖ Mode opératoire.....	48
❖ Lecture.....	48
I- 3.4.2.7. Recherche des Streptocoques fécaux.....	50
❖ Principe.....	50
❖ Mode opératoire.....	50
I- 3.4.2.8. Recherche et dénombrement des levures et moisissure.....	52
❖ Principe.....	52
❖ Mode opératoire.....	52
❖ Lecture.....	52
II- Contrôle de la pureté de la souche de spiruline.....	54
II-1. Présentation des analyses.....	54
II-2. Méthodes d'analyses.....	54
II-2.1. Coloration de Gram.....	54
II-2.2. Teste catalase.....	54
❖ Technique.....	55
III- Analyse de la flore intestinale.....	55

IV - Détermination du Taux de glycémie après l'introduction de la spiruline dans l'alimentation des souris.....	56
V- Détermination de la formule numéraire sanguine	56
VI- Dissection des souris.....	57
VII- analyse statistiques.....	57
VII-1. Le principe de l'analyse de la variance.....	57
VII-2. Le plan expérimental.....	57
Chapitre II: Résultats et discussion	
I- Résultats.....	58
I- 1. Contrôle de la qualité physicochimique de l'aliment des souris.....	58
I- 2. Contrôle de la qualité bactériologique de la spiruline de provenance de France.....	58
II- Confirmation de l'identification de la souche de spiruline et de bifidobactéries.....	60
II- 1. La coloration de Gram.....	60
II- 2. Le test catalase.....	60
III- Evolution du poids des souris après prise d'une ration alimentaire standard seule ou enrichie avec la spiruline.....	60
III- 1. Effet d'une mauvaise posologie de la spiruline sur le gain de poids.....	60
III- 2. Effet de la spiruline sur l'évolution du poids.....	62
III- 3. Effet de la spiruline dans la prévention des déséquilibres alimentaires.....	64
III- 4. Effet de la spiruline dans la correction des déséquilibres alimentaires.....	65
IV – Influence de la spiruline dans la modification du rapport <i>Bifidobacterium/Echerichia coli</i> intestinal.....	66
V - Détermination du Taux de glycémie après l'introduction de la spiruline dans l'alimentation des souris.....	67
VI - Détermination du taux des globules rouges et des plaquettes sanguines.....	69
VII- Dissection des souris.....	70
VIII – Analyses statistiques.....	74
Conclusion générale et perspectives	77
Références bibliographiques	78
Annexes	91