

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE BLIDA A

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

THEME

**EFFET ANTIOXYDANT DE LA SPIRULINE EN ASSOCIATION
AVEC LES BIFIDOBACTERIUMS SUR LE DIABETE**

Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention Du diplôme Master 2

Spécialité : Sciences Alimentaires

Présenté par :

M^{elle} Khouas Hanane

Devant le jury composé de :

M ^m Acheheb H.	MAA	USDB	Présidente de jury
M ^m Boutekrabt L.	MCA	USDB	Promotrice
M ^{elle} Bensehaila S.	Doctorante	UHBC	Co-promotrice
M ^r Bousbia	MCB	USDB	Examineur
M ^m Fernane	MAB	USDB	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à rendre grâce au Dieu tout puissant, de m' avoir donné la force nécessaire pour mener à bien ce travail.

Je tient à remercier en premier lieu M^m Boutekrabt L., Maître de conférences A à l'université de Blida pour avoir accepté de m'encadrer et pour m' avoir permis de bénéficier de ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Ma co-promotrice ; M^{lle} Bensehaila S., doctorante à l'université de Chlef pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils et sa compréhension.

Je remercie également :

M^m Acheheb H., maître assistant A pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant le jury.

M^r Bousbia, Maître de conférences B à l'université de Blida pour nous avoir honoré et accepté d'examiner ce travail.

M^m Fernane, Maître Assistant B à l'université de Blida pour sa disponibilité et en acceptant de juger ce modeste travail.

Je tient à exprimer mess sincères gratitude à Mr le colonel Bourbaba de m' avoir accueilli dans le laboratoire d'intendance et pour le soutien et l'aide que tout le personnel de laboratoire m'ont attribué.

Je tiens à remercier tous le personnel du complexe antibioticale de Médéa pour leur aide.

Mes vifs remerciements à M^r le compréhensif Boudjemaa, D^r Benyahia et tous les vétérinaires du cabinet la Colombe

En fin, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

JE DÉDIE CE TRAVAIL À TOUS CEUX QUI ME
SONT CHÈRES

À MA MÈRE ET MON PÈRE ;

À MES FRÈRES ;

À MES SŒURS ;

À MON SUPPORT MORAL ;

À VOUS MON ANGE SAUVEUR ;

À MON HOMME ET SA FAMILLE ;

À TOUTE MA FAMILLE ET

À MES AMIS (ES)...

... BIEN FAIBLE TÉMOIGNAGE D'AFFECTION.

HANANE



SOMMAIRE

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre 1

Le diabète

1.1. Introduction 03

04

1.2. Le diabète

Chapitre 2

La spiruline

2.1. Introduction 16

17

2.2. Historique de la spiruline

18

2.3. Distribution géographique naturelle

20

2.4. La culture de spiruline

2.5. Composition de *Spirulina platensis* 30

2.6. Les multiples usages de la spiruline 36

2.7. Spiruline et diabète 41

2.8. Non toxicité de la Spiruline 43

Chapitre 3

Les probiotiques

3.1. Définitions et généralités 45

3.2. Composition et sélection 47

3.4. Les bifidobactéries, morphologie et caractéristiques taxonomiques 48

50

3.5. Les *bifidobactéries* et leur action au niveau du tractus gastro-intestinal

3.6. Méthodes de recherche traditionnelles des bifidobactéries 52

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. L'objectif de l'étude	55
2. Matériel végétal et souche	55
	56
3. Echantillonnage	57
4. Méthodes d'analyse	57
4.1. Analyses physico-chimiques de la spiruline	65
4.2. Analyses microbiologiques de la spiruline	72
4.3. La revivification de la souche bifide	73
4.4. Les essais <i>in vitro</i>	74
4.5. Identification de la population d'étude	74
4.6. Induction de diabète expérimental	75
4.7. Préparation du régime	75

Résultats et discussions

1. Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la poudre de la spiruline	78
	84
2. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les la poudre de <u><i>Spirulina maxima</i></u>	85
3. Détermination de la teneur en composés phénoliques	85
4. Détermination de l'activité anti-oxydante	88
5. Résultats des essais <i>in vitro</i>	91
6. Résultats du test <i>in vivo</i>	

Conclusion

Résumé

Cette étude est axée sur des analyses biochimiques, physico-chimiques et microbiologiques d'une cyanobactérie *Spirulina platensis* provenant du sud Algérien. L'étude concerne l'évaluation de la valeur alimentaire et l'effet antidiabétique de cette algue associée ou non à un probiotique.

Les analyses physico-chimiques effectuées nous ont permis de déduire que la spiruline a un bon apport calorique, soit de 369.28 kcal ; cet apport a pour origine essentiellement les teneurs élevées en protéines soit de 58.12 %, en sucres totaux, de l'ordre de 19.53 % et en lipides 6.52 %. Le test au DPPH nous a permis de la reporter une forte activité antioxydante.

D'autre part les analyses microbiologiques pratiquées montrent l'absence totale de germes pathogènes, cependant des colonies de germes aérobies mésophiles totaux ont pu être observées, soit 1400 germe/g qui sont conformes aux normes.

Grâce à ses qualités nutritionnelles complètes, incluant une forte activité antiradicalaire, nous avons pensé à l'utiliser comme un moyen de lutte contre l'effet diabétogène de l'alloxane chez les animaux qui est le résultat de la destruction des cellules pancréatiques notamment les cellules β , ce qui provoque une hyperglycémie grave appelée diabète expérimental. Dans la présente étude, nous avons investi le rôle des bifidobactéries à rééquilibrer la composition de la flore intestinale, et le rôle primordiale de la spiruline à piéger les radicaux libres libérés dans l'état de stress oxydatif induit par le déséquilibre provoqué par une hyperglycémie tout en basant sur son effet antioxydant. Par ailleurs, nous avons examiné l'activité antidiabétique et préventive d'une pré-culture bifide et de la spiruline, contre les agressions diabétogène de l'alloxane. Nous avons évalué l'effet de 1, 5 et 10mg/ml de spiruline seul puis combinée avec une bifidobactérie *in vitro* puis *in vivo* sur des rats Wistar.

Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus, il peut être conclu que l'association de la spiruline en raison de 10mg/ml à une bifidobactérie présente une vertu thérapeutique antidiabétique et un fort potentiel antioxydant.

Mots clés :

Spirulina platensis, probiotique, bifidobactérie, activité antioxydante, diabète, radicaux libres, stress oxydant, alloxane, rats.

Abstract

This study focuses on biochemical, physico- chemical and microbiological analysis of a cyanobacterium *Spirulina platensis* from southern Algeria. The study involves the evaluation of the nutritional value and antidiabetic effect of the algae with or without a probiotique.

The physico- chemical analysis deduce that spirulina has a good caloric intake , or 369.28 kcal , this contribution originates mainly high protein content is of 58.12 % , total sugar , the order of 19.53 % and 6.52 % fat . The DPPH test allows us to forward a strong antioxidant activity. On the other hand microbiological analysis performed show the complete absence of pathogens; however colonies of total aerobic mesophilic bacteria were observed or 1400 seeds / g which are in compliance with standards. With comprehensive nutritional quality, including strong antiradical activity, we thought to use it as a way to fight against the diabetogenic effect of alloxan in animals is particularly the result of the destruction of pancreatic cells β , which causes severe hyperglycemia called experimental diabet. In this study , we invested the role of bifidobacteria to rebalance the composition of the intestinal flora, and the effect of spirulina scavenge free radicals released in the state of oxidative stress induced by desiquilibry caused by hyperglycemia in any based on its antioxidant effect . In addition, we examined the antidiabetic and preventive activity of a pre- forked culture and *Spirulina* against the aggressions of diabetogenic alloxan. We evaluated effect of 1.5 10mg/ml of *Spirulina* alone and combined with a bifidobactériein vitro and in vivo in Wistar rats. Based on the overall results, it can be concluded that the combination of spirulina in raison to 10mg/ml with a bifidobacteria present an antidiabetic therapeutic virtue and a strong antioxidant potential.

Keywords:

Spirulina platensis , probiotique , bifidobacteria , antioxidant activity, diabet, free radicals , oxidative stress, alloxan, rats.

ملخص

تركز هذه الدراسة على الكيمياء الحيوية، و الفيزيائية والكيميائية و الميكروبيولوجية على البكتريا سبيرولينا الفطور من جنوب الجزائر . وتشمل الدراسة تقييم القيمة الغذائية و تأثير المضادة لمرض السكر من الطحالب مع أو بدون بروبيوتيك

من خلال التحاليل الفيزيائية والكيميائية نستنتج أن سبيرولينا تحتوي على سرعات حرارية جيدة ما يعادل 369.28 كيلو كالوري ، هذه المساهمة تأتي بنسبة عالية من البروتين هو أساسا 58.12 % ، ومجموع السكر ب 19.53 % و 6.52 % من الدهون . اختبار DPPH سمح لنا لإعادة توجيه النشاط المضادة للأكسدة بصفة قوية من ناحية أخرى تقوم التحاليل الميكروبيولوجية باظهار الغياب الكامل لمسببات الأمراض ، ومع ذلك لوحظ المستعمرات من مجموع البكتيريا الهوائية أو أليف الاعتدال 1400 بكتيريا / غ التي هي في الامتثال للمعايير. مع صفات غذائية واسعة النطاق، بما في ذلك النشاط المضادة للأكسدة القوي ، سعينا لاستخدامه كوسيلة لمحاربة تأثير سكري المفتعل ب ألوكسان في الحيوانات بشكل خاص نتيجة لتدمير خلايا البنكرياس β ، الذي يسبب ارتفاع السكر في الدم الحاد يسمى مرض السكري التجريبي. في هذه الدراسة استثمرنا دور البفيدوبكتيريا لإعادة التوازن لتركيبية الفلورا المعوية ، و الدور الهام لسبيرولينا لحجز الجذور الحرة الصادرة في حالة الاكسدة التي تسببها عدم التوازن الناجم عن ارتفاع السكر في الدم وذلك استنادا إلى تأثيرها المضاد للأكسدة. وبالإضافة إلى ذلك ، درسنا نشاط المضادة لمرض السكر والوقاية منه لبروبيوتيك ما قبل متشعب وكذا سبيرولينا ضد الاعتداءات من ألوكسان سكري . فقمنا بتقييم تأثير 5,1 و 10مغ/مل لسبيرولينا وحدها، و جنبا إلى جنب مع البفيدوبكتيريا و تجربيها على فئران ويستار . استنادا إلى النتائج الإجمالية ، يمكن الاستنتاج أن الجمع بين سبيرولينا بنسبة 10مغ/مل في وجود البفيدوبكتيريا بمثابة طريقة علاجية مضادة لمرض السكري بوجود مضادات أكسدة قوية .

كلمات البحث

سبيرولينا ، بروبيوتيك ، البفيدوبكتيريا ، والنشاط المضادة للأكسدة ، ومرض السكري ، والجذور الحرة ، الاكسدة ، الفئران ، ألوكسان.

Introduction générale

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides entraînant une hyperglycémie. A l'origine, le terme "diabète" désignait diverses maladies caractérisées par une élimination importante d'urines, une déshydratation et une soif intense [Calop et al., 2008]. Cette pathologie se distinguait par la saveur sucrée des urines et fut nommée diabète sucré [Rodier, 2001 ; Sharma, 2008]. Elle est répandue dans le monde où on dénombre 5 à 7% de la population mondiale [Weaber, 2007 ; Sharma et al., 2008 ; Singh P. and Kakkar P., 2009 ; Zhou et al., 2009].

Selon l'OMS [Guermaz, 2008], l'Algérie compte 5 millions de diabétiques tout diabète confondu. Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone [Rodier, 2001 ; Sharma et al., 2008]. Le diabète type 1, insulino-dépendant (DID), est actuellement maîtrisé surtout après la synthèse de l'insuline recombinante [Johnson, 1983]. Pour le diabète type 2 (DNID), le champ de recherche est encore ouvert.

Au niveau des sociétés industrielles, les recherches et les tentatives en pharmacothérapie ont permis d'établir l'insulinothérapie pour lutter contre le diabète juvénile et le contrôle du régime alimentaire associé à la prise de molécules antidiabétiques (sulphonylurés, biguanide, methformine, ...) pour le traitement et la lutte contre le DNID [Marles, 1994 ; Dey lucey et al., 2002].

Dans certaines sociétés traditionnelles non industrialisées (Chine, certains pays africains et latino-américains...), la prise en charge médicamenteuse de pathologies dites chroniques (tel le diabète) est en grande partie assurée par l'utilisation de plantes médicinales et alimentaires et des produits marins [Sharma et al. , 2008 ; Guermaz, 2008 ; Singh, 2009 ; Zhou et al. ,2009]. En effet, la vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des produits de la terre et de la mer. Ces dernières ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisable par l'homme en

particulier dans le domaine pharmacologique [Marouf et Joël, 2007]

Comme espèce marine, la spiruline consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique et connue par les scientifiques depuis plusieurs décennies pour sa richesse nutritionnelle, elle fait l'objet d'une redécouverte depuis quelques années. Riche en nutriments tel que protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux, elle est à l'étude ou déjà utilisée pour lutter contre la malnutrition. Compte tenu de ses caractéristiques, la culture de la spiruline pourrait être une solution pour améliorer la santé humaine, la nutrition notamment dans les pays du tiers-monde et également pour développer des cultures industrielles. Cette cyanobactérie semble actuellement l'une des meilleures solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité et, du fait, de grandes entreprises se sont lancées dans la culture de cet organisme à une échelle industrielle

L'existence d'une pharmacopée traditionnelle antidiabétique destinée au traitement de la pathologie diabétique sévit et son existence est confirmée par les praticiens et les médecins qui la pratiquent [Sharma et al, 2008 ; Singh, 2009].

Il paraît difficile voire impossible de répertorier la totalité des espèces actives et efficaces sur ce genre de pathologie. Aussi, dans notre travail, nous nous sommes limités à l'étude d'une algue *Arthrospira platensis* ; associée à un probiotique ; très utile dans les pays dits « développés » où les troubles de santé sont davantage liés à l'excès de nourriture qu'au manque ! C'est, par exemple, un moyen de lutter contre le diabète de type 2 (le fameux diabète gras qui apparaît vers la quarantaine et s'accompagne généralement de surpoids), car elle régule le taux de sucre et la production de glucose par le foie, et agit sur la production d'insuline au niveau du pancréas (Denise Fox ,2004).

Nous voulons par ce travail répondre à cette question : peut cette association effectivement représenter une forme de régulation de la glycémie ou chacune indépendamment ?

Ses effets avérés sur le diabète, nous ont donc poussés à démontrer expérimentalement, le ou les principes actifs et d'en comprendre les mécanismes d'action.

Notre stratégie expérimentale comporte donc les axes suivants :

- Analyses physico-chimique de la poudre de spiruline
- Un fractionnement des polyphénols par entraînement avec un solvant
- Evaluation du pouvoir antioxydant de la spiruline
- Une étude *in vitro* est entreprise pour justifier la dose de spiruline administrée, pour démontrer l'effet de la spiruline seule, l'effet des *bifidobacteriums* et de l'association.
- Un modèle de rat diabétique est conçu pour tester l'efficacité de ces préparations *in vivo*.

Chapitre 1 :

Le diabète

1.1. Introduction

Le diabète est une maladie métabolique grave menaçant, d'une manière croissante, la santé publique dans le monde. Elle touche environ 4% de la population mondiale et on s'attend à une augmentation de 5,4% en 2025 (Al-Achi, 2005). Les patients atteints de diabète ont le stress oxydatif élevé et une altération des systèmes de défense anti-oxydant, qui semblent contribuer à l'initiation et la progression des complications du diabète induit (Kim et al., 2006). Les systèmes de défenses antioxydants existant dans l'organisme sont susceptibles de moduler le niveau du stress oxydatif intracellulaire. En effet, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase (enzymes antioxydantes), peuvent catalyser la dismutation des radicaux libres ou leur neutralisation (Rudge et al., 2007). Le diabète entraîne de graves déséquilibres métaboliques, des changements dans de nombreux tissus en particulier le pancréas (McCord et al., 1971) où Ihara et al., 1999, ont noté une augmentation des marqueurs du stress oxydatif dans les îlots pancréatiques de rats diabétiques. Le malondialdéhyde reflète le degré de peroxydation lipidique, l'augmentation de sa production joue un rôle important dans le contrôle de la progression du diabète (Ilhan et al., 2001).

Malgré l'utilisation des hypoglycémiantes comme drogues antidiabétiques, le diabète et ses complications constituent une grande problématique dans la prise en charge thérapeutique des diabétiques et la réussite du traitement serait d'un intérêt grandiose, malgré l'avancée de nouvelles molécules thérapeutiques. Les médicaments modernes, y compris l'insuline et les hypoglycémiantes oraux (les biguanides, les sulfonylurées), leur administration régulière engendre d'effets indésirables (Nissen and Wolski, 2007). Récemment, les diabétologues sont arrivés à l'évidence d'un complément thérapeutique constitué par les extraits de plantes est nécessaire pour optimiser le traitement du diabète (Bagchi et al., 1997 ; Kim et al., 2002 ; Jin et al., 2008).

Les plantes sont reconnues comme une merveilleuse source de médicaments. Actuellement 1200 espèces de plantes sont utilisées comme médicaments dans la thérapeutique traditionnelle du diabète (Marles and Farnsworth, 1995). Cependant pour la plupart d'entre elles les preuves scientifiques ne sont pas encore élucidées.

Et les algues aussi. Il a été prouvé que la spiruline agit sur le diabète en réduisant le taux sanguin de sucre et de cholestérol. L'ingestion quotidienne de spiruline est

recommandée pour le contrôle du taux glyco-lipidique chez les diabétiques (Mani & al., 1996).

La fraction soluble dans l'eau de la Spiruline a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum. La prise de 5g par jour a mis en évidence une amélioration et un meilleur contrôle du diabète (Mani & al., 1996).

Les antioxydants jouent un rôle majeur dans la protection contre les dommages oxydatifs moléculaire (Evans, 2007). En plus du stress oxydatif, l'action de l'insuline est également perturbée chez les diabétiques, ce qui entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose. Ainsi, l'effet des composés phytochimiques sur les tissus tel que le foie, qui régule le métabolisme du glucose, est un domaine intéressant à explorer. En effet, les flavonoïdes sont longuement reconnus pour avoir un effet anti-inflammatoire, antioxydant, antiallergique, antithrombotique, antiviral et anticancérinogène (Carroll et al., 1998). Cependant peu d'informations sont disponibles sur leur potentiel à réguler et contrôler le glucose sanguin chez l'homme.

1.2. Le diabète

1.2.1. Définitions et généralités

Le diabète est une maladie fréquente, connue depuis fort longtemps, très répandue en ce début de XXI^{ème} siècle. C'est une pathologie chronique, caractérisée par une hyperglycémie. Lorsque la glycémie dans le sang, mesurée à jeun, devient supérieure à 1,26 g par litre, la personne est considérée comme diabétique. Cette maladie est incurable, mais peut néanmoins être traitée efficacement (Buysschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004).

Le diabète est un désordre du métabolisme lipidique, glucidique et protéique attribué à la production diminuée de l'insuline ou à une résistance anormale à cette hormone qui entraîne une hausse du taux de glucose.

On peut distinguer plusieurs types de diabète :

- **Le diabète insulino-dépendant (DID)** : Concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge. Les cellules qui sécrètent l'insuline sont détruites jusqu'à 90% de leur quantité normale (causes auto-immunes ou idiopathiques). Il est lié à un déficit en insuline (Raccach, 2004 ; Calop et al., 2008).

Le diabète de type 1 est caractérisé par l'incapacité du pancréas à sécréter l'insuline. Par conséquent, même après un repas, il y a peu ou pas d'insuline dans le sang, entraînant ainsi une hausse de la glycémie. L'injection d'insuline doit être faite de manière périodique afin de maintenir la glycémie à un niveau normal (Teissedre P., 2002)

- **Diabète non insulino-dépendant (DNID)** : Ce type de diabète débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux (Buysschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'insuline est soit basse ou soit élevée (insulinorésistance prédominante ou insulinopénie prédominante)

(Calop et al., 2008 ; Raccach, 2004).

Contrairement au diabète de type 1, ce n'est pas l'absence d'insuline qui est responsable de la hausse du glucose sanguin mais la résistance des cellules à l'insuline. L'insuline n'a plus ou presque plus d'effet sur les cellules pour favoriser l'entrée du glucose. Par conséquent, le glucose reste dans le sang et fait augmenter la glycémie. Le diabète de type 2 peut être plus ou moins grave. Il ne nécessite généralement pas l'injection d'insuline mais un contrôle de l'alimentation, une perte de poids ainsi que de l'exercice, pour que la glycémie revienne à la normale (Teissedre P., 2002)

En l'absence de traitement, le diabète se reconnaît par une élévation chronique de la glycémie. Celle-ci s'accompagne parfois par les symptômes suivants : polydipsie, polyurie, asthénie, polyphagie, amaigrissement ou obésité, et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel (Sharma et al., 1993 ; Buyschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004 ; Calop et al., 2008).

Le diabète aboutit à des complications comme les maladies cardio-vasculaires et rénales. Ces complications peuvent être retardées, diminuées ou empêchées en maintenant une glycémie près de la normale (0.7 - 0.8 g/l) (Raccach, 2004).

Les maladies coronariennes sont présentes chez 8 à 20 % des diabétiques au-delà de 45 ans et cette fréquence augmente avec l'âge (Raccach, 2004). Le diabète est la cause principale de nouveau cas de cécité chez des adultes diabétiques entre 30 et 75 ans. Les diabétiques au-delà de 65 ans sont deux fois plus souvent hospitalisés pour des problèmes liés au fonctionnement des reins que les personnes non atteintes (Sharma et al., 1993 ; Buyschaert et al., 1998 ; Raccach, 2004).

Les diabétiques de type 2, précisément, sans aucun passé coronaire ont un risque d'infarctus myocardique aussi élevé que celui des témoins non diabétiques (Sharma et al., 1993 ; Buyschaert et al., 1998).

1.2.2. Le pancréas et l'insulino-sécrétion

Bien que les apports de glucose soient très variables dans le temps, la glycémie reste toujours comprise entre 0.7 et 0.8 g/l (Raccach, 2004). Cette régulation est assurée par les sécrétions endocrines du pancréas qui pénètrent dans le flot sanguin par la veine mésentérique (Buyschaert et al., 1998).

Le pancréas est une glande double, à la fois exocrine et endocrine, située dans une anse du duodénum. La glande endocrine est représentée par de petits îlots

cellulaires disséminés dans le parenchyme exocrine, les îlots de Langerhans, dont le diamètre varie de 100 à 300 μ m et dont le total ne représente guère que 1% environ de la glande, soit un poids total de 1 à 2 g. (Figure 1).

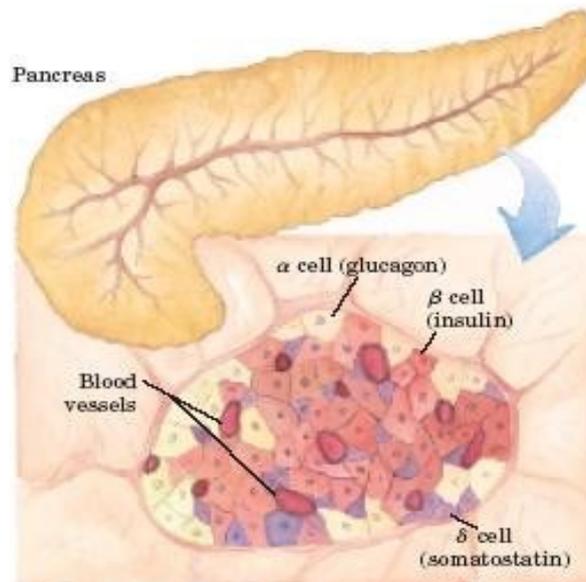


Figure 1 ♦ Les systèmes endocriniens du pancréas (Nelson et Cox, 2004)

Les sécrétions de l'insuline rejoignent la circulation sanguine via le foie. Le pancréas sécrète plusieurs hormones (Nelson et Cox, 2004) :

1/ L'insuline : hormone peptidique synthétisée dans les glandulaires des îlots de Langerhans ou cellules Bêta. L'incapacité de ces cellules à produire suffisamment d'insuline, entraîne un diabète. Cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction de la cellule bêta, sous l'effet d'agents diabétogènes, comme l'Alloxane (Malaisse et al., 1982 ; Oberley, 1988). L'action de l'insuline est représentée sur la figure suivante (figure2):

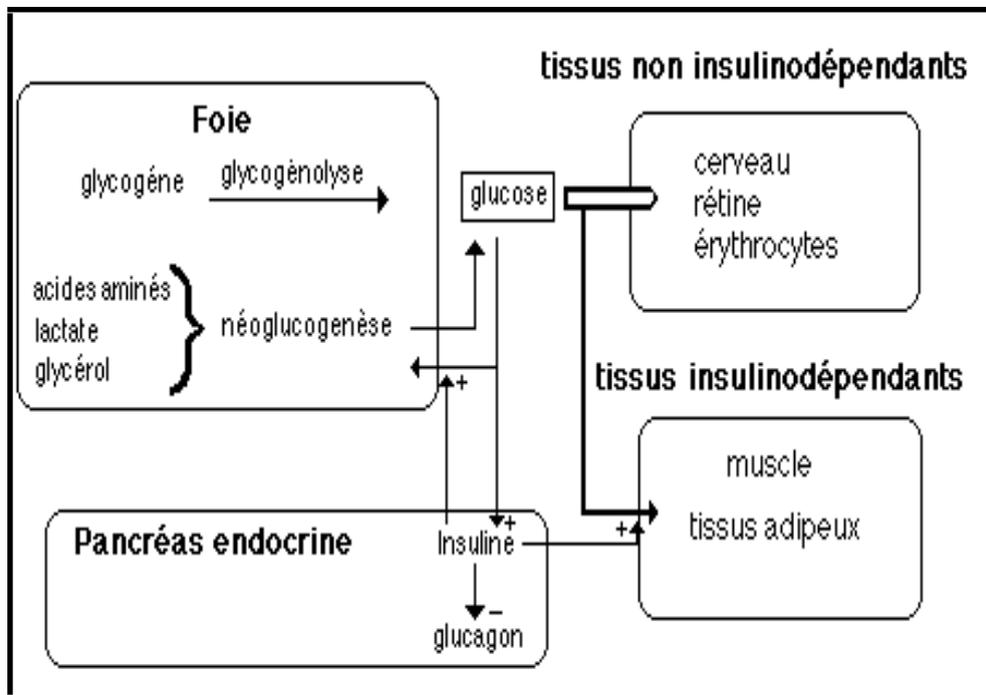


Figure 2 ♦ Mécanisme biochimique de l'action de l'insuline (Oberley, 1988).

Au niveau des cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leur membrane via des récepteurs au glucose exemple GLUT 4 (Malaisse et al., 1982 ; Oberley, 1988). Au niveau du foie, elle stimule la glycogénogenèse.

La capacité, plus ou moins grande, de l'insuline à favoriser l'utilisation du glucose par les tissus périphériques définit le degré de sensibilité à l'insuline d'une personne. Chez les humains obèses et/ou diabétiques, cette action de l'insuline est fortement réduite et cette perturbation est due à un défaut au niveau du transport du glucose (Buysschaert et al., 1999 ; Raccah, 2004 ; Weaber, 2007). Les mécanismes par lesquels l'insuline stimule ce processus dans les cellules musculaires et adipeuses soient indiqués dans la figure 3.

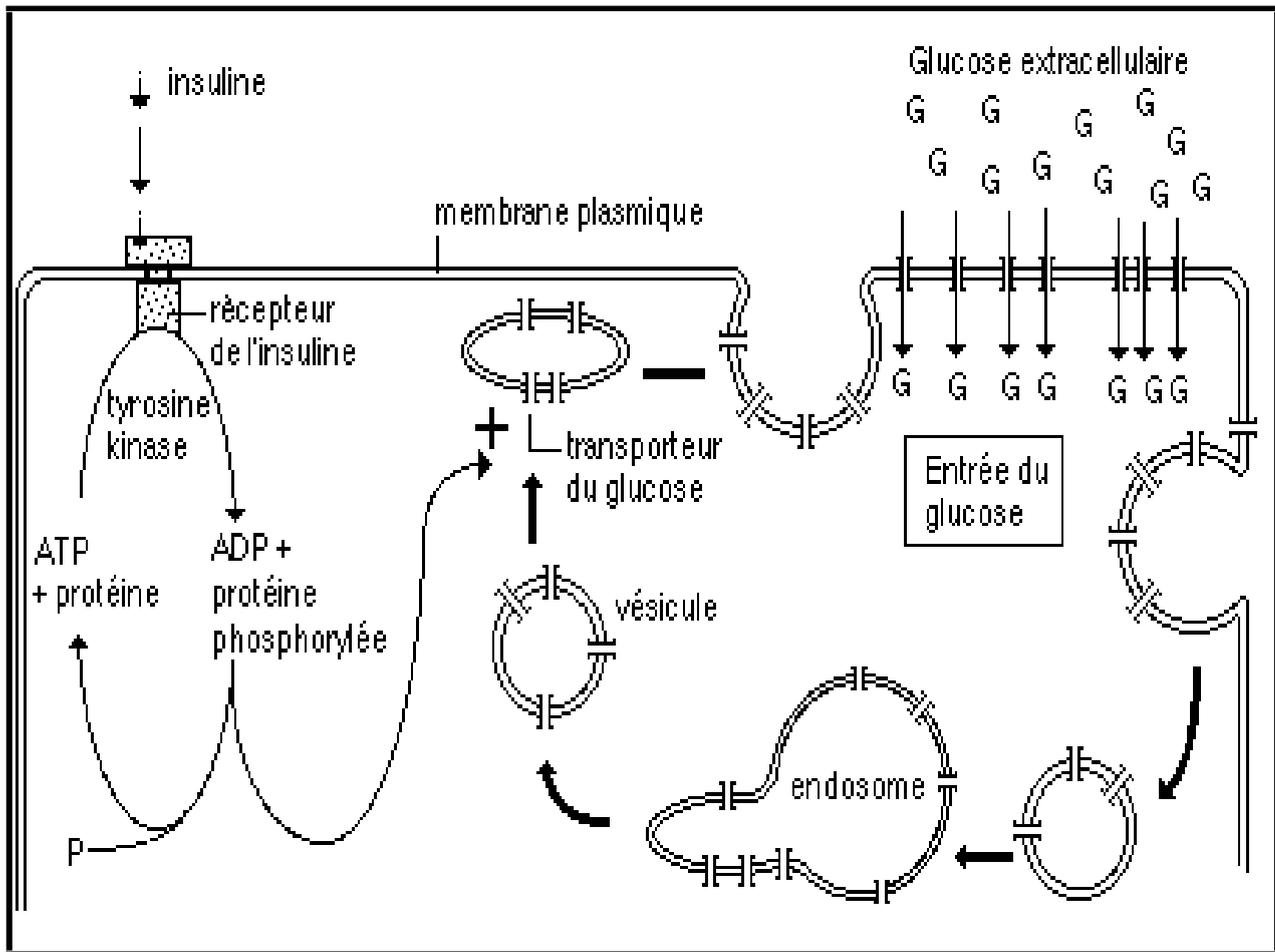


Figure 3 ♦ Stimulation de l'enrichissement de la membrane plasmique en GLUT4 par l'insuline (Kahn, 1992).

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'insuline stimule l'enrichissement de la membrane plasmique en transporteurs GLUT 4, où des vésicules contenant les transporteurs fusionnent avec la membrane (Wang et al., 1997). Une autre hormone d'origine intestinale, le GLP-1, est également capable d'augmenter le nombre de récepteurs GLUT4 et GLUT1 sur les adipocytes in vitro (Wang et al., 1997).

L'insulino-résistance est une réponse biologique in vivo à l'insuline expliquée par une sécrétion réduite ou par son action défectueuse. Elle est caractéristique du diabète non insulino-dépendant et concerne la majorité des tissus cibles comme le foie qui va augmenter sa production en glucose, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes responsables peuvent se

situer à différents niveaux du métabolisme insuliniq, y compris au niveau du récepteur à l'insuline des cellules cibles (Buysschaert et al., 1999 ; Raccah, 2004) figure 4

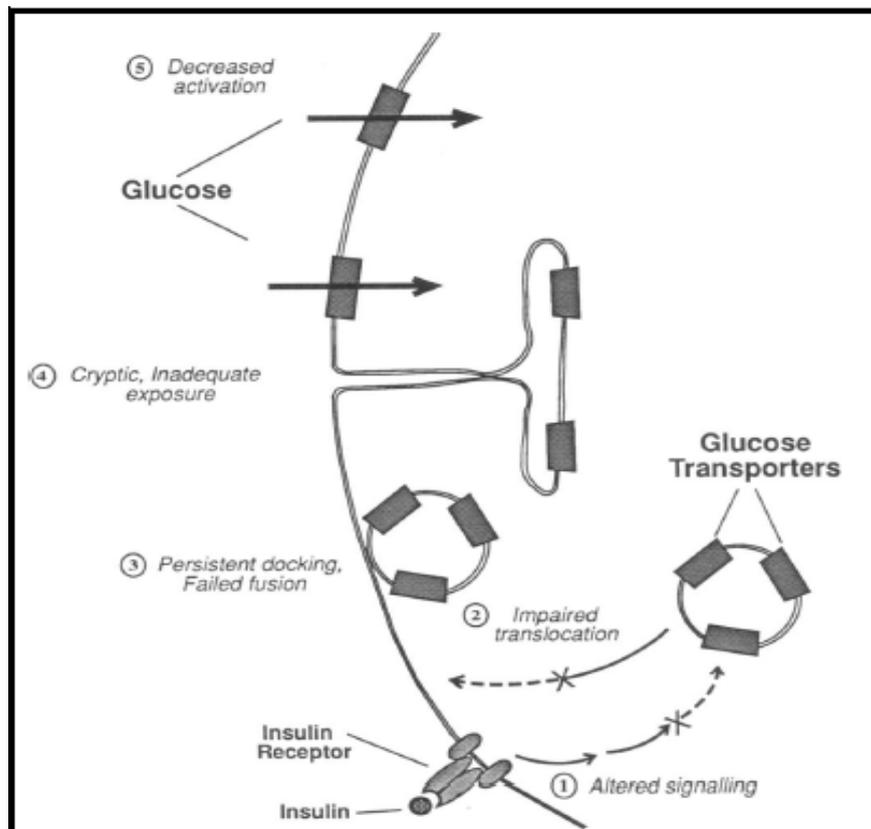


Figure 4 ♦ Les mécanismes de l'insulino-résistance (Kahn, 1992)

(1) signalisation déficiente, (2) translocation affaiblie, (3) fusion échouée, (4) fusion partielle et exposition au milieu extracellulaire inadéquate (5) réduction de l'activation des transporteurs de glucose.

2/ Le glucagon : hormone peptidique synthétisée par les cellules α , qui est une hormone hyperglycémiant. C'est un facteur antagoniste de l'insuline. Cette hormone agit en stimulant la glycogénolyse hépatique.

3/ La somatostatine : hormone peptidique synthétisée par les cellules γ dont le rôle est hyperglycémiant.

Chez les mammifères, l'organisme contrôle l'équilibre entre la consommation cellulaire du glucose et sa production endogène hépatique et les apports exogènes. Les facteurs hormonaux comme l'insuline et le glucagon, des neurotransmetteurs et autres molécules participent à la régulation du

métabolisme glucidique afin de maintenir l'homéostasie (figure 5). Certains des signaux hormonaux favorisant la production d'insuline ont été étudiés dans le but de corriger le DNID tel que le glucagon intestinal (GLP-1) (Nauck, 1998).

Les régulations des sécrétions endocrines pancréatiques font donc intervenir de nombreuses molécules d'origines diverses: des hormones, mais aussi des neurotransmetteurs et des produits de la digestion.

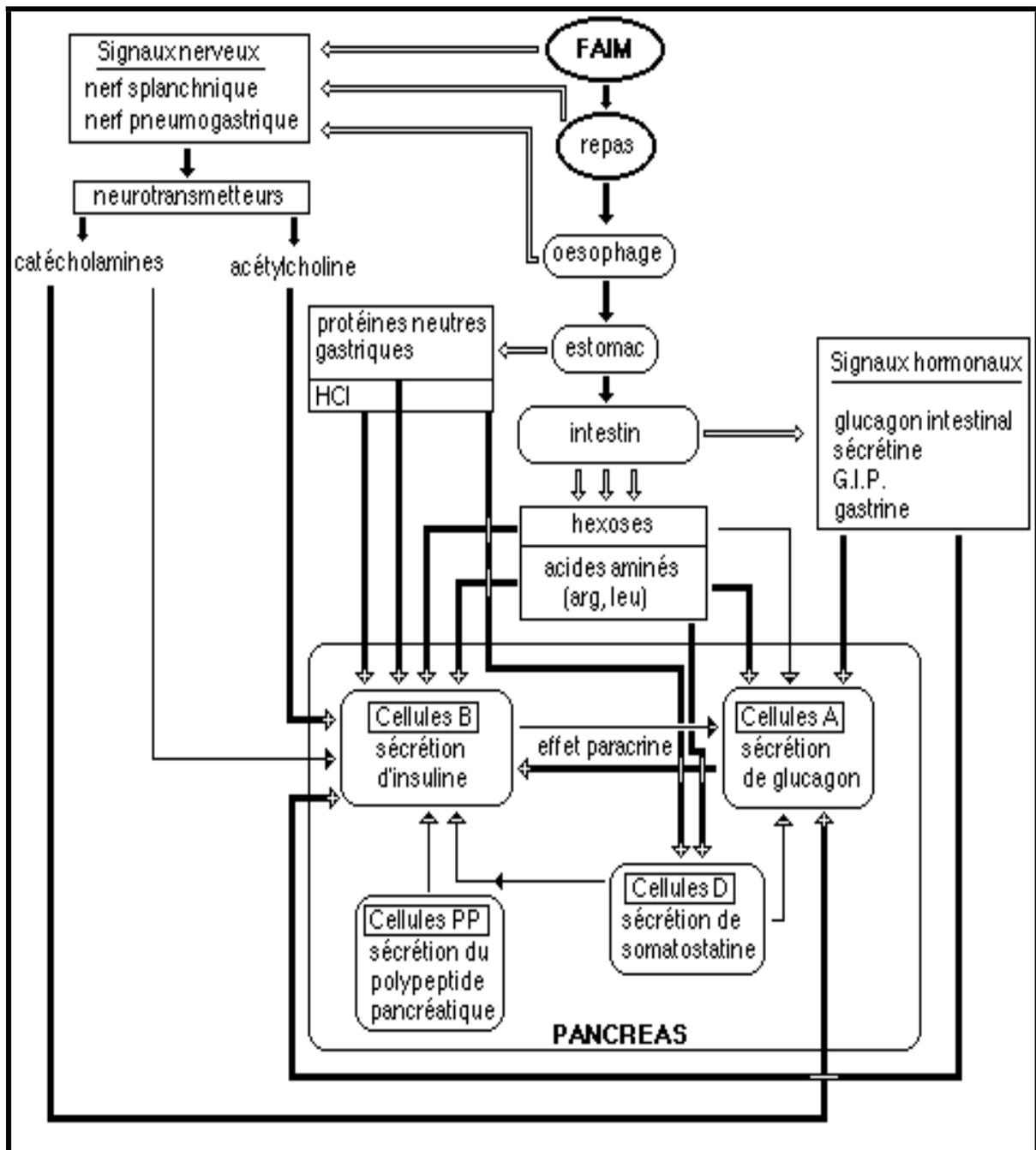


Figure 5 ♦ Régulation des sécrétions endocrines pancréatiques (Nauck, 1998).

1.2.3. La pancréatotoxicité à l'alloxane

L'Alloxane est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine (figure 6). Ce composé a une haute affinité pour l'eau existant sous forme monohydratée. Les données caractérisant l'Alloxane dans les conditions standards sont les suivantes :

Nom chimique : 2, 4, 5,6(1H, 3H)-pyrimidine tétraone monohydrate.

Structure chimique : C₄H₂N₂O₄

Masse moléculaire : 160,09 g/mol.

Point fondant : 253°C.

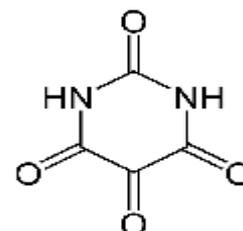


Figure 6 ♦ Structure chimique de l'Alloxane (Grankvist

et al., 1981)

L'Alloxane est un agent oxydant fort exerce une activité cytotoxique sur les cellules β par le produit de sa réduction, l'acide diallurique (Grankvist et al., 1981). Il établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes, associé à la formation de fortes doses de calcium dans le cytosol provoquant ainsi la destruction rapide des cellules β (Ammon et al., 1983 ; Lenzen et al., 1996). Cet effet délétère est inhérent à la vulnérabilité de ces cellules au stress oxydatif en raison d'une part, de leur pauvreté en $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ super oxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase, d'autre part au faible contenu en glutathion réduit (Grankvist et al., 1981). cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction des cellules β sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'Alloxane (Grankvist et al., 1981; Ammon et al., 1983 ; Lenzen et al., 1996).

1.2.4. Hyperglycémie chronique et complications organiques

L'hyperglycémie chronique est associée à des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les nerfs, les reins, le cœur et les vaisseaux (Racah, 2004), qui provoquent un risque de mortalité très élevé. A titre d'exemple la mortalité cardiovasculaire en France chez les personnes

atteintes d'un diabète de type 2 est approximativement le double de celle des sujets non diabétique (Drouin et al., 1999 ; Buysschaert et al., 1999).

1.2.5. Le diabète et le stress oxydatif

Les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A coté de l'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif (Guerci et al., 2001 ; Punitha et al., 2005). En effet, le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités d'espèces oxygénées activées dont font partie les radicaux libres (O_2 , OH ,..., le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif à l'origine des micro et des macro angiopathies (Pincemail et al., 1999 ; Huang et al., 2004).

1.2.6. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité

Généralement, tous ces agents antidiabétiques causent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament. Précisément, les sulfamides, insulinosécrétagogues, provoquent un état d'hypoglycémie. Cet effet est considéré comme principal à coté de l'hyponatrémie, l'hépatite, les atteintes hématologiques, l'éventuelle réaction dermatologique ainsi qu'un gain de poids dû à l'hyperinsulinémie (Marles and Farnsworth, 1994 ; Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002).

Suite à leurs effets secondaires néfastes, certains Biguanides, inhibiteurs de la néoglucogénèse et l'absorption intestinale du glucose, sont éliminés du marché. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, n'est plus disponible qu'aux USA car il provoque une acidose lactique, une fatigue, des nausées et une toxicité rénale (Dey lucey et al., 2002). L'acarbose ($C_{25}H_{43}NO_{18}$), un médicament de la classe des inhibiteurs des alpha-glucosidases présente divers effets secondaires, comme les gaz, le ballonnement et la diarrhée (Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002).

1.2.7. Espèces antidiabétiques

Pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques portent sur 1123 plantes utilisées traditionnellement contre le diabète (Racah, 2004).

Connues entre autres pour leur richesse en protéines ainsi que leur bénéfice sur le cancer du sein et les maladies cardiovasculaires, les algues auraient également des effets antidiabétiques. Selon les chercheurs de l'université d'Abertay Dundee, au Royaume-Uni, les extraits d'algues riches en polyphénols (antioxydants) bloqueraient l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase, des [enzymes](#) digestives impliquées dans la régulation du taux de glucose sanguin (glycémie).

Afin d'évaluer le rôle des algues sur le diabète, les auteurs ont testé l'effet des polyphénols extraits de quatre espèces d'algues marines (*Palmaria*, *Ascophyllum*, *Alaria* et *Ulva*) sur l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase.

Résultats : les polyphénols extraits des algues *Palmaria*, *Ascophyllum* et *Alaria* bloquent l'enzyme alpha-amylase. Par ailleurs, les polyphénols extraits de l'algue *Ascophyllum* bloquent également l'alpha-glucosidase.

« Les extraits d'algues ont la capacité de bloquer l'activité de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase à des doses qui sont facilement assimilables par l'intestin », concluent les scientifiques (F. Nwosu, J. Morris et al., 2010)

1.2.8. Diabète et nutrition

Selon Didier, 2011 ; dans le cas du diabète, et plus précisément de sa prévention, il est éminemment souhaitable de ne pas multiplier les subcarences en certains minéraux et oligo-éléments, du fait de leur importance cruciale :

- CHROME : cofacteur de l'insuline. Agit en se liant à l'insuline pour former un complexe permettant le transport de cette dernière jusqu'aux récepteurs cellulaires. Améliore la liaison de l'insuline à son récepteur. Stimule l'activité de la tyrosine kinase ; une enzyme qui régule l'activité du récepteur à l'insuline. Un déficit en chrome conduit à une diminution de la tolérance au glucose.

-ZINC : essentiel à la synthèse, à la sécrétion et au stockage de l'insuline. De plus, protège les récepteurs à l'insuline sur les membranes cellulaires.

-MAGNÉSIUM : nécessaire à la synthèse de l'insuline et à l'activation des récepteurs à l'insuline. Facilite le transport du glucose dans les cellules.

-VANADIUM : améliore l'utilisation de l'insuline.

-SOUFRE : l'un des composants de l'insuline. Favorise la régulation de la glycémie.

-MANGANÈSE : contribue à la régulation de la glycémie. Systématiquement déficient chez les diabétiques.

-NICKEL : renforce et prolonge l'action hypoglycémiante de l'insuline.

-COBALT : a également une action hypoglycémiante. À noter que le complexe zinc-nickel-cobalt est conseillé pour combattre l'attirance pour le sucré.

Autres nutriments importants dans la prise en charge du diabète et de ses complications, en particulier à travers leur action contre les radicaux libres :

-Oligo-éléments : sélénium

-Vitamines : A, B, C, E

-Phyto-composés : flavonoïdes

-Autres nutriments : acide alpha- lipoïque, coenzyme Q10

Chapitre 2:
La spiruline

2.1. Introduction

Le groupe des cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, compte parmi l'une des plus anciennes formes de vie sur Terre et constitue l'essentiel des bactéries capables de photosynthèse avec production d'oxygène. Parmi elles existe le genre *Spirulina* ou *Arthrospira*, des cyanobactéries filamenteuses dont fait partie une bactérie particulièrement intéressante dénommée *Spirulina platensis* (ou *Arthrospira platensis*) plus connue sous le nom de algue Spiruline. Consommée depuis des siècles par certains peuples primitifs d'Afrique et d'Amérique, et connue par les scientifiques depuis plusieurs décennies pour sa richesse nutritionnelle, elle fait l'objet d'une redécouverte depuis quelques années. Riche en nutriments tel que protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux. Compte tenu de ses caractéristiques, la culture de la spiruline pourrait être une solution pour améliorer la santé humaine, la nutrition notamment dans les pays du tiers-monde et également pour développer des cultures industrielles. Cette cyanobactérie semble actuellement l'une des meilleures solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité et, du fait, de grandes entreprises se sont lancées dans la culture de cet organisme à une échelle industrielle.

Outre des propriétés nutritionnelles avérées, la spiruline connaît aujourd'hui un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique internationale du fait de sa possible utilisation comme source de produits à vertus thérapeutiques. En effet, le potentiel de cette micro-algue semble être important et ceci principalement grâce à son principal pigment, la phycocyanine, donnant à cet organisme sa couleur bleu-vert caractéristique. Certaines études ont en outre mis en évidence des activités sur le système immunitaire, le cancer, le sida mais aussi des effets dans la lutte contre le vieillissement cellulaire, des propriétés hépatoprotectrices, anti-inflammations. La spiruline semble avoir un potentiel très vaste.

2.2. Historique de la spiruline

Les cyanobactéries, cyanobiontes ou encore cyanophycées selon les préférences, sont la famille d'algues bleues-vertes à laquelle appartient la spiruline, qui elle-même peut être indifféremment appelée *Arthrospira sp.* ou *Spirulina sp.* (alyah ariel, 2001). Ces organismes filamenteux poussent naturellement dans les eaux alcalines de certains lacs de la zone intertropicale et sont consommées depuis des siècles par certaines populations (Loïc Ch. et al, 2004).

La spiruline, bien que déjà décrite par Wittrock et Nordstedt en 1844, ne fut vraiment redécouverte qu'en 1940 au Tchad par un botaniste français du nom de Dangeard. Les Kanembous, tribu du Tchad, la consomment encore de nos jours sous le nom de Dihé (Farrar, 1966).

Depuis, on a su par les archives mexicaines que la spiruline était aussi consommée du temps des Aztèques (Farrar, 1966), bien avant l'arrivée des Espagnols, sous le nom de Tecuitlatl. Des traces de cyanobactérie ont déjà été détectées dans des stromatolithes (restes de filaments d'algue pétrifiés dans du calcaire) datant de quelques 3.7 milliards d'années, en Afrique du Sud (Perez, 1997). Mais avant, il est important de connaître les quelques régions du globe où elle pousse naturellement (alyah ariel, 2001).

Cependant, cette cyanobactérie resta une simple curiosité avant le 7ème congrès du pétrole en 1967 à Mexico, à l'occasion duquel des chercheurs de l'Institut Français du pétrole rendirent compte de leurs travaux sur la spiruline, qui jusque là sont restés confidentiels.

La première culture artisanale de spiruline méritant vraiment cette appellation revient sans doute à Fox Ripley qui fut le premier à lancer cette activité en Inde en 1973, en collaboration avec le Navsari Agricultural College (Loïc Ch. et al, 2004).

Depuis, maints progrès ont été faites pour permettre et améliorer son exploitation dans toutes les régions du monde, à petite échelle.

2.3. Distribution géographique naturelle

La spiruline croît naturellement dans la ceinture tropicale du globe, entre 35°N et 35°S environ. Elle arbore plusieurs différences interspécifiques selon son origine. Les deux espèces les mieux connues sont *Spirulina platensis* et *Spirulina maxima* (ariel alyah ; 2001).

Tableau 1 ♦ Zones potentiellement riches en spiruline (Fox, 1999)

AFRIQUE

Algérie : Tamanrasset

Tchad Région du Kanem : lacs Latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan,

Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom,

Ounianga kebir

Soudan : Cratère de Djebel Marra

Djibouti : Lac Abber

Ethiopie : Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe

Congo : Mougounga

Kenya : Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron

Tanzanie : Lac Natron

Tunisie : Lac Tunis; Chott el Jerid

Zambie : Lac Bangweoulou

Madagascar : Beaucoup de petits lacs près de Toliara

ASIE

Inde : Lacs Lonar et Nagpur

Myanmar : Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank

Sri Lanka : Lac Beira

Pakistan : Mares près de Lahore

Thaïlande : Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de Radburi, 80 km
au S.O. de Bangkok

Azerbaïdjan

AMERIQUE DU SUD

Pérou : Réservoir d'eau près de Paracas

Près de l'île d'Amantani dans le lac Titicaca

Mexique : Lac Texcoco ; lac Cratère

Uruguay ; Montevideo Equateur Lac Quiliotoa : cratère de 1km de diamètre

AMERIQUE DU NORD

Californie : Oakland ; Del Mar Beach

Haïti : Lac Gonâve

République Dominicaine : Lac Enriquillo

EUROPE

Hongrie

France : Camargue

AUTRES SITES POSSIBLES

Partout où vivent le flamant nain ; *Phoeniconaias minor* (Afrique et Asie)

et le flamant de James ; *Phoenicoparrus jamesi* (Amérique du sud)

Ethiopie: Lac Abiata

Kenya: Lac Rodolphe, lac Hannington

Tanzanie: Lac Manyara; lac Rukua

Zambie : Lac Mweru

Botswana : Makgadigka Salt Pans

Namibie : Etosha Salt Pan

Afrique du Sud : Etat libre d'Orange, près de Vaaldam

Bolivie : Lacs Colorado, Poopo, Chalviri, Salar d'Uyuni

Chili : Aguas Calientes, Lagunas Brava, lac Vilama, Salar de Surire

Mauritanie : Côte sud

Inde : Rann of Kutch ; Gujarat

Madagascar : Côte Ouest

Comme nous pouvons le voir sur ce tableau, la spiruline peut même pousser dans des lacs volcaniques (lac Quiliotoa, en Equateur). Plus généralement, elle croît dès que l'eau est riche en carbonate ou bicarbonate de sodium, d'autres

minéraux et une source d'azote fixe. C'est pourquoi peut en trouver aussi dans certains déserts, à l'endroit de ramassage de l'eau provenant occasionnellement des montagnes (Fox, 1999).

2.4. La culture de spiruline

2.4.1. Biologie de l'algue

Les cyanobactéries, famille de microorganismes à laquelle on inclut la spiruline, sont des bactéries Gram négative, faisant le même type de photosynthèse que les végétaux supérieurs (Lindblad et al. ,1998). Elles colonisent des milieux très divers : eau douce, eau de mer, eau saumâtre, et même en écosystème terrestre. Plusieurs d'entre elles peuvent fixer l'azote atmosphérique : ce sont les espèces à hétérocyste qui pullulent dans les étangs piscicoles riches en phosphate. Certaines sont toxiques. D'autres, qui sont utilisées comme engrais, aliment, source d'énergie ou de produits chimiques présentent un intérêt économique véridique (Richmond, 1986).

Comme les cyanobactéries se trouvent à la frontière du monde des végétaux et des bactéries, plusieurs définitions ont été attribuées à la spiruline. En référence, Richmond la décrit comme un microorganisme à filaments bleu-vert, mobiles, composés de cellules cylindriques disposées en trichomes hélicoïdaux. Ces filaments tournent autour de leur axe ; la spiruline n'a pas d'hétérocyste, elle ne peut donc pas fixer l'azote libre. La forme hélicoïdale du trichome, observable uniquement en milieu liquide est caractéristique du genre, mais les paramètres de l'hélice (épaisseur, longueur) varient selon les espèces, et même chez une même espèce (Richmond, 1986).

L'espèce mexicaine *Spirulina maxima* se caractérise par des trichomes de 7 à 9 μ de diamètre, de 70 à 80 μ de long, légèrement effilés aux extrémités, formant une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60 μ de diamètre. Les cellules constituantes des trichomes mesurent 5 à 7 μ de long et ne rétrécissent pas au niveau des articulations (Fox, 1999).

L'espèce du Tchad *Spirulina platensis* se compose de trichomes atteignant 350 μ de long, de 5 à 11 μ de diamètre, un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50 μ , diminuant légèrement vers les extrémités (Fox, 1999)

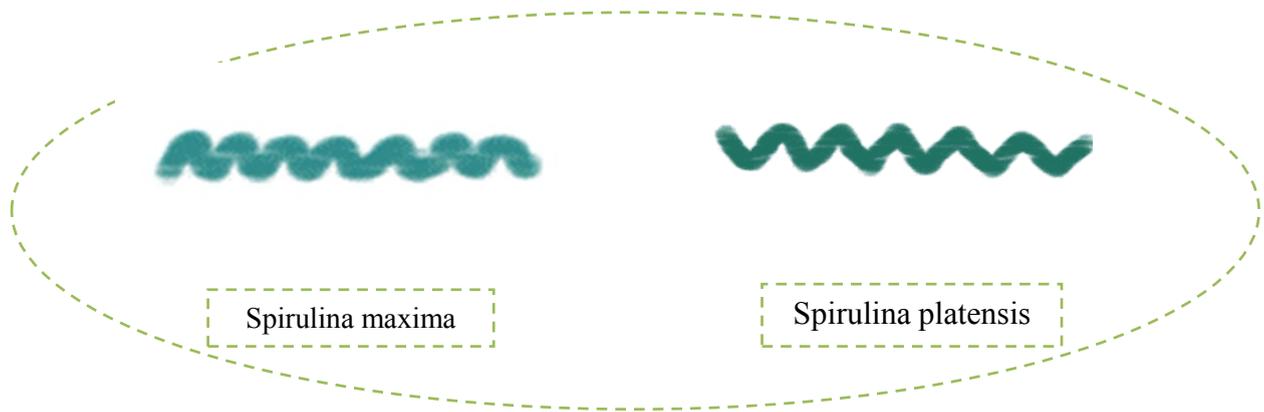


Figure 7 ♦ Filaments de spiruline observés au microscope optique (Fox, 1999)

Le tableau ci-après synthétise la taxonomie d'*Arthrospira platensis* (Tableau 2).

Tableau 2 ♦ Taxonomie récapitulative (Wheeler D.L. et al., 2000)

Règne	Monera ou Bacteria
Sous-règne	Prokaryota
Phylum ou Division	Cyanophyta ou Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Ordre	Oscillatoriales
Famille	Oscillatoriaceae
Genre	<i>Arthrospira</i>
Espèce	<i>platensis</i>

2.4.2. Bases techniques de la production

L'environnement doit comprendre une zone de température convenant à la plante, de la lumière fournissant l'énergie pour la photosynthèse, et de l'eau ; avec en plus, en algoculture, un certain mouvement de l'eau pour assurer une répartition moyenne de la lumière et des éléments nutritifs. Un équilibre acido-basique et un pH favorables à la plante doit être maintenu, un rythme de récolte et d'ajout d'éléments nutritifs doit être établi et la culture doit se faire dans un système ou un bassin convenablement conçu (Jourdan, 1997).

Dans le cas de la spiruline, la croissance optimale est obtenue pour une température de 34° à 40°C, avec une population dense, un ensoleillement généreux, un pH de 8.5 à 10.5 ; les éléments nutritifs essentiels doivent être en

quantité suffisante (le manque d'un d'entre eux inhibe la croissance), l'eau doit être suffisamment agitée (Jourdan, 1997).

Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduit à la photolyse des micro-algues. Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donne la croissance optimale – tous les filaments reçoivent des charges de lumière fréquentes et sont ensuite rapidement protégés d'une exposition trop longue par les autres filaments. En lumière et agitation faibles, la croissance est lente, mais la pigmentation plus marquée, c'est-à-dire que la couleur est d'un vert plus foncé et le bleu de la phycocyanine apparaît (Fox, 1999).

Le CO₂ étant moins soluble dans l'eau chaude que dans l'eau froide, l'élévation de la température réduit son taux, limitant la croissance. Une température trop basse réduit aussi la croissance. Donc, dans la zone de 34 à 40°C, l'addition de CO₂ stimule la croissance. En absorbant le CO₂ par photosynthèse, les algues remontent le pH. Le pH optimum pour la croissance de la spiruline est autour de 9.5 (Loïc Ch. Et al. ,2004)

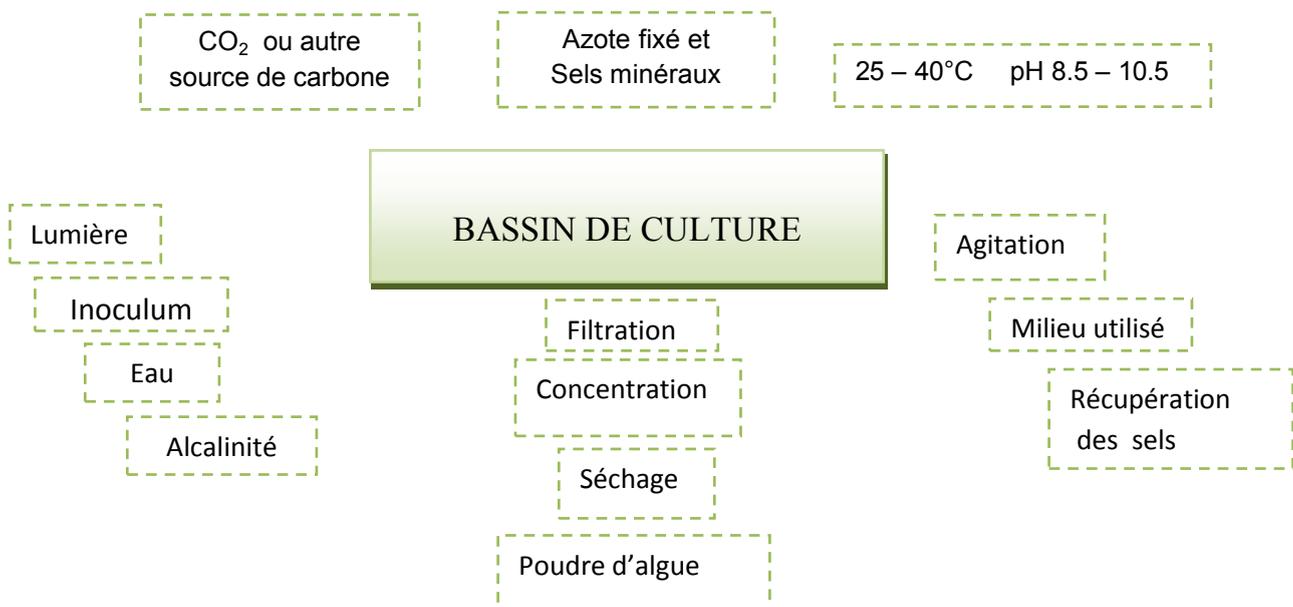


Figure 8 ♦ Diagramme récapitulatif des paramètres de culture et de traitement de la spiruline (Jourdan, 1997)

Le premier point que nous allons aborder en raison de son importance fondamentale pour la réussite d'une production concerne le milieu de culture.

2.4.2.1. Le milieu de culture

Les spirulines poussent dans une eau à la fois salée et alcaline. L'eau utilisée pour le milieu de culture doit être de préférence potable (toutefois sans excès de chlore à défaut de tuer les algues) ou au moins filtrée, le plus important étant l'élimination des algues étrangères. Une eau dure produira des boues minérales (plus ou moins abondantes selon la teneur en calcium, magnésium et fer), qui décantent rapidement et n'encombrent pas particulièrement la culture, à condition que l'ensemencement initial en spirulines soit assez concentré. La composition des milieux de culture peut varier énormément, selon la disponibilité des produits chimiques nécessaires à leur élaboration. Les limites de salinité et d'alcalinité permises sont généralement assez larges mais on se place souvent vers les minima, cela pour des raisons d'économie et de productivité, avec une salinité totale de 13 g/l ; lorsque le carbone est apporté par le bicarbonate, on a intérêt à travailler à forte alcalinité pour réduire le volume des purges (Jourdan, 1997).

L'alcalinité est habituellement apportée par du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), mais ce dernier peut être remplacé en partie par de la soude caustique ou du carbonate de sodium (Na_2CO_3) pour relever le pH initial du milieu de culture (par exemple 5 g/l de bicarbonate + 1,6 g/l de soude donnent un pH de 10) ; le carbonate ou la soude peuvent même être la seule source d'alcalinité à condition de les transformer en bicarbonates par addition de CO_2 ou par exposition à l'air avant usage. La salinité complémentaire est apportée par les différents engrais et du chlorure de sodium. Le sel de cuisine iodé et fluoré peut convenir mais souvent il contient jusqu'à 2 % de magnésie insoluble : mieux vaut utiliser un sel n'en contenant pas ; par contre l'emploi d'un sel peu raffiné est recommandé à cause de sa teneur en oligo-éléments. Si le sel apporte trop de magnésium, il y aura floculation de sels minéraux insolubles, surtout à pH assez élevé, ce qui peut être très gênant pour une culture qu'on ensemence peu concentrée en spiruline: celle-ci est en effet facilement entraînée par les flocculants et tombe au fond sans qu'on puisse la récupérer. C'est aussi pour cette raison que l'on évite l'addition de calcium lors d'un lancement de nouvelle culture. En plus du sel et de la soude, le milieu de culture contient des engrais pour assurer la croissance des spirulines comme en agriculture habituelle : l'azote, le phosphore, le potassium sont les éléments classiques, mais le soufre, le magnésium, le calcium et le fer doivent aussi être ajoutés s'ils ne sont pas apportés en quantité suffisante par l'eau. Une analyse de

l'eau et du sel est utile pour calculer la dose de Mg, Ca et Fe à ajouter car un excès de ces éléments est nocif (perte de phosphore, floculation). L'eau, le sel et les engrais apportent généralement assez de micro-éléments (bore, zinc, cobalt, molybdène, cuivre, etc.). Les sources d'azote préférées des spirulines sont l'ammoniac et l'urée, mais ces produits sont toxiques au-delà d'une concentration limite à respecter impérativement. C'est pourquoi on préfère souvent, au moins lors de la préparation du milieu de culture, utiliser un nitrate que l'on peut mettre à forte dose, constituant une réserve d'azote à long terme. Les spirulines consommeront d'abord l'ammoniac ou l'urée s'il y en a de disponibles. Une odeur persistante et forte indique qu'on a dépassé la limite en ammoniac et qu'il faut s'attendre à un mauvais état de la culture, passager ou irréversible selon la dose d'ammoniac présente (Jourdan, 1997).

2.4.2.2. Lumière et agitation

Comme en diminuant l'éclairement on diminue aussi la photosynthèse totale, il faut si possible éviter la photolyse autrement. Deux conditions sont nécessaires. Primo, ensemercer le bassin avec assez d'algues pour que la lumière ne puisse pas atteindre le fond du bassin. La vérification peut se faire avec un simple disque de Secchi. Secundo, agiter suffisamment la culture pour que les filaments individuels ne restent pas plus d'une demi-minute à la surface en plein soleil, mais plongent et remontent fréquemment. Les roues à aubes constituent les systèmes d'agitation les plus utilisés; le but est de remuer l'eau et non de créer un dénivellement comme on le croit généralement (Fox, 1999). L'emploi de longues roues à aubes flottantes est tout à fait possible dans de grand bassins peu profonds, car plus le bassin est grand, plus il est difficile de maintenir une roue à aubes conventionnelle. Au-delà de 4 à 5 m de longueur, il faut un palier intermédiaire qui sera dans le courant. Avec un bassin garni d'un film plastique, c'est difficile à réaliser en gardant l'étanchéité. La solution des longues roues est moins chère et demande moins d'énergie. Théoriquement, la photosynthèse la plus rapide serait obtenue avec une cadence des cycles ombre – lumière de mille par seconde ou plus. Pour le moment, ce n'est possible qu'en laboratoire. On peut tout de même obtenir une alternance de lumière et d'ombre toutes les quelques secondes, en mettant des déflecteurs dans le courant d'eau pour induire des turbulences; ainsi, on peut tripler facilement la production de biomasse – environ 30 g d'algue sèche par m² et par jour – par rapport à celle d'un bassin simplement agité par une roue à aubes (Fox, 1999).

2.4.2.3. Optimisation du rendement

La turbulence induite ramène le risque de photolyse pratiquement à rien. Après le couple de paramètres lumière/agitation, reste la température. Comme tout être photosynthétique, la spiruline perd de la biomasse sous forme de CO₂ pendant la respiration. Cette perte est plus grande si l'eau est plus chaude. Si la température nocturne est basse, il y a peu de perte de la biomasse produite pendant le jour. Le mieux serait une nuit froide et un réchauffement immédiat de l'eau au lever du soleil pour avoir une photosynthèse maximale pendant le jour, en tenant compte que la spiruline présente une croissance optimale à 35°C. Comme elle possède des pigments aptes à absorber l'énergie de tout le spectre visible, la photosynthèse est là à son maximum. Si on crée une turbulence à l'aide de déflecteurs creux, dans lesquels circule de l'eau chaude au lever du soleil, la photosynthèse démarre tout de suite à plein quand il faudrait environ 3H pour que l'eau soit suffisamment chauffée par le soleil seul. Avec ces améliorations, la production d'un bassin enrichi en CO₂ et agité par des roues à aubes peut être considérablement améliorée. 10 g d'algue sèche par jour et par m² est un chiffre fréquent chez les producteurs commerciaux. Comme signalé précédemment, les déflecteurs peuvent tripler cette production. Si la culture est chauffée au lever du soleil, elle produit pendant un temps allongé de 30%. En ajoutant la moindre perte pendant la nuit, on peut compter sur environ 40g d'algue sèche/m²/j (Fox, 1999).

2.4.2.4. Suivi des cultures

Selon Fox, 1999 le diagnostic des couleurs fournit généralement une bonne appréciation de l'état de la culture :

Une couleur pâlie indique souvent un manque d'azote fixé et/ou de CO₂ . et aussi, que du magnésium est nécessaire. Si l'examen au microscope ne montre qu'une couleur pâlie, il faut vérifier le pH. Au delà de 10.5, il y a manque de CO (ou de bicarbonate). Une couleur pâlie, surtout manquant de pigment bleu (phycocyanine), avec un pH en dessous de 10.5, indique le manque d'azote fixé. Si la couleur pâle est due à des cellules « vides », la culture a probablement été stressée, soit par un

changement brusque de pH, soit surtout par une brusque modification de la pression osmotique dans les cellules. S'il y a de l'écume, cela peut indiquer qu'en essayant d'équilibrer la pression dans les cellules avec celle du milieu brusquement plus chargé, la cellule a concentré son cytoplasme en expulsant les molécules plus légères. Dans ce cas, il faut ramener la salinité totale à son niveau d'origine. Bien des algues mourront si le choc osmotique a été sévère. D'autres survivront et redémarreront la culture à la nouvelle salinité. Le problème est d'éliminer les cellules mortes et les polysaccharides gélatineux libérés dans l'eau. Les masses gélatineuses piègent les filaments d'algues vivants, et finalement les entraînent au fond, où ils meurent faute de lumière et d'accès aux éléments nutritifs.

Une agitation renforcée de la culture aide à maintenir à flot les polysaccharides et aide aussi les filaments à ne pas être pris dans les amas de polysaccharides, où les algues mourront. Les bactéries consommeront les polysaccharides, seront à leur tour consommées par les protozoaires. Ceux-ci mourront quand ils auront dévoré les bactéries au point de dépenser plus d'énergie à les poursuivre qu'ils n'en tirent de leur absorption. Alors le milieu sera reminéralisé et prêt pour les algues.

Si, sous forte lumière, la culture est jaune ou vert-olive, il y a photolyse, ou destruction de la chlorophylle. Dans les conditions les plus sévères : forte intensité lumineuse, sursaturation en oxygène et faible température, on peut perdre la culture en quelques heures. Une agitation renforcée peut réduire la concentration en oxygène et si possible la culture doit être ombragée. Quand la lumière est très intense, il faudra aussi une température élevée (vers 38°C), une population dense et une forte agitation (turbulence) de la culture. Ces conditions favorisent la meilleure productivité. Une couleur jaunâtre avec écume peut signifier que les parois des cellules sont rompues, en expulsant des polysaccharides dans l'eau. Là aussi, il faut ombrager. Pour de petits bassins, on peut employer du filet plastique noir comme dans les serres horticoles, ou du tissu, ou des feuilles de palmier. On peut aussi abaisser le pH en jouant sur le CO₂ ou le bicarbonate et ajouter de l'azote fixé et du potassium. Si la culture est jaunâtre sur un fond d'eau grisâtre ou laiteux, les algues souffrent d'un défaut de carbone et peut-être d'azote, et de plus il y a beaucoup de bactéries.

Normalement les bactéries n'attaquent pas les algues, surtout si le brassage est rapide (mais pas trop pour briser les filaments).

Quand il n'y a plus de polysaccharides pour les bactéries, elles meurent.

S'il n'y a pas de couleur, les algues sont piégées dans des amas de polysaccharides et entraînées au fond ou prises dans des cristaux de carbonate de calcium ou de phosphate. Ou peut-être ont-elles été dévorées par des prédateurs : larves de moustiques, larves d'Ephydra (mouche des marais salés), protozoaires tels l'amibe et les rotifères. Il n'y a rien d'autre à faire que de nettoyer le bassin et recommencer. Moins de filaments peut être le signe d'une récolte trop poussée : le poids journalier de la récolte doit être constant ou en augmentation.

Une culture de microorganismes en plein air est facilement envahie par d'autres microorganismes apportés soit par l'air, soit par l'eau ; Organismes fixés sur des poussières amenées par le vent, insectes, mains et pieds du personnel, excréments d'insectes ou d'oiseaux, etc. L'algoculteur doit toujours garder un œil sur les contaminants que sont les bactéries, les autres micro-algues, les protozoaires et les larves d'insectes. D'où la nécessité d'avoir un petit laboratoire de contrôle.

2.4.3. Culture industrielle de cet organisme

Les nombreuses qualités de l'algue bleue ont poussé d'importantes sociétés à produire industriellement la spiruline : l'usine Sosa Texcoco au Mexique fut la première à se lancer dans l'aventure. En Californie, 21 hectares de terrain de la Vallée Impériale sont consacrés à la culture de spiruline pour satisfaire le marché américain mais aussi pour approvisionner une partie du marché japonais. Son prix de revient est important car cette production demande de gros moyens : beaucoup d'énergie pour faire tourner ces très grandes et lourdes roues à aubes qui agitent la culture et un gros investissement, en particulier pour un séchoir à atomisation comme ceux utilisés pour le lait en poudre. A Mysore, en Inde, la coopération allemande a beaucoup travaillé, dans les années 70 sur la culture des micro-algues pour combattre la malnutrition ; leurs réalisations sont encore assez sophistiquées. Au Vietnam, une petite ferme semi-industrielle était installée avant 1985 et vendait sa production aux pharmacies sous forme de pilules. Depuis, plusieurs productions de spiruline ont été installées dans le pays, plutôt des fermes familiales ou artisanales, comme celle de nos amis d'Helvinam (Ripley et Denise Fox, 2004).

De sa première exploitation industrielle, en 1976, par la société Sosa Texcoco basée au Mexique, plusieurs entreprises se sont implantées un peu partout : Siam

Algae Company à Bangkok en 1979, Earthrise farm aux Etats-Unis en 1983 (le plus gros producteur actuel), Cyanotech Corporation à Hawaï, etc. En 1995, il existe une vingtaine d'exploitations industrielles dans le monde (Fox, 1999). Actuellement, leur nombre avoisine la trentaine (alyah ariel, 2001).

2.5. Composition de *Spirulina platensis*

Il est bien établi que les variations de conditions de culture provoquent facilement de forts changements dans la composition biochimique des spirulines. Cependant en moyenne, la spiruline contient en poids sec jusqu'à 70 % de protéines, 15 à 25 % de glucides, jusqu'à 11 % de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux (principalement des oligoéléments), de la chlorophylle et des phycobiliprotéines (www.tga.gov.au/docs/html/compguid/platensis.htm,).

2.5.1. Protéines

Selon les souches et les conditions de culture, la quantité de protéines d'*Arthrospira platensis* varie de 55 à 70 % du poids sec (www.tga.gov.au/docs/html/compguid/platensis.htm,). Par sa composition protéique, la spiruline est un aliment très riche. Elle contient la plupart des acides aminés et notamment tous les acides aminés essentiels constituant près de 60% du poids total des protéines. Ce spectre d'acides aminés montre que la valeur biologique des protéines de la spiruline est élevée et pourrait sûrement être optimisée par les procédés de culture. Par exemple, il a été noté une variation du contenu en protéines de 10 à 15 % selon le moment de la récolte par rapport à la photopériode, ainsi les valeurs les plus fortes étant obtenues au début de la période lumineuse (Geitler , 1982).

2.5.2. Lipides totaux

Selon les publications la valeur du poids sec en lipides totaux varient de 5,6 à 11 % en poids (Ross E. et al., 1990) et même 14,3 % au maximum (Babadzhanov A.S. et al., 2004) Ces variations quantitatives mais aussi qualitatives sur la composition de ces lipides peuvent provenir de la méthode d'extraction et du moyen d'analyse utilisé ou simplement de la variété d'*Arthrospira platensis*.

Cette fraction lipidique se caractérise par un bon équilibre acides gras saturés/acides gras polyinsaturés (Charpy L. et al., 2004)

Les lipides peuvent être séparés en une fraction saponifiable (83 %) et une fraction insaponifiable (17 %) contenant essentiellement une paraffine, des pigments, des alcools terpéniques et des stérols (Ross E. et al., 1990)

2.5.3. Glucides

Les glucides constituent 15 à 25 % de la matière sèche des spirulines (Charpy L. et al., 2004) Ces hydrates de carbone composent notamment sa membrane cellulaire. Les parois cellulaires des spirulines s'apparentent à celles des bactéries Gram-positives puisqu'elles sont formées de glucosamines et d'acide muramique associés à des peptides. Les formes primaires des hydrates de carbone sont le rhamnose et le glycogène, deux polysaccharides facilement

absorbés par l'organisme (Babadzhanov A.S. et al., 2004). D'autres polysaccharides comme le calcium-spirulan (Ca-SP) sont composés de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, acide glucuronique, acide galacturonique, sulfate et calcium (Hayashi T. et al., 1996). Cependant les glucides simples ne sont présents qu'en très faibles quantités.

2.5.4. Acides nucléiques (ADN et ARN)

On rapporte des valeurs de 4,2 à 6 % d'acides nucléiques totaux dans la matière sèche chez *Spirulina platensis* (Ross E. et al., 1990).

2.5.5. Vitamines

Il existe 13 vitamines, 4 liposolubles (A, D, E, K) et 9 hydrosolubles (B1, B2, B5, B6, B12, C, PP). La spiruline contient de nombreuses d'entres elles et spécialement des vitamines B dans des proportions optimales.

2.5. 5.1. Vitamines hydrosolubles

Les vitamines constituent le principal facteur impliqué dans les propriétés biologiques des spirulines. Les vitamines identifiées en majorité chez *Spirulina platensis* sont (pour 100g de biomasse) : la vitamine C (42,0-195,3 mg), la vitamine B3 (0,6-5,3 mg), la vitamine B1 (0,8-15,4 mg), la vitamine B2 (0,2-0,9 mg), la vitamine B6 (0,3-4,0 mg), la vitamine B9 (0,2-0,6 mg) et la vitamine B12 (0,3-0,8 mg). Il faut noter que la biomasse poussant en printemps-été montre une proportion en vitamines plus élevée. Ceci dépendant essentiellement des conditions d'ensoleillement (Babadzhanov A.S. et al., 2004) (Tableau 3).

Tableau 3 ♦ Vitamines hydrosolubles contenues dans la biomasse de *Spirulina platensis* en fonction des saisons (mg/100g de matière sèche)
(Babadzhanov A.S. et al., 2004)

Vitamines hydrosolubles	Échantillon recueilli en	Échantillon recueilli en	Échantillon recueilli en	Échantillon recueilli au
	hiver	automne	été	Printemps
Acide ascorbique (Vit C)	42,8	4	106,2	195,3
Nicotinamide (Vit B3 ou Pyridoxine (Vit B6)	5	0,	0	0
Riboflavine (Vit B2)	4	0,	0	0
Thiamine (Vit B1)	0	0,	0	0
Cyanocobalamine (Vit B12)	11,6	1	0	0
Acide folique (Vit B9)	0	0,	0	0

2.5. 5.2. Vitamines liposolubles

Les trois vitamines liposolubles trouvées chez la spiruline sont le β -carotène, précurseur de la vitamine A, la vitamine E et la vitamine D (Tableau 4).

Tableau 4 ♦ Vitamines liposolubles contenues dans la biomasse de *Spirulina platensis*

(mg /100g de matière sèche) (Babadzhanov A.S. et al., 2004)

Vitamines	Quantités mg/100g
β -carotène (provitamine A)	64 à 200 mg/100g
Tocophérol (Vitamine E)	10 à 19 mg/100g
Vitamine D	12000 U soit 0,3

2.5. 6 .Minéraux et Oligoéléments

Les macroéléments ou minéraux se différencient des oligoéléments entre autres par les quantités quotidiennes que nous devons apporter à notre organisme. Les besoins en macroéléments sont de l'ordre du gramme (g) ou du dixième de gramme par jour tandis que ceux en oligoéléments sont de l'ordre du milligramme (mg) ou du centième de milligramme (μ g). Les oligoéléments ou éléments traces présents dans la spiruline sont le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, l'iode, le fluor, le chrome, le calcium et magnésium, les autres éléments, en quantité plus significative, sont considérés comme des minéraux (Avino P. et al., 2000)(Tableau 5).

Tableau 5 ♦ Minéraux et oligoéléments contenus chez *Spirulina platensis*
(Avino P. et al., 2000)

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

2.5.7. Métaux

La recherche des métaux chez les spirulines est réalisée pour l'étude de la toxicité potentielle plus que pour la mesure quantitative en éléments fonctionnels. Cependant, certains métaux comme le sélénium et le chrome sont nécessaires dans l'alimentation à des doses faibles. Bien que certains métaux soient aussi cités comme des oligoéléments, ils ont tout de même été répertoriés dans le tableau ci-après (Avino P. et al., 2000) (Tableau 6) :

Tableau 6 ♦ Niveaux des éléments traces chez *Spirulina platensis*(Avino P. et al., 2000)

Élément	Quantité dans échantillon de spiruline (mg/kg de matière sèche)
As	0,002
Br	17,9
Cd	< l.d
Co	0,720
Cr	14,2
Cs	0,021
Cu	37,5
Eu	0,023
Hg	0,120
La	0,514
Mn	27,88 à 554
Ni	< l.d
Pb	12,9
Sb	0,064
Sc	0,075
Se	0,198
V	< l.d
Zn	21 à 375

< l.d : inférieur à la limite de détection

2.5.8. Pigments

La spiruline est riche en pigments responsables de sa couleur. Les principaux pigments sont la phycocyanine et la chlorophylle.

La phycocyanine est une phycobiliprotéine. Seul colorant bleu alimentaire naturel, elle est le pigment le plus abondant de la spiruline et représente plus de 15 % du poids frais et plus de 20 % du poids sec de l'algue (Romay C. et al., 1998)

La chlorophylle est présente en proportion de 9-15 g/kg (Sall M.G. et al., 1999)

Les phycocyanines, composants de l'appareil photosynthétique des cyanobactéries, sont les protéines majeures de la spiruline. Naturellement colorées d'un bleu intense et pourvue d'une fluorescence rouge, elles sont responsables du bleuissement de la poudre de spiruline exposée trop longtemps à la lumière : moins sensible que la chlorophylle à la photo-destruction, leur couleur domine lorsque le vert chlorophyllien disparaît. C'est aussi aux phycocyanines que l'on doit l'intense couleur bleue qui apparaît plus ou moins rapidement lorsque l'on réhydrate de la spiruline séchée : l'éclatement des cellules libère ces protéines très solubles dans l'eau, alors que la chlorophylle reste associée aux débris cellulaires (Romay C. et al., 1998).

Les phycocyanines ont donné lieu à de nombreuses recherches scientifiques, détaillées plus loin, démontrant l'incroyable potentiel thérapeutique de ces protéines.

2.6. Les multiples usages de la spiruline

La spiruline est vieille de plus de trois milliards et demi d'années. Et elle a résisté ! Sans doute grâce à sa composition incroyable... Cette minuscule algue bleue contient en effet des protéines complètes, des acides aminés essentiels, une profusion de vitamines et une longue liste de minéraux et oligo-éléments. Elle apporte 25 fois plus de bêta carotène que la carotte, des pigments, de la chlorophylle... Cette algue bleue microscopique, La spiruline est composée de 65% de protéines et acides aminés ; Environ 9% du poids sec total est composé de minéraux essentiels ; 15% d'hydrocarbure ; 6,5% de lipides incluant 2,6% d'acides gras essentiels oméga 3 et oméga 6 non saturés (ceci est très élevé) plus une moyenne de 0,17% de bêta carotène (très, très élevé); les Vitamines B comprenant 4 microgrammes de la vitamine non-analogue B 12 dans chaque dose quotidienne de spiruline nécessaire à un adulte (Denise Fox ,2004).

2.6. 1. Approche nutritionnelle

La spiruline est connue pour sa richesse en protéines, qui constituent entre 50 et 70% de son poids sec. Ces protéines ont en plus l'avantage d'être facilement

assimilable par l'organisme, ce qui évite l'emploi de la cuisson qui altère les nutriments et les vitamines. Les acides aminés essentiels représentent 47% du poids total des protéines (Bujard & al. 1970).

La digestibilité de la spiruline est en plus accrue par l'absence de paroi cellulosique dans la cellule, remplacée par une enveloppe de muréine fragile. L'efficacité protéique (PER) d'un aliment est déterminé par le rapport « Gain de poids de l'animal ou de l'individu / poids de protéines ingérées ». La protéine de référence est souvent le lactalbumine ou bien la caséine, laquelle présente un PER de 2.5. La spiruline seule, au cours d'expériences menées sur le rat, a un PER de 1.90, tandis qu'accompagné de riz dans une proportion égale, cette valeur s'élève à 2.40 (Anusuya & Venkataraman, 1983).

Les lipides totaux représentent 5.6 à 7% du poids sec de la spiruline, parfois jusqu'à 11% selon le système d'extraction utilisé. Les acides gras font partie de la première fraction : l'acide γ -linoléique en constitue 10 à 20% chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *Spirulina platensis*, soit jusqu'à 4% de son poids sec total (Falquet, 1996). La spiruline figure ainsi parmi les meilleures sources d'acide gras essentiel, avec quelques huiles végétales peu connues (huile d'onagre, de bourrache, de cassis). Rappelons que ces acides sont des précurseurs des prostaglandines qui jouent le rôle de médiateurs chimiques dans les réactions inflammatoires et immunitaires. Une déficience prolongée en ces acides gras peut être à l'origine de thrombose, d'arthrite, d'accidents vasculaires cardiaques et cérébraux (Venkataraman, 1998)

L'autre fraction insaponifiable est composée de stérols, de terpènes et de paraffines. Certains de ces stérols pourraient partiellement expliquer l'activité antimicrobienne de la spiruline (Clément, 1975). Les glucides, constitués en majeure partie de polysaccharides représentent 15 à 25% de la matière sèche des spirulines, mais la seule substance glucidique intéressante pour son apport minéral, entre 350 et 850mg par kg de matière sèche, est le méso-inositol phosphate qui est une excellente source de phosphore organique (Quillet, 1975).

Toujours sur cette lancée nutritionnelle, une étude de 1993 portant sur 5000 enfants indiens d'âge préscolaire a montré la surprenante efficacité d'une dose quotidienne de 1 gramme de spiruline sur leur déficience chronique en vitamine A. Après 5 mois, la proportion d'enfants sérieusement carencés en vitamine A présentant le symptôme de la "tache de Bitot" sur la conjonctive de l'œil, est passée de 80% à 10% (Seshadri, 1993).

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 (alyah ariel, 2001).

Elle renferme aussi à plus faible quantité les vitamines hydrosolubles B1-B2-B6 (alyah ariel, 2001).

Parmi les éléments minéraux contenus dans la spiruline, le fer est sans doute le plus parlant. Les carences en fer à l'origine de l'anémie sont très répandues, surtout chez les femmes enceintes et les enfants, et lorsque les bonnes sources alimentaires de fer sont rares. Les céréales complètes, classées parmi les meilleures sources de fer, n'en contiennent que 150 à 250mg par kg. En plus, elles sont riches en acides phytique et en polymères phosphatés qui limitent fortement la biodisponibilité de leur fer. D'autre part, les suppléments sous forme de sulfate ferreux deviennent toxiques à forte dose et causent quelquefois des diarrhées. Dans le cas de la spiruline, la biodisponibilité du fer a été démontrée tant chez le rat que chez l'homme (Johnson & Shubert, 1986).

2.6. 2. Approche thérapeutique

On serait tenté d'affecter à la spiruline une image de potion magique, tellement ses propriétés médicales sont variées. Ce n'est pas moins un remède contre de nombreuses pathologies. Nous ne citerons ici que quelques unes de ces propriétés.

Après plusieurs années de recherche pour essayer de comprendre l'origine du cancer, il transparaît aujourd'hui comme étant le résultat d'un processus qui aboutit à la formation de radicaux libres dans l'organisme, suite à l'influence de différents facteurs tels que le stress physique et émotionnel, la pollution, etc. Ces radicaux libres peuvent endommager l'ADN, les protéines structurales, les enzymes et les membranes cellulaires et conduire à la formation de produits toxiques – et à terme au cancer. Pour éliminer ces radicaux libres, notre organisme a besoin d'apports en vitamines anti-oxydantes, caroténoïdes et autres micro-nutriments. Le β -carotène, présent en quantité très importante dans la spiruline, est l'un des principaux caroténoïdes impliqués dans ce système de défense de l'organisme (Fedkovic & al. ,1993). En 1995, une étude menée à Kerala a montré que chez 45% de ceux ayant avalé 1g de spiruline par jour pendant un an a été constaté la régression d'un cancer oral, contre 7% chez ceux qui ont juste pris un placebo. Pourtant après 1an de non-prise, 45% des lésions cancéreuses réapparaissent (Babu & al., 1995). La spiruline agit donc à moyen terme et s'avère plus efficace en traitement continu.

En 1996, des chercheurs japonais découvrent et baptisent « Calcium-spirulan » un extrait aqueux de spiruline particulièrement riche en calcium et en soufre. Le calcium-spirulan empêche la pénétration de la membrane cellulaire par certains virus comme le VIH-1, le Herpes Simplex, le virus de la grippe de type A et le virus de la rougeole. Les essais effectués sur des hamsters contaminés par le Herpès virus létal ont montré un taux de rétablissement très prometteur (Hayashi et al., 1996).

Les polysaccharides et la phycocyanine de la spiruline sont aussi connus pour leur effet immunostimulant.

Plusieurs produits pharmaceutiques destinés au soin des blessures contiennent de la spiruline. Une substance anti-bactérienne et anti-fongique a été identifiée en particulier chez *Spirulina platensis* ; d'autres auteurs mentionnent que c'est une propriété commune à toutes les spirulines. D'autres applications médicales de ces substances antibiotiques sont à envisager (Babu & al., 1995)..

La phycocyanine est aussi utilisée en imagerie médicale comme traceur fluorescent. Une fois purifiée, elle coûte entre 8000 et 40000\$ le gramme. Ce prix est justifié par la netteté d'image obtenue même sans utiliser de marqueur radioactif (Henrikson, 1999).

La spiruline renferme une variété de caroténoïdes (β -carotène, lutéine, zéaxanthine...) qui interviennent dans la protection de la peau, la vision et les défenses de l'organisme. Elle contient également deux antioxydants, la superoxyde dismutase (SOD) et la phycocyanine, ainsi que des acides gras essentiels dont l'acide γ -linolénique (AGL) qui prévient la formation du mauvais cholestérol (Mani & al., 1996).

La SOD ;superoxyde dismutase ; est une puissante enzyme antioxydante naturelle qui constitue l'un des principaux éléments du processus de défense de notre organisme contre les radicaux libres. Il semblerait qu'elle soit capable, entre autres, de favoriser la longévité : des travaux scientifiques, ont révélé que les mammifères produisant plus de SOD vivent plus longtemps que ceux en produisant moins.(Màj, 2011)

La spiruline, idéale pour tous : La spiruline convient idéalement aux femmes enceintes. En effet, la spiruline permettra aux futures mamans d'être sûres d'apporter à leur enfant tous les éléments essentiels à son développement et notamment de répondre au besoin accru en fer durant cette période. En comprimés comme en poudre, la spiruline apporte aux bébés et aux enfants des nutriments indispensables à la croissance. Une étude récente réalisée au Sénégal, sur 549 enfants d'une moyenne d'âge de 7 ans et demi, a démontré que la prise journalière de 2 g de spiruline pendant 2 mois augmente les performances scolaires. Enfin, la spiruline peut être conseillée aux personnes âgées dont l'alimentation est parfois insuffisamment équilibrée, afin de palier certaines carences

alimentaires (apport en protéines par exemple) et de maintenir un niveau de forme optimale le plus longtemps possible. De plus, avec l'âge, l'organisme a un besoin accru en antioxydants variés afin de limiter l'accélération du vieillissement cellulaire dû à l'augmentation de la production de radicaux libres (Màj, 2011)

2.6. 3. *Aquaculture et aquariophilie*

La spiruline n'est pas exclusivement réservée à la consommation humaine. En aquaculture, elle sert notamment à enrichir les granulés pour poissons (Sironval, 1993). Sa présence dans l'alimentation des poissons a des effets que les éleveurs recherchent et apprécient. En aquariophilie, sa première application concerne la pigmentation qu'elle induit chez les poissons par sa richesse en caroténoïdes ; chez la carpe Koï, ces pigments renforcent les motifs rouges et jaunes, tout en laissant un blanc pur brillant. Pour ce faire, son régime alimentaire doit inclure entre 5 et 20% de spiruline. Au Japon, ses qualités de pigmentation lui ont valu d'être employé pour la coloration des poissons servant à préparer le sushi, mais aussi des crustacés. D'autre part, sa richesse naturelle en nutriments en fait un complément alimentaire bénéfique pour les poissons tropicaux d'aquarium (Henson, 1993).

2.6. 4. Autres utilisations de la Spiruline

La Spiruline est utilisée en Asie dans la cosmétique (rouge à lèvres, crayons pour souligner les yeux) et comme colorants alimentaires (chewing-gums, produits laitiers, sorbets et gelées) (Màj, 2011).

La Spiruline peut être utilisée pour épurer des eaux usées au Brésil (Màj, 2011) Certaines protéines de l'excrétât de Spiruline possèdent une activité bactéricide(Henson, 1993).

Le médecin J.L. Vidalo (Institut Hippocampe) explique que la structure moléculaire de la phycocyanine présente une structure quasi similaire à l'érythropoïétine, le cœur de l'hémoglobine sanguine humaine. Elle permet à l'organisme de conserver des réserves d'oxygène suffisantes au sein du globule rouge et lui assure un fonctionnement plus "confortable" même dans des situations d'effort intense (Charpy L. et al., 2004)

La spiruline est également très utile dans les pays dits « développés » où les troubles de santé sont davantage liés à l'excès de nourriture qu'au manque ! .Outre ses nombreuses propriétés pouvant bénéficier aux populations souffrant de malnutrition ou de « surnutrition », la spiruline possède un effet qui intéresse tout le monde : elle stimule le système immunitaire, activant la production des globules rouges et des globules blancs. Par ailleurs, elle possède des propriétés anti-inflammatoires et antiallergiques. C'est également un aliment antioxydant de choix. (Sophie Lacoste, 2011)

2.7. Spiruline et diabète

L'organisme est exposé à de nombreuses agressions liées aux pathologies inflammatoires qui conduisent à une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène responsables du dysfonctionnement voire de la mort des cellules. Ce processus est à l'origine de maladies dégénératives liées à l'âge telles l'Alzheimer, athérosclérose, mais aussi **diabète** et cancer. 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 (NIDDM) survenant à l'âge adulte résulte de l'incapacité de l'organisme à fabriquer l'hormone de manière efficace (Capet & al., 1999). C'est le type le plus répandu. Les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A coté

de l'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif (Guerci et al., 2001 ; Punitha et al., 2005). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif (Pincemail et al., 1999; Huang et al., 2004).

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 glyco-lipidique chez les diabétiques (Mani & al., 1996). La fraction soluble dans l'eau de la Spiruline a la propriété de diminuer le taux de glucose dans le sérum. La prise de 5g par jour a mis en évidence une amélioration et un meilleur contrôle du diabète (Hayashi et al., 1996).

La spiruline fait partie de la famille des super aliments. Elle aide à conserver une bonne santé en général et améliore la glycémie en particulier. Une petite étude indienne a montré que la simple prise de 2 g par jour pendant 2 mois permettait de mieux contrôler la glycémie grâce à sa richesse en antioxydants (Didier, 2011).

Pour que les peptides antioxydants puissent exercer leurs effets, ils doivent être libérés des chaînes protéiques par des enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine) ou par des enzymes microbiennes. Des travaux ont montré que l' α - lactalbumine, libérant des fragments peptidiques par action de la thermolysine (métalloprotéase produite par de nombreuses bactéries, qui catalysent l'hydrolyse spécifique au niveau des acides aminés hydrophobes), permet le piégeage des radicaux libres. Ce fort pouvoir antioxydant s'explique par la présence du tryptophane, constitutif de ces fragments peptidiques ; ce tryptophane intervient en transférant un atome d'hydrogène à l'espèce radicalaire et bloque sa réactivité. L'une des protéines les plus efficaces dans la lutte contre les ERO est le glutathion, synthétisé par nos cellules. Le glutathion est un peptide composé de trois acides aminés dont la cystéine est le facteur limitant sa synthèse. Les protéines du petit-lait (sérum albumine, α - glutathion. De plus le glutathion joue un rôle déterminant dans l'action des vitamines C et E (antioxydants apportés par l'alimentation) en les recyclant systématiquement sitôt qu'elles sont oxydées (Didier, 2011).

2.8. Non toxicité de la Spiruline

La Spiruline n'est pas toxique. En effet, elle ne possède pas les gènes qui assurent la synthèse des toxines de cyanobactéries. Par contre, de nombreuses autres cyanobactéries sont toxiques mais le milieu très alcalin dans lequel pousse la Spiruline, ne leur permet pas de se développer. Aucun cas avéré d'intoxication par la Spiruline n'a été rapporté (Charpy L. et al., 2004)

Chapitre 3 :
Les
probiotiques

3.1. Définitions et généralités

Les définitions du terme probiotique ont évolué avec le temps et la réflexion des chercheurs, des industriels et des spécialistes de la communication au grand public. Lilly et Stillwell qui furent apparemment les premiers en 1965 à utiliser le terme choisirent des « Facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes ».

En 1974, Parker choisit d'élargir la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cependant ; Fuller reprocha à cette nouvelle définition d'inclure potentiellement les antibiotiques et proposa alors : « Des micro-organismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Luquet F. et Corrieu G., 2005).

Et selon Gournier – Château N. et all (1994); le terme de probiotique dérive des deux mots grecs « pro » et « bio » et signifie littéralement « en faveur de la vie » par opposition au terme antibiotique signifiant « contre la vie ».

Trois éléments sont depuis venus influencer une révision de la définition.

Le premier est que certains micro-organismes peuvent avoir des effets sur l'hôte sans nécessairement modifier sa flore (effets directs enzymatique ou par une immunomodulation). Les termes de « micro-organismes en transit » (Marteu, 1994 In Luquet F. et Corrieu G., 2005) et « d'agents biothérapeutiques » (Elmer, 1996 In Luquet F. et Corrieu G., 2005) étaient alors proposés. Ils apparaissaient plus « factuels » puisqu'ils ne préjugeaient pas d'un mécanisme d'action mais n'ont pas été retenus probablement du fait de la connotation très positive du terme probiotique.

Le second est l'intérêt de certains industriels à ne pas labelliser « probiotique » des micro-organismes « génériques », tout particulièrement ceux du yaourt standard pour réserver ce label à des produits contenant des micro-organismes dont la valeur ajoutée justifie un coût supérieur .

Le troisième était le désir de certains chercheurs et de nombreux industriels d'exclure de la définition les micro-organismes tués . En effet, si certains micro-organismes tués par la chaleur peuvent exercer certains effets bénéfiques pour l'hôte, des travaux ont montré que ces effets étaient en règle générale moins marqués que ceux des micro-organismes ingérés vivants (Luquet F. et Corrieu G., 2005).

La Food and Agriculture Organisation des Nations unies et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme

«probiotiques» dans les aliments et formulé la définition : «micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités qui produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte» (Antoine J.M., 2011)

3.1.1. Probiotiques

Microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

Les probiotiques sont des microbes vivants qui peuvent être intégrés dans différents types de produits, y compris les aliments, les substances médicamenteuses et les suppléments alimentaires. Les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont plus communément utilisées comme probiotiques, (Francisco Guarner et al, 2008)

3.1.2. Prébiotiques

Substances résistantes aux étapes de la digestion avec effet physiologique bénéfique sur l'hôte en stimulant de manière sélective la croissance favorable ou l'activité d'un nombre limité de bactéries indigènes.

Les prébiotiques sont des substances alimentaires (consistant surtout en polysaccharides sans amidon et oligosaccharides peu digérés par les enzymes humains) qui nourrissent un groupe sélectif de microorganismes vivant dans l'intestin. Ils favorisent la croissance des bactéries à effet positif aux dépens des autres (Francisco Guarner et al, 2008)

3.1.3. Synbiotiques

Produits qui contiennent à la fois des probiotiques et des prébiotiques

Un produit synbiotique exerce un effet pré et probiotique (Francisco Guarner et al, 2008)

3.2. Composition et sélection

Les probiotiques sont des micro-organismes ingéré vivants .Généralement, il s'agit de bactéries ou de levures présents soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des médicaments ou des compléments alimentaires .Dans ce dernier cas, la forme lyophilisée est la plus courante. Les genre bactériens les plus fréquemment retrouvés dans des préparations revendiquant des propriétés probiotiques sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* , *Enterococcus faecium* , et *Saccharomyces* (Luquet F. et Corrieu G., 2005).

Plusieurs critères ont été proposés pour aider les industriels à rationaliser leur sélection des souches qui auraient les meilleures chances d'avoir des propriétés probiotiques.

Tableau 7 ♦ Caractéristiques proposées comme critères pour aider à la sélection des micro-organismes potentiellement probiotiques (Luquet F. et Corrieu G., 2005).

Absence de toxicité ou pathogénie
Possibilité de production en grande échelle
Production de substances d'intérêt 'bactériocines...'
Résistance à l'acide, à la bile
Améliorer l'état général de santé
Adhérence à diverses lignées de cellules intestinales ou au mucus
Possibilité de protection
Garantir une bonne hygiène digestive en favorisant le maintien de l'équilibre de la microflore gastro-intestinale

3.3. Les effets bénéfiques

Un certain nombre d'effets sur la santé sont associés à l'utilisation du probiotique parmi eux : (Babel F.G., 1977)

- Réduction (de risque) des troubles intestinaux (infections gastro – intestinales, constipation) ;
- Amélioration de la digestibilité de la ration alimentaire (par exemple : protéines ; polysaccharides)
- Modulation et stimulation du système immunitaire
- Effet anti-cancérigène ;
- Stabilisation et équilibre de la microflore intestinale ;
- Réduction du risque et durée du diarrhée;
- Inhibitions des bactéries indésirables et pathogènes (infection gastrointestinale : *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* ; infections de l'étendue urinaires ; infections de l'étendue respiratoire) ;
- Aide à la digestion du lactose par l'activité de B-galactosidase bactérienne
- Réduction du risque de maladies (asthme, allergie alimentaire, eczéma, dermite, rhume des foins) ;
- Effets bénéfiques sur les malades inflammatoires chroniques de l'intestin ;
- Contrôle de syndrome de l'intestin irritable ;
- Baisser du taux de cholestérol dans le sang ;

3.4. Les bifidobactéries, morphologie et caractéristiques taxonomiques :

Au cours de ses recherches sur la flore du nourrisson en 1899 et 1900, Tissier découvre des bacilles à Gram positifs incurvés, souvent bifides, qu'il nomme *Bacillus bifidus commu-nis*. De 1900 à 1957, cette espèce est incluse dans la famille des *Lactobacillaceae* sous le nom de *Lactobacillus bifidus* (Holland, 1920). En 1927, Orla-Jensen reconnaît l'existence du genre *Bifidobacterium* mais étant donné ses similitudes avec le genre *Lacto-bacillus*, les bifidobactéries resteront assimilées au genre *Lactobacillus* jus-qu'en 1957. En 1957, Dehnart réalise qu'il existe plusieurs biotypes de

Bifidobacterium. Il faudra attendre 1963 pour que Reuter découvre sept espèces du genre *Bifidobacterium*.

C'est dans la 8e édition du Bergey's Manual of determinative Bacteriology (Rogosa, 1974) que le genre *Bifidobacterium* est reconnu. Il est inclus dans la famille *Actinomycetaceae* de l'ordre des Actinomycetales (Biavati *et al.*, 2000).

Ces bactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, cellules courtes, coccoidales, cellules ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînes, disposées en V ou en palissade. Ces bactéries sont Gram⁺, non acido-alcool-résistantes, non sporulées, immobiles, anaérobies, bien que quelques espèces tolèrent l'oxygène en présence de CO₂. De nombreux facteurs du milieu modifient la morphologie de la bactérie : de nombreux acides aminés (alanine, acide aspartique, acide glutamique et sérine), les ions Ca²⁺ (Husain I. *et al.*, 1972).

Le genre est caractérisé par la présence d'une enzyme : la fructose-6-phosphate phosphocétolase. La température de croissance ne dépasse pas 39° C pour les espèces d'origine humaine, alors que les espèces d'origine animale préfèrent 43°C-45°C. *Bifidobacterium bifidus* meurt à 60°C. La croissance n'est pas possible à pH 4.5-5 et pH 8-8.5. Ces bactéries sont glucidolytiques et produisent de l'acide acétique et lactique (Husain I. *et al.*, 1972).

Ces bactéries produisent de petites quantités d'acide formique, d'éthanol et d'acide succinique. Les acides butyrique et propionique ne sont pas produits. Les espèces sont en générale catalase⁻ sauf *Bf .indicum* et *Bf .asteroides*. La présence d'α-galactosidase différencie rapidement les *Bifidobacterium* des *Lactobacillus* (Husain I. *et al.*, 1972).

Chez l'homme, les *Bifidobacterium* sont des commensaux de la bouche, de l'intestin, des bronches et du vagin. Chez l'animal, ils sont surtout mis en évidence dans la flore intestinale. De plus, on les trouve en grandes quantités dans les eaux résiduaires, chacun pense à les utiliser comme marqueur d'une contamination fécale d'origine soit humaine soit animale. La plupart des espèces humaines sont d'origine soit intestinale, soit vaginale. *Bf .bifidum* var. a est intestinal, *Bf .bifidum* var. b domine la flore fécale du nourrisson au sein. *Bf .infantis* est isolé de fèces de nourrisson et d'adulte ainsi que de la flore vaginale mais on le trouve également chez le veau avant sevrage. *Bf .breve* et *Bf .longum* ont le même habitat que le précédent mais survivent dans les eaux résiduaires. *Bf .adolescentis* n'est décrit chez l'adulte au niveau intestinal et fait partie de la population microbienne du rumen. *Bf .dentium* est la seule espèce potentiellement

pathogène mais physiologiquement identique à *Bf .adolescentis* non pathogène (Husain I. et al., 1972).

Les *Bifideobacterium* sont strictement anaérobies mais la tolérance à l'oxygène dépend du milieu de culture .Parmi les souches capables de se développer en présence d'oxygène quelques unes restent catalase⁻, d'autres deviennent catalase⁺ (Husain I. et al., 1972)

Bifidobacterium produit la thiamine (B1), la pyridoxine (B6), l'acide folique (B9), la cyanocobalamine (B12) et l'acide nicotinique (PP) .Les vitamines B6, B9 et B12 sont excrétées. *Bf. Bifidum* et *Bf. infantis* sont de bons producteurs de thiamine, d'acide folique et d'acide nicotinique contrairement à *Bf. Adolescentis*, *Bf .breve* et *Bf.infantis* produisent beaucoup de vitamines PP et H (biotine)

Neuf espèces de *Bifidobacterium* sont d'origine humaine : *Bf .bifidum*, *Bf.longum*, *Bf .infantis* , *Bf .breve* , *Bf .adolescentis* , *Bf .angulantum* , *Bf catenulatum*, *Bf.pseudocatenulatum* et *Bf dentium* (isolé de caries dentaires) (Husain I. et al., 1972)

3.5. Les bifidobactéries et leur action au niveau du tractus gastro-intestinal (Ballongue J. et al., 1993)

Les enzymes intracellulaires de *Bifidobacterium* pourraient dégrader les sites d'adhésion spécifiques des bactéries pathogènes ou de leurs toxines.

Quelques souches sont capables de résister à l'acidité gastrique .Les *bifidobactéries* influencent la maturation et le cycle de développement des anthérocytes. Ils sont impliqués dans le remplacement des mucines intestinales et auraient une action immunogène.

Sur le plan nutritionnel, les *Bfidobacterium* apportent des vitamine (B1, B6, B12 et PP), des acides aminés (alanine, valine , acide aspartique et thréonine) et produisent de l'acide L-lactique assimilable. Comme les bactéries du yaourt ils peuvent contribuer à supprimer l'intolérance au lactose. Comme les autres bactéries lactiques, les *Bifidobacterium* auraient une action hypocholestérolémiante dans le plasma. La plupart des *Bifidobacterium* peuvent hydrolyser dans le colon le taurocholate de sodium et le glycocholate. Ils augment l'activité de la B-glucosidase fécale.

Bf. longum a un effet barrière contre *E.coli* chez le rat. Chez les patients leucémique traités par chimiothérapie, *Bf. longum* tend à maintenir une microflore intestinale normale. En une semaine *Bf. longum* élimine *E. coli* inoculée par voie intragastrique dans une souris axénique. Cette bactérie affecte l'immunité cellulaire et tumorale. Les diarrhées infantiles à rotavirus sont inhibées par *Bf. longum*. L'implantation des *Bifidobacterium*, stimulé par l'allaitement maternel, a un effet bactériostatique sur *E. coli* et les bactéries Gram négatives. L'acidité stimule les mouvements péristaltiques de l'intestin, ce qui facilite l'élimination des pathogènes.

Bf. Longum aurait un effet antitumoral au niveau du foie chez la souris. Les *Bifidobactéries* s'opposeraient aux désordres provoqués chez les prématurés soumis à des traitements antibiotiques. *Bf. longum* régularise le transit intestinal des femmes enceintes, et *Bf. breve* restaure la microflore et régularise le transit intestinal des enfants ayant subi des diarrhées.

L'accroissement des *bifidobactéries* dans le colon bénéficie à la santé humaine par la production de composés qui inhibent des agents pathogènes potentiels en réduisant la teneur du sang en ammoniaque et en produisant des vitamines et des enzymes digestives.

3.6. Méthodes de recherche traditionnelles des bifidobactéries

La détermination de la présence ou de l'absence de souches appartenant à une espèce du genre *Bifidobacterium* par méthodes traditionnelles nécessite en général 3 étapes : la détection, une confirmation de leur appartenance au genre et une identification au niveau de l'espèce (Delcenserie V. et al. , 2002)

❖ La détection

Il n'existe pas de méthodes fiables de dénombrement de bifidobactéries à partir d'échantillons polycontaminés. La détermination semi-quantitative est réalisée en effectuant la détection décrite ci-dessous à partir de dilutions successives de la suspension - mère réalisée à partir de l'aliment.

- Enrichissement

Il est nécessaire dans le cas où le taux de bifidobactéries est faible. Il nécessite le recours à des milieux utilisés sous forme de bouillons le plus souvent enrichis en acide propionique. Après la mise en culture, une incubation en anaérobiose de 18h à 72h selon

le type de milieu est requise. La température de croissance idéale se situe entre 37°C et 39°C selon les espèces de bifidobactéries. Ces milieux contiennent des substances favorables à la croissance de la plupart des bactéries et ne sont donc en rien sélectifs. Les conditions d'incubation, elles, permettent de ne sélectionner que les bactéries anaérobies strictes ou facultatives (Delcenserie V. et al. , 2002)

- **Isolement**

Des substances telles que des antibiotiques ou des acides n'ont pas d'effets favorables sur la croissance des bifidobactéries, mais sont limitantes pour la croissance d'autres bactéries. L'ajout de ces substances à des milieux de culture dans des proportions variables permet de réaliser des milieux sélectifs. Leur efficacité n'est cependant pas parfaite. Dans certains cas, des bactéries du genre *Clostridium* ou *Lactobacillus* peuvent encore croître. Une étape de confirmation est donc nécessaire afin de vérifier qu'il s'agit bien de bifidobactéries (Delcenserie V. et al. , 2002)

❖ **La confirmation du genre *Bifidobacterium***

Le test de confirmation le plus efficace est le test de la fructose-6-phosphate-phosphokétolase (F6PPK). Cette enzyme est absente chez les bactéries Gram positives anaérobies ayant une morphologie pseudobifide telles que les *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et *Actinomyces* et est donc un bon élément de différenciation étant donné que toutes les espèces du genre *Bifidobacterium*, elles, possèdent l'enzyme (Scardovi et Trovatelli, 1965 ;Gavini *et al.*, 1996). La formation d'acétyl-P à partir de fructose-6-P est visualisée par la formation d'une couleur violette (absorption maximum à 505 nm) due à la chélation du fer de la molécule $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$. C'est un test facile à réaliser, qui permet une bonne identification finale des *bifidobactéries* en culture pure (Scardovi V., 1965 in Sneath P et al., 1986).

❖ **L'identification au niveau de l'espèce Bifidobactérium**

Après avoir confirmé le genre *Bifidobactérium*, une identification au niveau de l'espèce *Bifidobactérium* d'après ces caractéristiques phénotypiques est possible. Il existe aussi un système d'identification numérique développé sur internet ([http:// kounou.Lille.inra.fr](http://kounou.Lille.inra.fr)) qui, à l'aide des galeries API 50CH et ID32A, permet l'identification de 7 espèces d'origine humaine et 4 espèces d'origine animale (Scardovi V., 1965 in Sneath P et al., 1986)

Matériel et méthodes

1. L'objectif de l'étude

Il s'agit de la détermination du pouvoir antioxydant de la spiruline en association avec les bifidobactériums sur le type -II- de diabète le plus répandu qui résulte de l'incapacité de l'organisme à fabriquer l'hormone pancréatique de manière efficace, après évaluation de la spiruline par analyses physico-chimiques et microbiologiques effectuées au niveau du laboratoire régional d'intendance de Blida durant une période de 3mois, allant du mois d'avril au mois de juin ; avant de l'avoir associée à une souche bifide afin de faire des essais *in vivo* sur les souris au niveau du complexe antibioticale Sidal de Médéa.

2. Matériel végétal et souche

2.1. la spiruline : (nature, origine, aspect)

La spiruline déshydratée étudiée ou *Spirulina platensis*, provient de Tamanrasset). La spiruline utilisée se présente sous forme d'une poudre verte, son odeur est bien marquée ; elle se colle ni aux doigts ni à la verrerie au cours des différentes manipulations.



Figure 9 ♦ poudre de la spiruline (photo originale, 2013)

2.2. La souche bifide utilisée :

Les bifidobactéries proviennent des selles fraîches des nourrissons sains de 3 mois. Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable. L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cysteiné à 37°C. Après 48h 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. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS cysteiné, à pH 6,4 additionné de 15 µg/ mL d'acide nalidixique. Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37 °C. 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. Après les souches seront repiquées sur MRS cysteiné à pH 6,4(Doumendji A., 2007).

3. Echantillonnage

La préparation de l'échantillon et le prélèvement de la portion servant à l'analyse sont les deux premières étapes d'une analyse physico-chimique. Ces étapes sont importantes pour la réussite d'une analyse, car l'exactitude du résultat en dépend. L'aliquote prélevé pour l'analyse doit être le plus représentatif possible. Certaines analyses telles les analyses microbiologiques et l'humidité nécessite le prélèvement de la partie aliquote dès l'ouverture

4. Méthodes d'analyse

4.1. Analyses physico-chimiques de la spiruline

Le contrôle physico-chimique est réalisé par la mesure de la matière sèche, le pH, les lipides, les sucres, les protéines, les minéraux, les polyphénols et le pouvoir antioxydant.

4.1.1. Détermination de la teneur en eau selon la méthode de le Meste M., Simatos D. et Lorient D., 2002.

Principe

La teneur en eau a été déterminée sur une partie aliquote de quelques grammes d'échantillon séchée dans une étuve réglée à une température de 103⁰ C pendant 4 h.

Nombre de déterminations

On effectue trois déterminations sur le même échantillon pour laboratoire.

Expression des résultats

La teneur en eau, exprimée en pourcentage en masse du produit tel quel, est égal à :

$$\%H = (m_0 - m_1) \chi \frac{100}{m_0}$$

Où :

m_0 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai

m_1 : est la masse, en grammes, de la prise d'essai après séchage.

On prend comme résultat la moyenne arithmétique des déterminations vu que la condition de répétabilité est remplie.

4.1.2. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH) selon la norme ISO 1842, NA 2233, 1993

Principe

Mesurage de la différence de potentiel entre deux électrodes, plongées dans la spiruline après reconstitution.

Le pH mètre de type (Inlabo Multi 720) utilisé, permet une lecture directe du pH de la solution analysée.

4.1.3. Détermination de la teneur en azote en vue du calcul de la teneur en protéines brutes selon la méthode Kjeldahl (norme ISO 646 modifiée par LCI)

Cette norme spécifie une méthode de détermination de la teneur en azote totale des aliments selon la méthode de Kjeldahl, et une méthode de calcul de la teneur en protéines brutes.

Principe

Minéralisation de la matière organique par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, alcalinisation des produits de la réaction, distillation et titrage de l'ammoniac libéré. Calcul de la teneur en azote et multiplication des résultats par le facteur conventionnel 6,25 afin d'obtenir la teneur en protéines brutes.

La masse d'échantillon prise qui est de 1g ; va être analysée comme suit :

- la minéralisation de l'échantillon : pendant cette étape ; l'azote protéique se transforme en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique ; qui sert aussi à piéger l'ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d'ammonium par action de l'acide et la base ; en présence d'un catalyseur « sulfate de cuivre » et du sel K_2SO_4 qui a pour but d'élever le point d'ébullition de la solution pour accélérer la réaction de minéralisation
- la distillation de l'ammoniac : avant de distiller l'ammoniac sous la forme du sel $(NH_4)_2SO_4$ par l'addition d'une solution de NaOH en excès ajouter 50mL d'eau pour dissoudre complètement les sulfates. Le distillat d'ammoniac est recueilli dans 150mL d'acide borique afin de former des sels borates d'ammonium.
- titrage de l'ammoniac : l'ammoniac sous forme de borates d'ammonium est titré directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide sulfurique et d'un indicateur mixte (mélange de bleu de méthylène et de rouge de méthyle). Ce titrage est recommandé car il facilite la vérification de la fin de distillation par changement de la coloration de l'indicateur mixte

Nombre de déterminations

Nous avons effectué quatre déterminations sur le même échantillon pour essai

Expression des résultats

La teneur en azote, exprimé en pourcentage en masse du produit, est égal à

$$\% N = \frac{(v_1 - v_0) \times N \times 0,014 \times 100}{m} = \frac{1,4(v_1 - v_0) \times N}{m}$$

Où

V_0 : est le volume, en mL, de la solution d'acide sulfurique utilisé pour l'essai à blanc

V_1 : est le volume, en mL, de la solution d'acide sulfurique utilisé pour les déterminations

N : est la normalité de la solution d'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique utilisé pour le titrage (0,1N ,0.25 N).

m : est la masse, en grammes, de la prise d'essai

Calcul du pourcentage des protéines dans l'échantillon

Le pourcentage de protéines dans l'échantillon est obtenu en multipliant le pourcentage d'azote par le facteur 6,25

$$\% \text{ protéines} = \% N \times F$$

4.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse **selon la méthode Soxhlet**

La méthode soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la teneur en matières grasses dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

Principe

L'échantillon issu de la détermination de l'humidité est réutilisé pour la détermination de la matière grasse. L'échantillon placé dans une capsule, est extrait en continu par de l'hexane qui dissout graduellement la matière grasse ; le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'hexane est évaporé, et la matière grasse est pesée.

Expression des résultats

$$\% \text{ lipides} = \frac{Bp - Bv}{M \text{ échantillon}} \times 100$$

D'où

Bp : poids du ballon plein

Bv : poids du ballon vide

M : masse d'échantillon

4.1.5. Détermination de la matière minérale (NA 1218, 1992)

LA NA1218 spécifie une méthode de décomposition des matières organiques présents dans les aliments, par incinération, en vue de l'analyse minérale de ces produits.

Principe

Incération à $525 \pm 25^\circ\text{C}$ d'une prise d'essai de quelques grammes après addition d'une solution d'acétate de magnésium ou de chlorure d'aluminium destinés à faciliter l'incinération.

Nombre de déterminations

On effectue trois déterminations sur le même échantillon pour laboratoire

Expression des résultats

D'où :

$$\text{Cendres totales} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 : masse en(g) du creuset vide

m_1 : masse en (g) du creuset plein

m_2 : masse en (g) du creuset après incinération

4.1.6. Dosage des glucides selon la méthode de **Bertrand**, 1994.

La méthode permet de doser les " sucres totaux" représentant la sommes des sucres réducteurs et des sucres non réducteurs exprimés en glucose.

Principe :

Le dosage des sucres repose sur la propriété des oses de réduire les sels cuivriques en solution tartrique et en milieu alcalin à chaud. Les sels cuivriques sont réduits en oxyde

cuvreux qui précipite. Dans le cas des sucres "sucres non réducteurs" on procède à une hydrolyse à 70°C qui libère des sucres réducteurs.

Expression des résultats

Deux molécules de $Kmno_4$ correspondent à 10 molécules de cuivre, d'où 1mL de $Kmno_4$ 0.1N correspond à 6.35 mg de cuivre.

Calcul de la quantité de cuivre dans la solution dosée :

$$n \text{ (mL de } Kmno_4) \times 6.35 \longrightarrow \text{ mg de cuivre.}$$

Lire dans le tableau (annexe 1) : la correspondance entre le poids de cuivre et le poids de glucose.

$$\frac{mg \text{ glucose} \times 100 \times 250 \times 500 \times 100}{V \times 50 \times 200 \times \text{Poids de la prise d'essai en mg}} = \% \text{ de sucre}$$

Calcul simplifié :

$$V \text{ } Kmno_4 \longrightarrow X \text{ mg glucose}$$

$$\text{Pour 20mL } \% = \frac{mg/\text{glucose} \times PE}{Pen \text{ g}}$$

$$PE : 6.25 \longrightarrow 20 \text{ mL}$$

$$12.5 \longrightarrow 10 \text{ mL}$$

$$25 \text{ mL} \longrightarrow 5$$

$$50 \text{ mL} \longrightarrow 2.5$$

4.1.7. Détermination de la teneur en composés phénoliques selon la méthode de **Li Y. et al, 2006**:

Principe :

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait est déterminée au moyen du réactif de Follin- Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 760 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche.

4.1.8. Détermination de l'activité anti-oxydante selon **Sahin F. et al, 2004** :

Pouvoir du piégeage du radical DPPH

Principe :

Le Diphényl Picryl-Hydrazyl (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en Diphényl Picryl-Hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002). La réaction peut se résumer de la manière suivante :



D'ou (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényl Picryl-Hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. 0.1 mL (au lieu de 25µl) de l'extrait ont été ajoutés à 3.9 mL (au lieu de 975µl) DPPH le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30mn. La densité optique a été mesurée à 517nm contre un blanc le méthanol. Les concentrations de l'extrait dans

le milieu réactionnel sont comprises entre 0.05 et 0.5 mg/mL. Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le BHT comme antioxydant standard.

$$PA (\%) = \frac{\text{Absorbance blanc} - \text{Absorbance d'échantillon}}{\text{Absorbance blanc}} \times 100$$

PA : potentiel antioxydant des polyphénols (%).

A_{ech} : à différentes concentrations.

- **Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50)**

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe d'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

4.2. Analyses microbiologiques de la spiruline

Les manipulations sont faites sous une hotte ventilée et/ou dans une zone stérile assurée par le bec benzène ; tout en désinfectant les mains avec un gel antiseptique.

4.2.1. La préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique (N° 01.98.51)

Principe

- Préparation de la suspension-mère de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.
- Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales qui permettent, après ensemencement et incubation des milieux de culture :

Dans le cas des boîtes, d'effectuer un dénombrement valable des colonies (existence de boîtes comportant entre 30 et 300 colonies et pour certains groupes, tels les coliformes, entre 15 et 150 colonies).

Dans le cas des tubes, de disposer d'un nombre suffisant de tubes montrant un développement bactérien et des tubes sans culture, de manière telle que le calcul du nombre le plus probable (NPP) à l'aide des tables, puisse être réalisé.

Prise d'essai

Les prises d'essai sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de deux facteurs essentiels à savoir :

- le nombre de pièces soumises à l'analyse
- les opérations analytiques à conduire

Suspension mère et dilutions décimales

- Introduire aseptiquement 10 grammes de produit à analyser dans un sachet stérile de type « Stomacher » contenant au préalable 90 mL de diluant soit le TSE (tryptone sel eau)
- Homogénéiser

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

-Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la DM dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant ; cette dilution est alors au 1/100 ou 10^{-2}

-Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile, 1 mL de la dilution 10^{-2} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 mL du même diluant ; cette dilution est alors au 1/1000 ou 10^{-3} .

4.2.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (NF V 08-051, 2003)

La Flore Mésophile Aérobie Totale est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présente dans un produit. Ce dénombrement se fait en milieu solide après incubation en aérobiose à 30 °C.

Principe

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture défini, coulé dans une boîte de pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres boîtes avec des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes à 30°C, en aérobiose pendant 72h.

A partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de pétri retenues, on calcul le nombre de microorganismes par mL ou par gramme de l'échantillon analysé.

Lecture et dénombrement

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire en masse. Il s'agit de compter les colonies ayant poussées sur les boîtes tenant compte des facteurs suivants :

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions

4.2.3. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux-méthode par comptage des colonies (ISO 4832, 2006)

NOTE : Le dénombrement des coliformes fécaux peut être effectué, soit par comptage des colonies, soit par calcul du nombre le plus probable, ces deux techniques diffèrent de celles utilisées pour les coliformes uniquement par la température d'incubation.

Méthode par comptage des colonies

Appliquer la norme en remplaçant le terme coliformes par coliformes fécaux et la température de 30°C par 44.5°C

Principe

Préparation de trois boites de Pétri, en utilisant un milieu de culture sélectif solide et une quantité spécifiée de suspension mère.

Incubation des boites à 30⁰ C ou 37⁰ C pendant 24 h.

Comptage des colonies caractéristiques.

Calcul du nombre de coliformes par millilitre à partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées par boite de Pétri.

Dénombrement

Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boites de Pétri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies. Procéder au comptage des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0,5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

4.2.4. Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices (XPV 08-601, 2005)

Principe

Ensemencement en profondeur du milieu gélosé tryptose sulfite à la cyclosérine exempt de jaune d'œuf, coulé dans une boîte de Petri ou dans un tube, avec une quantité déterminée de la suspension-mère.

Recouvrement avec une couche du même milieu lorsque l'essai est effectué en boîte de Petri.

Incubation des boîtes à 46°C en anaérobiose pendant 20 h ± 2 h.

Dénombrement des colonies caractéristiques (entourées d'un halo noir).

Comptage des colonies

Choisir la ou les tubes contenant moins de 30 colonies caractéristiques et moins de 100 colonies au total.

Compter les colonies caractéristiques.

4.2.5. Recherche des Staphylococcus aureus (NF V 08-052)

Principe

Ensemencement en surface d'un milieu de culture gélose sélectif, coulé dans une boîte de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Incubation des boîtes à 37°C, en aérobiose pendant 24h à 48h.

Calcul du nombre de staphylocoques par mL ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non obtenues dans les boîtes retenues aux niveaux de dilutions donnant un résultat significatif.

Lecture

Seront considérés comme positives, les boîtes contenant des colonies caractéristiques à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide.

4.2.6. Dénombrement des levures et moisissures ; technique par comptage des colonies à 25°C (C.A.C.Q.E. N° 01-97-61)

Principe

Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif déterminé, coulé dans trois boîtes de Petri, avec une quantité définie de l'échantillon pour essai, si le produit est liquide, ou de la suspension mère pour les autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales des autres boîtes, obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation de ces boîtes en aérobiose à 25° C pendant 3, 4 ou 5 jours.

Calcul du nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif.

Lecture

Compter les colonies sur chaque boîte après 3,4 et 5 jours d'incubation. Après 5 jours, retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, retenir les comptages obtenus après 4, ou même 3 jours d'incubation.

Expression des résultats

Le nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre est égal à :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

C : est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées;

n_1 : est le nombre de boîtes comptées à la première dilution;

n_2 : est le nombre de boîtes comptées à la seconde dilution;

d : est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus ;

Le résultat doit être exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , x étant la puissance appropriée de 10.

4.2.7. Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (ISO 6579, 2002)

Principe

La recherche de *Salmonella* nécessite trois phases successives (voir également annexe A).

- Prénrichissement en milieu non sélectif liquide

Ensemencement de la prise d'essai dans de l'eau peptonée tamponnée à température ambiante, puis incubation à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

- Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Ensemencement du bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) et d'un bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture obtenue ci-dessus.

Incubation du bouillon RVS à $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ et du bouillon MKTTn à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

- Isolement et identification

A partir des cultures obtenues, ensemencement de deux milieux sélectifs solides :

- Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD).
- Un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélose XLD permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

Incubation du milieu gélose XLD à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ puis examen après $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Incubation du second milieu sélectif selon les recommandations du fabricant.

4.3. La revivification de la souche bifide

- Prélevez 1mL de la pré-culture, la mettre dans 9mL de bouillon MRSc (MRS+ cystéine+ gentamycine+ couche d'huile de paraffine)
- Incubez en anaérobiose à 37°C pendant 18h

Remarque :

- La souche bifide qui sera par la suite utilisée donne des bons résultats si elle est fraîchement préparé, c'est la raison de la revivification
- ATB Gentamycine 'milieu sélectif pour les bifidobacteries' est ajouté en raison de $120 \mu\text{l}/100\text{mL}$. La gentamycine doit avoir une dose de l'ordre de $80 \text{ mg}/2\text{mL}$ car les bifidobactéries sont actives à une dose de $32 \text{ mg}/\text{mL}$ ou $64 \text{ mg}/\text{mL}$.
- La cystéine 'réduit O_2 ' est ajouté à 0.05%
- Le p H du milieu doit être de l'ordre de 6.6 – 6.7. Sa régulation se fait soit par NaOH (1N) ou avec de l'acide sulfurique (1N)

4.4. Les essais *in vitro* (Doumandji A., 2012)

- Etude *in vitro* de l'effet de la souche bifide sur le diabète provoqué chez les rats
- Etude *in vitro* de l'effet de la spiruline sur le diabète provoqué chez les rats
- Etude *in vitro* de l'effet de l'association des bifidobacterium et de la spiruline sur le diabète provoqué chez les rats
- Préparation de combinaisons :
 - Utiliser la culture de bifidobactérium fraîchement préparée (just après les 18h)
 - 1^{ère} combinaison : 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose + 1mL d'étalon glucose
 - 2^{ème} combinaison : 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose + 1 mg/mL de la poudre spiruline + 1mL d'étalon glucose
 - 3^{ème} combinaison : 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose + 5 mg/mL de la poudre spiruline + 1mL d'étalon glucose

 - 4^{ème} combinaison : 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose + 10 mg/mL de la poudre spiruline + 1mL d'étalon glucose
 - 5^{ème} combinaison : 9 mL eau distillée stérile + 1 mg/mL de la poudre spiruline + 1mL d'étalon glucose
 - 6^{ème} combinaison : 9 mL eau distillée stérile + 5 mg/mL de la poudre spiruline + 1mL d'étalon glucose
 - 7^{ème} combinaison : 9 mL eau distillée stérile + 10 mg/mL de la poudre spiruline + 1mL d'étalon glucose
- Incuber ce test de ces tubes à 37°C
- Doser le taux de glucose par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 546 nm à des moments différents (2h, 4h, 8h ,10h, 12h, 18h, 24h, 48h, 72h ...)
- Centrifugation à 40000tours pendent 10mn

- Les résultats les plus significatifs de l'effet le plus réduit du diabète pour l'association observé *in vitro* servent à l'étude *in vivo* sur les rats.

4.5. Identification de la population d'étude :

- Modèle animal : rate
- Souche : Wistar
- Sexe : femelle
- poids : 180-190 g
- Provenance : L'institut Pasteur Alger
 - Alimentation : croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger
 - Eau de robinet
 - Alimentation et hydratation libre
- Répartition : 30 rats répartis en groupe de 6

4.6. Induction de diabète expérimental

Pour évaluer l'activité antidiabétique de nos combinaisons, un modèle de rat diabétique induit par l'alloxane est réalisé. L'injection de l'alloxane par voie sous cutanée (120 mg/Kg de poids) déclenche un diabète chez le rat (Mbodj Ndeye A., 2003), sachant que l'alloxane monohydrate est indicteur de diabète qui provoque une nécrose sélective sur les cellules béta du pancréas donnant ainsi une déficience insulinique chronique [Dhanabal et al., 2007].

L'alloxane monohydrate (Pharmacia, St.Quentin en Yvelines, France), reconstitué juste avant l'administration dans une solution physiologique (Na Cl 0.9%) pour constituer la concentration décrite précédemment pour être injecté aux rats, une évaluation de glucose sanguin est effectuée et les rats dont le glucose sanguin est supérieur à 2 g/l sont considérés diabétiques et répartis aléatoirement en groupe de 6.

4.7. Préparation du régime (Doumandji A., 2012)

Les animaux d'expérience sont placés aléatoirement en groupe de 6, ils sont maintenus dans une animalerie à température constante (22 ± 2) °C, soumis à un cycle de lumière/ obscurité 12/12h et les différentes expériences en toujours lieu de 13h à 17h en raison de l'activité nocturne de l'animale (phase active)

1mL de chaque préparation est administré au rat par voie orale.

Lot 1 : témoin 'rats normaux'

Lot 2 : rats diabétiques recevant 1mL de la 1^{ère} combinaison (sans étalon glucose)

Lot 3 : rats avec un taux élevé en glucose recevant 1mL de la 3^{ème} combinaison (sans étalon glucose)

Lot 4 : rats avec un taux élevé en glucose recevant 1mL de la 4^{ème} combinaison (sans étalon glucose)

Lot 5 : rats avec un taux élevé en glucose recevant 1mL de la 7^{ème} combinaison (sans étalon glucose)

La glycémie est mesurée avant gavage et à 30, 60, 90 mn après le traitement durant une période de 7jours.

N.B : la préparation du régime est faite chaque jour.



Figure 10 ♦ mesure de la glycémie à l'aide d'un glucomètre



Figure 11 ♦ administration du régime par voie orale

Résultats et discussions

1. Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la poudre de la spiruline :

Les résultats d'analyses physico-chimiques effectuées sur la poudre de spiruline, figurent dans le tableau ci-dessous.

Tableau08 ♦ Résultats des analyses physico-chimiques de la spiruline

Paramètres	La poudre de spiruline
Potentiel d'hydrogène	7.81
Taux d'humidité	8 %
Teneur en protéines	58.12 %
Teneur en matière grasse	6.52 %
Taux des sucres totaux	19.53 %
Taux des cendres	6,50 %
Apport calorique	369.28 kcal

Le pH

Nous avons remarqué que le pH de la poudre de spiruline ; *Spirulina platensis* ; reconstituée est de 7.81, c'est un pH légèrement basique.

Le taux d'humidité

Est la teneur en eau de la poudre de spiruline, mesurée en pourcentage d'eau par rapport à son poids sec

Pour ce qui est du taux d'humidité de cette poudre : elle est de 8%. Une autre méthode utilisant un dessiccateur infrarouge nous a permis d'aboutir presque aux mêmes résultats soit de 7,88% avec un extrait sec de 92,12%. Les valeurs obtenues par Lounici (2010) se situent autour de $13.62 \pm 0.54\%$, et sont donc supérieures à la valeur trouvée dans notre échantillon. Aussi Espirard (2002) de 4-6%. Nos résultats peuvent être due soit à une déshydratation insuffisante, soit à une reprise d'eau.

Ces différences peuvent être dues aux technologies appliquées pour le séchage :

- S'il s'agit d'une atomisation, un paramètre essentiel pour le contrôle de l'humidité des poudres intervient ; c'est la taille des gouttelettes. Pour un temps donné de séjour en chambre d'atomisation, une gouttelette plus grosse séchera moins bien qu'une gouttelette plus fine et sera finalement plus humide (Schuck, 2011).
- Le facteur « paramètres thermodynamiques de l'air de séchage » influence la teneur en eau de la poudre : une variation de 10°C de la température de l'air d'entrée ou de 1°C de la température de l'air de sortie entraîne une variation de 0,2 % de l'humidité de la poudre (Schuck, 2011).

D'autres facteurs intrinsèques à la méthode d'analyse pouvant influencer l'exactitude des résultats, entre autres :

- échantillon séché hygroscopique : l'échantillon une fois séché, peut réabsorber l'humidité de l'air pendant les manipulations.
- dépôt de la graisse des doigts sur le plat avant la pesée
- quantité et répartition de l'échantillon dans le plat
- nombre trop élevé d'échantillons dans l'étuve

L'eau n'apportant aucune valeur énergétique à l'aliment et étant de mauvaise conservation, il convient souvent de réduire sa teneur en maximum. Il conviendra donc de contrôler la teneur en eau des aliments au cours de leurs transformations et au cours de leurs commercialisés.

Les protéines

Les protéines sont indispensables à l'être humain car elles lui apportent des éléments essentiels à la vie : les acides aminés. Ceux-ci sont à la base des cellules qui composent notre corps. Certains de ces acides aminés sont dits essentiels car l'organisme ne peut pas les synthétiser, seule l'alimentation peut les apporter.

Leur rôle est multiple : la croissance, la reproduction, la nutrition, l'immunité (système de reconnaissance et de défense de l'organisme) leur sont liées.

Avec une teneur en protéines à hauteur de 58.12%, la spiruline est plus riche en protéines que la plupart des aliments courants. Pour comparaison, dans la viande et le poisson la moyenne est de 15-20 %, dans le soja, 35 % et les oeufs, 12 %. D'un point de vue quantitatif, la spiruline est donc un aliment de choix pour un apport protéique majeur et d'autant plus que la digestibilité de ses protéines, accrue par l'absence de paroi cellulosique des cellules, s'élève entre 75 et 83% (Charpy et al., 2004)

Les lipides

Outre un rôle énergétique évident, avec un rendement calorique de 9 kcal/g, les lipides présentent également un rôle structural essentiel en contribuant au maintien de l'architecture cellulaire. Cependant le rôle majeur des lipides présents dans la spiruline, est fonctionnel. En effet, la composition lipidique de la spiruline se caractérise d'une part par un bon équilibre acides gras saturés/acides gras insaturés et d'autre part, la présence d'acides gras polyinsaturés dits essentiels (AGE) (Falquet J. et Hurni J-P., 2008)

La teneur en lipides étant indiquée dans le tableau précédent ; dans la poudre de spiruline est de 6,52, cette valeur est semblable à celle trouvée par Lounici (2008) soit de 6,80.

Les variations peuvent être attribuées aux causes suivantes:

- Temps d'extraction de la matière grasse : un temps d'extraction trop court donne des résultats inexacts, c'est-à-dire inférieurs aux résultats attendus.
- Evaporation incomplète du solvant avant la pesée de la matière grasse.
- Qualité du solvant extracteur : Les solvants organiques sont rarement purs et contiennent des résidus huileux non évaporables. On doit s'assurer que la masse de résidus n'influence pas le résultat de façon significative.

Les basses teneurs en lipides limitent l'oxydation des lipides selon Alais, Miclo et al (2004) et favorisent la dispersibilité, la solubilité et l'homogénéité de la solution résultante (Melcion et Ilari, 2003)

Les sucres totaux

Les glucides, indispensables au fonctionnement des muscles et du cerveau, constituent la source d'énergie la plus rapidement utilisable par l'organisme et sont impliqués dans l'anabolisme des protéines. Les glucides ont donc un rôle essentiellement énergétique.

Certains glucides ont un rôle dit de "constitution". Ils rentrent dans la composition de tissus fondamentaux de l'organisme : les cartilages, les acides nucléiques, le mucus, les substances antigéniques.

Constituant une part importante de la matière sèche de la spiruline (15 à 25%), les polysaccharides qui la composent, offrent une énergie rapide sans fatiguer le pancréas et avec une perte minime en insuline (Babadzhanov A.S et al., 2004) Les glucides

simples sont eux en très faible quantité, ce qui est plutôt un avantage sur le plan diététique. Outre ce rôle énergétique, les hydrates de carbone sont nécessaires pour les échanges hormonaux de protéines et de lipides. D'un point de vue plus thérapeutique, les polysaccharides de la spiruline présentent de multiples intérêts, notamment dans la stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN, dans son effet radio-protecteur et dans la neutralisation des radicaux libres (Babadzhanov A.S et al., 2004)

Notre échantillon contient 19.53 % de sucres totaux alors que celui de (Maj ,2011) oscille entre 15-25%, cette teneur est conforme à celle rapportée.

Les éléments minéraux

Les minéraux entrent dans la composition intime de tous les tissus du corps. Ils se trouvent en quantités considérables dans certaines structures telles que les os, les dents, les ongles et, pour une moindre part, dans les muscles, le sang, etc. Quant aux oligoéléments, malgré leur faible dosage, ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Parmi les minéraux contenus chez la spiruline les plus intéressants à étudier sont le fer, le zinc, le magnésium, le calcium, le phosphore et le potassium.

La teneur en éléments minéraux est de l'ordre de 6,50 % par rapport à l'échantillon de Lounici contenant 6,70 %, c'est légèrement inférieure.

Apport calorique

Energie exprimée en Kcal (ou Cal) ou KJ libérée par la dégradation de 100 g de partie comestible de l'aliment.

La valeur énergétique de *Spirulina platensis* est de 369.28 kcal

La poudre de Spiruline a un apport calorique, qui peut procurer la satiété. Ce qui peut être intéressant –voire recherché.

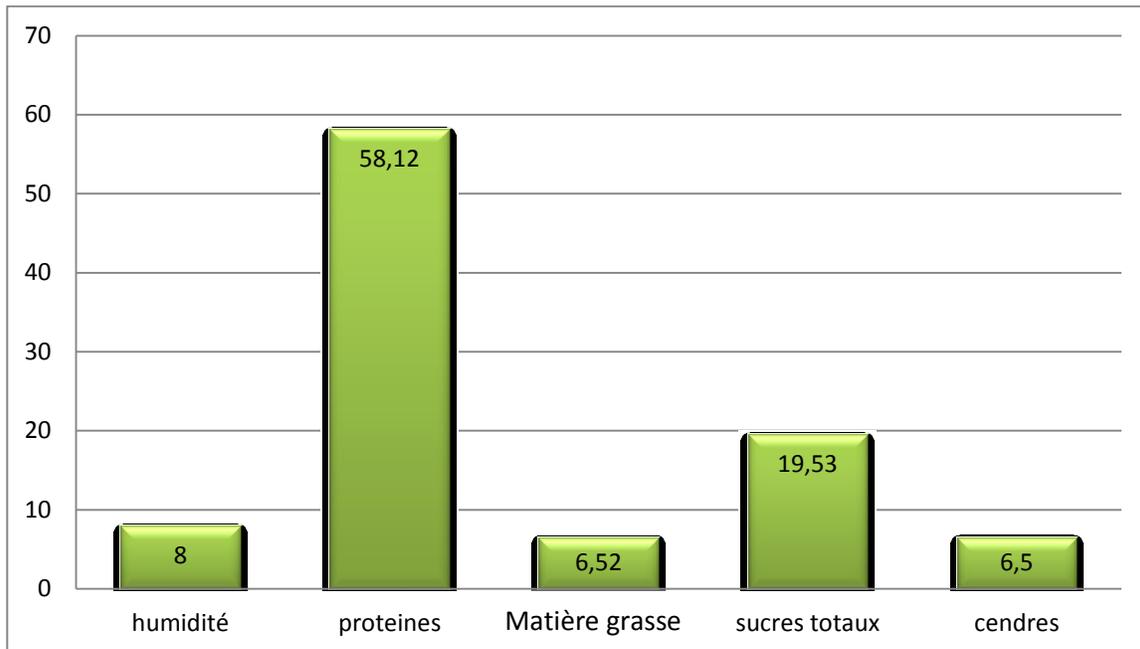


Figure 12 ♦ Composition de la spiruline

Selon l'histogramme précédent, nous remarquons que la spiruline renferme 58.12 % de protéines, 19.53 % de glucides, 6.52 % de lipides ainsi que 6,50 % de minéraux

Nous pouvons conclure que la spiruline apporte de l'énergie. Mais elle apporte aussi un bienfait au point de vue santé. Il s'agit à la fois d'un aliment énergétique grâce à sa teneur minimale en glucides et en matières grasses, et aussi constructeur grâce à sa teneur très élevée en protéines.

La spiruline se présente sous une forme déshydratée et peut se conserver pendant une longue durée. Bien évidemment la teneur en eau a une influence considérable sur l'aptitude à la conservation de cette poudre.

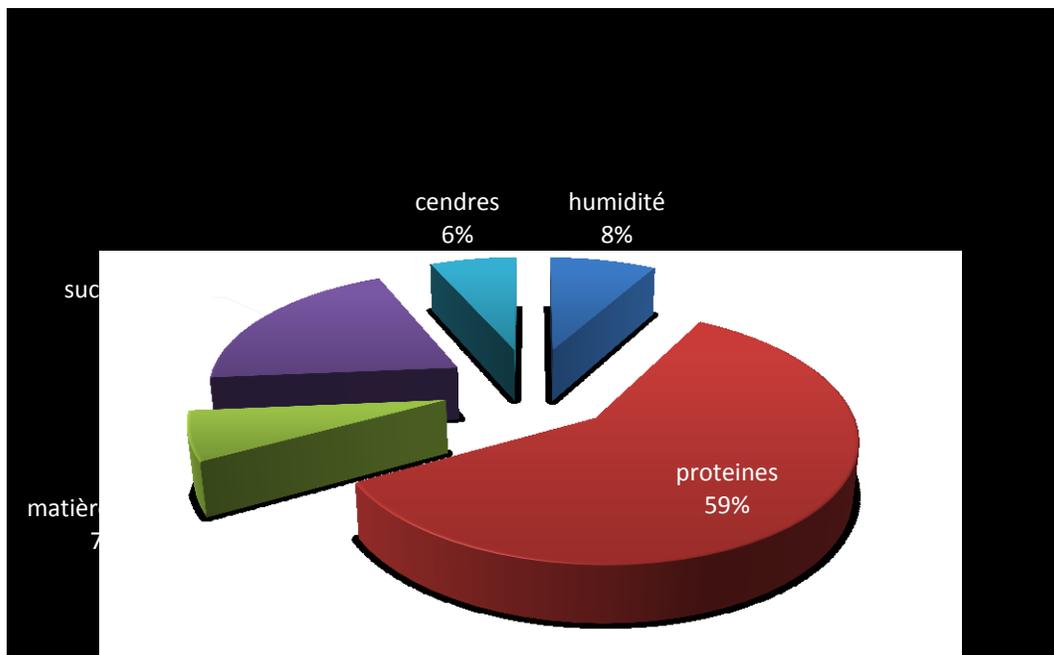


Figure 13 ♦ répartition des principaux constituants de la Spiruline

Nous constatons que la spiruline renferme un taux élevé en protéines représentant plus de deux tiers de la composition, une teneur moyennement élevée en glucides, des valeurs modérées en lipides, en minéraux et humidité permettant une longue conservation, et diminuant les risques d'altération de la poudre au cours du stockage.

2. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les la poudre de Spirulina maxima

Les analyses microbiologiques effectuées sont représentées par le tableau ci-dessous

Tableau 09 ♦ Résultats des analyses microbiologiques

Germes recherchés	Nombres de germes trouvés / gr	
	Poudre de spiruline	Tolérances
GAMT à 30°C	1400	5.10 ⁴
Coliformes totaux à 30°C	00	1/0.01g
Coliformes fécaux à 44,5°C	00	1/0.01g
Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	2	1/0.1g
Staphylococcus aureus à 37°C	00	1
Levures et moisissures à 25°C	00	3.10 ²
Salmonella à 37°C	00	abs

Rq : le nombre estimé (Ne) de bactéries sulfito-réductrices par millilitre :

$$Ne = C \quad \text{D'où } C : \text{ est le nombre de bactéries (XP V 08-061, 2005)}$$

Les résultats microbiologiques de la poudre de spiruline sont interprétés par rapport aux critères microbiologiques des produits déshydratés ou instantanés à consommer après adjonction de liquide du journal officiel de la république Algérienne n°35 du 25Mai 1998.

Les analyses microbiologiques effectuées sur la poudre de spiruline ont montré qu'elle ne contient pas de *coliformes fécaux et totaux*, ni de *levures et moisissures*, de meme que pour les *staphylococcus aureus* et *salmonella*. Elle ne présente donc aucun danger en raison de sa conformité aux normes établies dans le journal officiel de la république algérienne N° 35. Aussi la présence des GAMT est tolérable selon le journal officiel, les résultats indique qu'elle est fabriquée dans de bonnes conditions d'hygiène.

La présence de bactéries *sulfito-reductrices* dans le milieu à raison de deux colonies est tolérable, dans le cas échéant, Il aurait fallu éliminer les spores de *Clostridium sulfito-reductrice* à l'aide des traitements thermiques avant son utilisation.

3. Détermination de la teneur en composés phénoliques selon la méthode de **Li Y. et al, 2006**

Selon la courbe d'étalonnage que nous avons établie, nous avons pu déduire la concentration des polyphénols dans notre échantillon qui est de l'ordre de 0.610 mg EAG/g MS

Ainsi la teneur en polyphénols totaux dans l'échantillon étudié est de 0.610 mg EAG/g MS ce qui correspond à 6,1%. Si nous comparons nos résultats à ceux réalisés par Benahmed Djilali A. et al. (2009) sur la même spiruline qui sont de l'ordre de 5.1325% EAG, nous pouvons dire que notre spiruline est riche en composés phénoliques.

La teneur en composés phénoliques dépend de différents facteurs (nature de l'espèce, conditions physiologiques, type d'extraction: le solvant, le mode "à froid, à chaud", agitation ou non, la température ...).

4. Détermination de l'activité anti-oxydante selon **Sahin F. et al, 2004** :

L'activité anti-oxydante de l'extrait méthanolique de la spiruline vis-à-vis le radical DPPH a été évalué par spectrophotométrie à 516nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne de son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Dans notre étude nous avons évalué le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de la spiruline afin de préjuger le pouvoir antiradicalaire. A cette effet deux antioxydants de synthèses (BHT : Butyl hydroxy toluène, et Acide ascorbique) sont pris comme références.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle. A partir de ces courbes, nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées, ainsi la valeur d' IC_{50}

Plus la valeur d' I_{c50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (Pokony et al. (2001) in Bensaada H. (2012).

Tableau 10 ♦ Pouvoir antioxydant des deux antioxydants standards utilisés (BHT, VitC) (Bensaada H., 2012).

Concentration (mg/mL)	Activité de piégeage du radical DPPH (%)	
	BHT	Vit C
0	0	0
0,002	0,42	ND
0,004	6,60	ND
0,006	ND	11,87
0,008	29,25	25,13
0,01	57,17	29,19
0,02	61,72	57,11
0,04	78,07	95,09
0,06	84,10	ND

D'après les résultats nous avons pu établir un graphe qui nous montre l'évolution du pouvoir antioxydant des deux antioxydants standards (VitC et BHT).

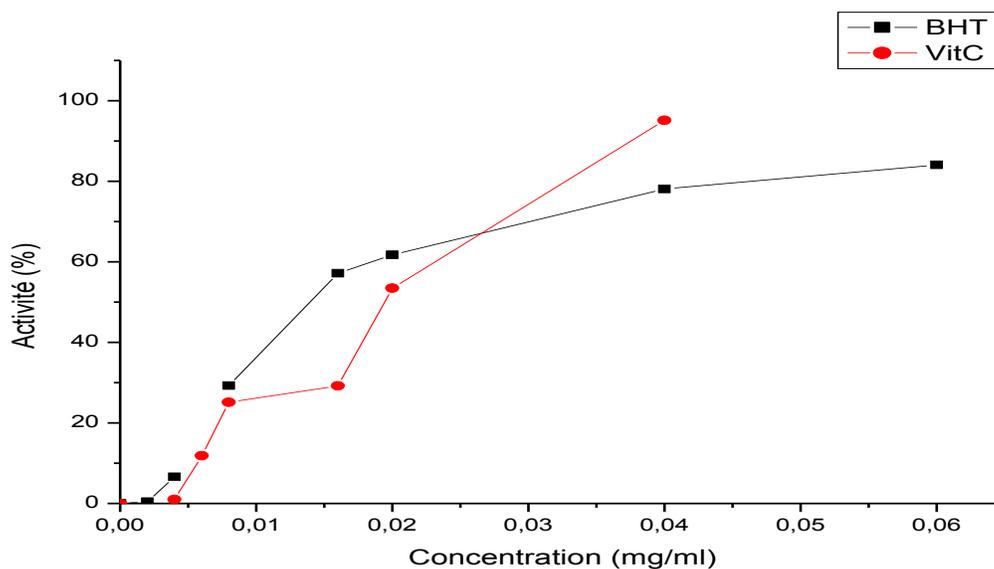


Figure 14 ♦ Activité de piégeage du radical DPPH des antioxydants de synthèse (BHT, Vit C) en fonction des concentrations (Bensaada H., 2012).

D'après le tableau n°10 et la figure n°36, nous remarquons que l'acide ascorbique présentent une forte action radicalaire par rapport à l'autre antioxydant standards. Cela est bien illustré dans le graphe ci-dessus.

Tableau 12 ♦ Le pouvoir de piégeage du radical DPPH de l'extrait méthanolique de spiruline étudié :

Concentration en (mg/mL)	AA(%)
0.5	6.155
0.4	5.252
0.3	1.688
0.2	0.946
0.1	0.742
0.05	0.654
0	0

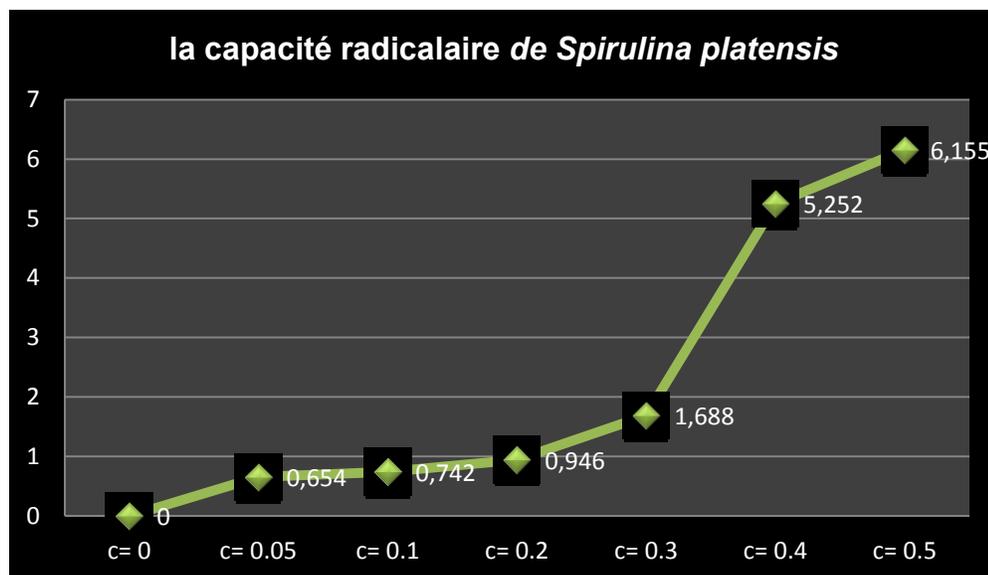


Figure 15 ♦ la capacité radicalaire de *Spirulina platensis*

À la lumière des résultats, nous constatons que la valeur IC₅₀ à la concentration de 0.236mg/mL ne représente pas la valeur et le pouvoir réel qui représente la spiruline pour la réduction de 50% du radical DPPH, cela peut être due à une mauvaise macération de l'échantillon dans le méthanol. Par conséquent on a adopté le protocole suivant :

Nous notons la remarque suivante :

- ❖ Pour une concentration de 0,05mg /mL, l'extrait de spiruline étudiée présente une activité antioxydante assez forte par rapport à celle obtenue par le BHT et l'acide ascorbique, cela est du probablement à la présence des composés phénoliques.

- **Estimation de Ic_{50}**

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir des Ic_{50} , définie par la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Plus la valeur d' Ic_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande.

Tableau 13◆ Les Ic_{50} des différents antioxydants étudiés.

Composé	$Ic_{50}mg/mL$
Vit C	0,017
BHT	0,013
Extrait de Spiruline	0,012

Tenant compte que la valeur de Ic_{50} la plus faible correspond à la plus forte activité antioxydante, donc nous constatons que l'extrait de spiruline présente la plus forte activité antioxydante avec une de l'ordre de 0.012 mg/mL comparant avec celle du BHT et de la citamine C. Cela est due probablement à la richesse de la spiruline en composés antioxydants telles B carotène, sélénium et le roi des antioxydant la vitamine E.

5. Résultats des essais *in vitro*

Tableau 14◆ Résultats de l'essai *in vitro*

tube	T_0	2h	4h	10h	24 h	48 h
1	312	308	337	1248	1705	1709
2	400	490	510	1052	1952	1952
3	901	905	956	1410	2247	2249
4	1289	1370	1662	2350	3141	3145
5	100	102	94	66	92	92
6	502	498	461	781	967	973
7	1190	1283	1340	1535	2089	2095

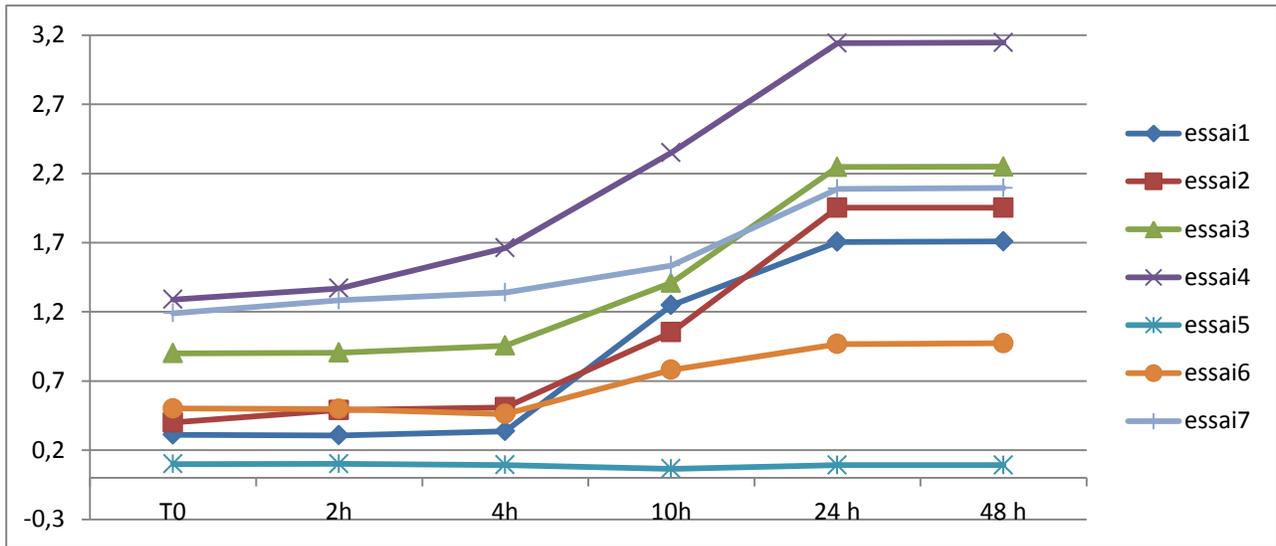


Figure 16 ♦ courbes de la croissance bactérienne dans l'essai *in vitro*

D'après le tableau 14 et la figure 37, on remarque que la charge microbienne des bifidobactéries présente une croissance graduelle avec le temps mais elle reste minime par rapport à l'association de ces derniers avec la spiruline à différentes dose. La spiruline ne présente pas un bon développement à la dose de 1mg/mL par contre à 10mg/mL.

Un développement exponentiel est noté au niveau de la combinaison des bifidobactéries avec la spiruline à 10mg/mL.

Tableau 15♦ l'absorbance de glucose pendant 48h

temps	T0	2h	4h	10h	24h	48h
essai1	1,01	1	0,955	0,623	0,353	0,221
essai2	1,02	1,01	0,845	0,699	0,389	0,198
essai3	1	0,994	0,911	0,598	0,298	0,126
essai4	1,01	0,985	0,779	0,545	0,313	0,102
essai5	1	0,996	0,994	0,999	0,996	0,998
essai6	1,01	0,999	1,02	0,897	0,798	0,776
essai7	1,02	0,989	0,898	0,798	0,689	0,656

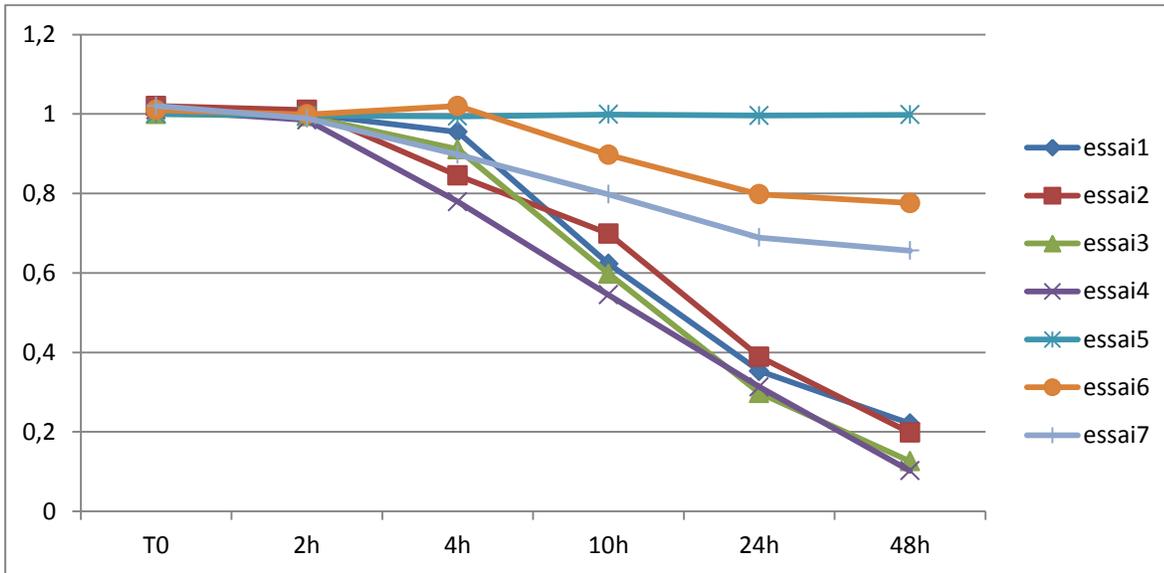


Figure 17 ♦ l'absorbance de glucose pendant 48h

Concentration de l'étalon glucose = 1 mg/mL

D'après le tableau 15 et la figure 38, nous remarquons que l'absorbance de l'étalon glucose introduit dans le milieu et mesurer à une longueur d'onde de 546nm, marche en parallèle avec la charge microbienne. Les préparations qui en présenté une charge microbienne franche dans le tableau précédent ont également présenté une diminution du taux de glucose dans le milieu cela peut s'expliquer par sa consommation par les bactéries.

Le taux initial de glucose introduit dans le milieu était de l'ordre de 1mg/mL, ce taux a diminué au une valeur de 0.102 mg/mL dans l'essai 4 contenant les bifidobactéries associé à 10 mg/mL de spiruline. L'essai 5 sera négligé de l'essai *in vivo* en raison de sa mauvaise absorbance de glucose (contient 1mg/mL de spiruline)

Les essais qui ont présenté une bonne réduction du taux de glucose sont retenus pour l'essai *in vivo*

6. Résultats du test *in vivo*

Vingt rates ont été traitées par injection sous-cutané de monohydrate d'alloxane à la dose de 120mg/kg de P.C en solution dans du sérum physiologique entraîne la destruction des cellules B pancréatique ; responsable d'une hyperglycémie permanente dans les jours qui suivent l'administration (Mbodj Ndeye A., 2003)

48h après administration de l'alloxane, la glycémie des rates a été mesurée à l'aide d'un glucomètre de type On call plus.

Selon Diatewa et al. (2004), les rats dont le glucose sanguin est auteur de 2g/l sont considérés diabétiques. Donc les animaux ayant présenté une hausse de glucose sanguin franche ont été retenus pour l'expérimentation et réparties en quatre groupes de cinq.

Les résultats les plus significatifs de l'effet le plus réduit du diabète pour l'association observé *in vitro* servent à l'étude *in vivo* sur les rates.

Lot : témoin 'rates normaux'

Lot 1 : rates diabétiques recevant 1mL de la combinaison: 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose

Lot 2 : rates avec un taux élevé en glucose recevant 1mL de la combinaison : 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose + 5 mg/mL de la poudre spiruline

Lot 3: rates avec un taux élevé en glucose recevant 1mL de la combinaison : 1mL pré-culture + 9mL de bouillon MRS_C sans glucose + 10 mg/mL de la poudre spiruline

Lot 4 : rates avec un taux élevé en glucose recevant 1mL de la combinaison : 9 mL eau distillée stérile + 10 mg/mL de la poudre spiruline

Les résultats du test *in vivo* sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16♦ Résultats de l'essai *in vivo*

Après injection de l'alloxane, les rates présentent une glycémie allant de 1.72 à 2.06g/l														
(g/l)		J 1	J 2		J 3		J 4		J 5		J 6		J 7	
Témoin	1.22	1.22	1.36	1.30	1.27	1.27	1.09	1.09	1.16	1.16	1.20	1.20	1.23	1.23
Lot 1	Avant	1.89	1.82		1.761		1.724		1.70		1.60		1.649	
	T ₀ : 30mn	1.89	1.79		1.704		1.724		1.695		1.651		1.649	
	T ₀ +60 mn	1.82	1.79		1.704		1.706		1.664		1.651		1.649	
	T ₀ +90mn	1.82	1.75		1.70		1.706		1.621		1.651		1.649	
Lot 2	Avant	1.82	1.735		1.651		1.611		1.489		1.429		1.421	
	T ₀ : 30mn	1.80	1.70		1.629		1.553		1.438		1.430		1.421	
	T ₀ +60 mn	1.80	1.70		1.629		1.529		1.405		1.430		1.417	
	T ₀ +90mn	1.80	1.667		1.629		1.483		1.405		1.429		1.417	
Lot 3	Avant	2.06	1.648		1.324		1.223		1.191		1.227		1.09	
	T ₀ : 30mn	1.854	1.53		1.267		1.20		1.16		1.19		1.023	
	T ₀ +60 mn	1.802	1.367		1.26		1.18		1.16		1.181		1.02	
	T ₀ +90mn	1.72	1.299		1.18		1.15		1.16		1.05		1.02	
Lot 4	Avant	1.92	1.70		1.436		1.227		1.16		1.172		1.108	
	T ₀ : 30mn	1.887	1.610		1.30		1.20		1.139		1.154		1.10	
	T ₀ +60 mn	1.80	1.554		1.228		1.163		1.13		1.126		1.09	
	T ₀ +90mn	1.761	1.554		1.20		1.148		1.13		1.126		1.09	

L'activité antidiabétique des différentes combinaisons a été étudiée chez des rates Wistar présentant une hausse de glycémie, les variations du taux de glucose sanguin engendrées par l'administration de ces différentes préparations.

Pour cela nous avons identifié les préparations qui ont présenté une activité hypoglycémiant dans l'essai *in vitro*.

- 1- L'administration quotidienne de la spiruline chez les rats alloxaniques induit une baisse significative de la glycémie au bout de 7 jours. Cette baisse est également fonction de la dose. La glycémie passe de 1.92 g/l à 1.7 g/l à J₁ et de 1.4 g/l à 1.2 g/l à J₃ jusqu'à 1.09g/l à J₇.
- 2- Chez les rates alloxaniques, l'administration quotidienne du *bifidobacterium*

n'entraîne pas une modification significative de la glycémie au cours de 7 jours d'observation, elle est lente par rapport à l'action de la spiruline seule.

- 3- Le traitement par les *bifidobactériums*+ spiruline à la dose de 10g contre 5g prévient de façon significative le taux hyperglycémique.
- 4- Le tableau 16 montre que la poudre de spiruline à une grande activité hypoglycémisante par rapport au *bifidobactériums* et à la dose de 10mg/mL, mais il est à noter que ce test et ce régime de traitement n'a pas abouti à des cas de mortalité. Un traitement par la spiruline et les *bifidobactéries* permet de mieux contrôler l'hyperglycémie.

Sur le plan chimique, la spiruline renferme une multitude variées d'antioxydants dont le sélénium, le B carotène et le roi des antioxydants la vitamine C. Les rats traités par la spiruline ont été protégés contre l'effet délétère et diabétogène de l'alloxane qui peut causer une nécrose sévère des cellules β pancréatiques. Cet effet est expliqué par le fait que l'alloxane est pourvu d'un pouvoir producteur du peroxyde d'hydrogène et d'autres radicaux libres qui sont à l'origine de cette nécrose cellulaire des cellules β . Cette défense est maintenue sous l'effet de l'action antioxydante des composés phénoliques contre les ROS générés par l'alloxane ; pouvoir antiradicalaire de la spiruline déjà démontré au début du travail avec le DPPH.

En ce qui concerne les bifidobactéries, leur rôle se manifeste dans l'amélioration de la digestibilité des polysaccharides (Babel F.G., 1977) ce qui argumente leur action lente par rapport aux antioxydants de la spiruline, également ils ont joué un rôle dans la stabilisation et l'équilibre entre la microflore intestinale déjà présente chez le sujet et leur présence et celle de notre cyanobactérie.

Conclusion générale

L'évaluation dans un premier temps de la valeur alimentaire de *Spirulina platensis* nous a permis d'abord de connaître les différents constituants microbiologiques et physico-chimiques présents.

En effet, la poudre de spiruline traitée présente une teneur initiale en eau 8% qui lui confère une certaine stabilité microbiologique et d'autres constituants notamment les glucides 19.53%, lipides 6.52%, minéraux 6,50 % et les protéines 58.12 % qui en font un aliment fonctionnel intéressant. Il s'agit d'une source nutritionnelle et thérapeutique naturelle sans égale. Richesse protéique, acides aminés essentiels, acides gras essentiels, complexes vitaminiques multiples, activités antioxydantes, tout ceci condensé dans une simple algue bleue microscopique nommée *Spirulina platensis*

L'étude in vitro visant à mettre en exergue de l'effet réducteur de la spiruline du taux de glucose a permis de noter de bons résultats au niveau de l'association de bifidobactéries avec 10mg/mL de spiruline suivie de celle de spiruline seule à la dose de 10mg/mL. Les résultats les plus significatifs ont servi pour la réalisation d'un essai in vivo sur un modèle animale bien défini.

L'extraction des polyphénols a montré une richesse de la spiruline en polyphénols totaux. Ses composés phénoliques s'avèrent d'un pouvoir antiradicalaire important comparés à la vitamine C et le BHT. L'administration de ses composés phénoliques de la spiruline associés à une bifidobactérie aux rats Wistar diabétique ; induit par l'alloxane ; montre un effet antidiabétique dans le temps soutenant ainsi l'utilisation de cette combinaison contre le diabète.

L'algue bleue et les bifidobactéries semblent donner tout son sens au célèbre aphorisme d'Hippocrate : « Que ta nourriture soit ton médicament ».

Notre travail engendra d'autres investigations qui pourraient être engagées, entre autre :

- ✚ Etude de l'effet de la spiruline en association avec les bifidobactéries sur le cholestérol

- ✚ des essais d'introduction de la spiruline dans le régime alimentaire algérien
- ✚ étude de la biodisponibilité des micronutriments de la spiruline

Références bibliographiques

- 1- **Alyah A., 2003**, quel avenir pour la spiruline, deuxième édition Institut National des Sciences et Techniques de la Mer, Montpellier II, 27p
- 2- Australian government, Department of Health and Ageing Therapeutic. *Compositional guideline, Arthrospira platensis*, 2006, www.tga.gov.au/docs/html/compguid/platensis.htm
- 3- **Avino P., Carconi P.L., Lepore L., Moauro A., 2000**, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, *Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES*, 247-252p.
- 4- **Babadzhanov A.S., Abdusamatova N., Yusupova F.M., Faizullaeva N., Mezhlumyan L.G. and Malikova M.Kh., 2004**, *Chemical composition of Spirulina platensis cultivated in Uzbekistan* Chemistry of Natural Compounds, 276-279p.
- 5- **Babel F.G., 1977**, journal of dairy science, antibiosis by lactic culture bacteria, New York, 815-821p.
- 6- **Ballongue J., 1993**, Edd Salminen S. and Von Wright A., bifidobacteria and probiotic action In lactic acid bacteria, New York, 357-432p.
- 7- **Benahmed A., Saidi N., Makssoud A., Ben amara S., 2009**, *les propriétés pharmacologiques et biologiques d'un mélange de poudre de date (mech-degla) et de spiruline*, 2009, algeria , 10p.
- 8- **Bensaada H., 2012**, Mémoire de Master, Etude phytochimique et biologique de l'espèce « *Ruta montana L.* » des deux régions : Blida et Batna, L'effet des tensioactifs anionique et non ioniques sur l'extraction des huiles essentielles, Algérie, 96p.
- 9- **Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V., 2000**, Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications, 117-131p.
- 10- **Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J., 1996**, Ed.TEC & DOC, Microbiologie alimentaire, tome 1, Paris, 672p.
- 11- **C.A.C.Q.E. N° 01-97-61**
- 12- **Charpy L., Jose Langlade M.J., Vicente N., 2004**, Colloque international, " *Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement*", 1-6p.

- 13- **Charpy L., Langlade M.J., Vicente N., 2004**, COLLOQUE SUR LES CYANOBACTERIES, France, 1-4p. Nardo.Vicente@univ.u-3mrs.fr, Ichmpv@com.ltniv-mrs
- 14-**Chen T. and Wong Y-S., 2008**, *Journal Agric. Food Chem.*, In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Selenium-Containing Phycocyanin from Selenium-Enriched *Spirulina platensis*, Vol. 56, 4352–4358p.
- 15-**Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H., Daube G., 2002**, *l'ARTICLE DE SYNTHESE*, Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre Bifidobacterium, Liège ,279-293p.
- 16-**Diatewa M., Samba C.B., Assah T.C., Abena A.A., 2004**, Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* : 92- 229
- 17-**Doumandji A.**, Juin 2007, Article technologie C – N°25, EFFET DE L'ASSOCIATION DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* AVEC *Sreptococcus thermophilus* SUR L'ACTIVITE ANTAGONISTE ENVERS *Escherichia coli* ENTEROPATHOGENE, 65-70p.
- 18-**Doumandji A., Boutekrabt L., Saidi N.A., Doumandji S., Hamerouch D. et Haouari S., 2012**, Revue « Nature & Technologie », Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal, *article*, n°06, Algérie, 40-50p.
- 19-**Doumandji A., Alili D. and Benzaïche A., 2012**, The Effect of a Dietary Supplement Spirulina and Bifidobacterium adolescentis on the Cholesterol-Lowering in Vitro and in Vivo, Algeria
- 20-**Espiard E., 2002**, Ed.TEC & DOC, introduction à la transformation industrielle des fruits, Paris, 360p.
- 21-**Flaquet J. et Hurni J.P., 2006**, **Aspect nutritionnels de la spiruline .publier par Antenna Technologie**, [www.antenna.ch/documents/ AspNutr2006.pdf](http://www.antenna.ch/documents/AspNutr2006.pdf)
- 22-**Fox R.D., 1999**, In **Alyah**, La spiruline : technique, pratique et promesse Edisud. 246p.
- 23-**Fox R.D., 2004**, Compte-rendu du Mini-colloque sur la spiruline à Tamanrasset 18 - 24 avril 2004, 22p.
- 24-**Geitler, 1982**, .Association française pour l'algologie appliquée, *Actes du premier*

symposium sur la spiruline Spirulina Platensis (Gom).

- 25-**Guarnier F., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Le Mair T., mai 2008**, organisation mondiale gastroentérologie, Probiotiques et prébiotiques, 1-22p.
- 26-**Hayashi T. and Hayashi K., 1996**, Journal of Natural Products, *Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga Spirulina platensis*, 83-87p.
- 27-**Holland D.F., 1920**, journal of bacteriology 5, Generic index of the commoner forms of bacteria, 215-229p.
- 28-**Husain I., Poupard J.A., Norris R.F., 1972**, journal of bacteriology 3, influence of nutrition on morphology of strain of bifidobacterium bifidum, 841-844p.
- 29-**Ilari J.L., Melcion J.P., 2003**, Ed.TEC & DOC, collection sciences et techniques agroalimentaires, technologie des pulvérulents dans les IAA, France, 814p.
- 30-**ISO 1842, NA 2233, 1993**
- 31-**ISO 6579, 2002**
- 32-**ISO 4832, 2006**
- 33-**ISO 646**
- 34-**J.O.R.A. N°35** du 25Mai 1998.
- 35-Journal of Life Sciences 6, 2012, 740-746p.
- 36-**Lacoste S., 2011**, Article, LA SPIRULINE Merveilleuse petite cyanobactérie, 16p.
- 37-**Le Bail D., 2011**, Journal NUTRITHÉRAPIE, Article N° 138, PRÉDIABÈTE ET DIABÈTE DÉBUTANT, La complémentation à mettre en œuvre, 82-84p.
- 38-**Levesque G., 2011**, Article n°1, Le lait : Un aliment essentiel source d'antioxydants, RENNES, 1-2p.
- 39-**Li Y., Guo C., Yang J., Wei J. and Cheng S., 2006**, evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract, Food Chem., 254-260p.
- 40-**Lounici S., 2010**, Mémoire de Magister, Caractérisation de la spiruline : *spirulina hmat*, optimisation de ses conditions de culture et applications industriels, Algérie, 131p.

- 41-**Luquet F-M., Corrieu G., 2005**, Ed. Tec and Doc, BACTERIES LACTIQUES ET PROBIOTIQUES, Paris, 307p.
- 42-**Mbodj ndeye A., 2003**, étude de l'activité antidiabétique des extraits acetoniques, méthanoliques et hexaniques VERNONIA COLORATA chez des rats Wistar , Dakar, 57p
- 43-**Meste M., Simatos D. et Lorient D., 2002**, in Lounici, Ed. Tec and Doc, l'eau dans les aliments, paris, 674p.
- 44-**Méthode de Bertrand, 1994**
- 45-**N° 01.98.51**
- 46-**NA 1218, 1992**
- 47-**NF V 08-052**
- 48-**NF V 08-051, 2003**
- 49-**Nwosu F., Morris J., Lund V.A., Stewart D., Ross H.A., McDougall G.J., 2010**, *Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae, Food Chemistry, published online ahead of print, doi: 10.1016/j.foodchem*
- 50-**Opdencamp H., Veerkamp J., Oosterhof A., Can Hal Beek H., 1985**, Structure of the lipoteichoic acids from *B. bifidum* spp., Penn., Biochim. Biophys., Acta., 301-313p.
- 51-**Teissedre P-L. 2002**, Effets physiologiques possibles d'une consommation modérée de vin pour diverses pathologies chroniques de l'homme : athérosclérose, diabète, hypertension, cancer, France, E-mail : pteissed@univ-montp1.fr
- 52-**Rogosa M., Genus III., 1974**, Bifidobacterium Orla-Jensen. In: Buchanan R., Gibbons N., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins: Baltimore, 669-676p.
- 53-**Romay C., Armesto J., Ramirez D., González R., Ledon N. and García I., 1998**, Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae, Inflammation Research, 47(1), 36-41p.
- 54-**Ross E., Dominy W., 1990**, Poultry Science, *The nutritional value of dehydrated, blue-green algae Spirulina platensis for poultry*, 794-800p.
- 55-**Sahin F., Gulluce M., Daferera D., Sokmen M., Polissiou M., Agar G. and Ozer H., 2004**, Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *food control*, Vol.15, 549-557p.

- 56-**Sanchez-mareno C., 2002**, Review, methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems, *food Sci Technol Intern* 8 : 121-137p.
- 57-**Sall M.G, Dankoko B., Badiane M., Ehua E. et Kuakuwin N., 1999**, *Résultats d'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline à Dakar*, 46 (3), 143-146p.
- 58-**Scardovi V., 1965**, *Genus Bifidobacterium*, In: Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J., Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins: Baltimore, volume 2, 1418-1434p.
- 59-**Schuck P., 2001**, Ed. INRA, *Innovations Agronomique*, Modifications des propriétés fonctionnelles des poudres de protéines laitières : Impact de la concentration et du séchage, 71-99p., pierre.schuck@rennes.inra.fr.
- 60-**Wheeler D.L., Chappey C., Lash A.E., Leipe D ..,Madden T.L. and Schuler G.D., 2000**, *Database resources of the National Center for biotechnology Information*, 10-14p.
- 61-**XPV 08-601, 2005**
- 62-([http:// kounou.Lille.inra.fr](http://kounou.Lille.inra.fr)) (<http:// kounou.Lille.inra.fr>)
- 63-www.ceed-diabete.org

TABLE DES MATIERES

Résumé

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et sigles

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Le diabète

1.1. Introduction	02
1.2. Le diabète	04
1.2.1. Définitions et généralités	04
1.2.2. Le pancréas et l'insulino-sécrétion	05
1.2.3. La pancréatotoxicité à l'alloxane	11
1.2.4. Hyperglycémie chronique et complications organiques	11
1.2.5. Le diabète et le stress oxydatif	12
1.2.6. Les antidiabétiques : de l'efficacité à la toxicité	12
1.2.7. Espèces antidiabétiques	12
1.2.8. Diabète et nutrition	13

Chapitre 2 : La spiruline

2.1. Introduction	16
2.2. Historique de la spiruline	17

3.1.2. Prebiotiques	46
3.1.3. Synbiotiques	47
2.3. Distribution géographique naturelle	18
2.5. Composition de <i>Spirulina platensis</i>	30
2.4. La culture de spiruline	30
2.5.1. Protéines	30
2.4.1. Biologie de l'algue	30
2.5.2. Lipides totaux	30
2.4.2. Bases techniques de la production	32
2.5.3. Glucides	31
2.4.2.1. Le milieu de culture	31
2.5.4. Acides nucléiques (ADN et ARN)	31
2.4.2.2. Lumière et agitation	25
2.5.5. Vitamines	31
2.4.2.3. Optimisation du rendement	26
2.5.5.1. Vitamines hydrosolubles	31
2.4.2.4. Suivi des cultures	27
2.5.5.2. Vitamines liposolubles	33
2.4.3. Culture industrielle de cet organisme	28
2.5.6. Minéraux et Oligoéléments	33
2.5.7. Métaux	34
2.5.8. Pigments	36
2.6. Les multiples usages de la spiruline	36
2.6. 1. Approche nutritionnelle	37
2.6. 2. Approche thérapeutique	38
2.6. 3. Aquaculture et aquariophilie	40
2.6. 4. Autres utilisations de la Spiruline	41
2.7. Spiruline et diabète	41
2.8. Non toxicité de la Spiruline	43
Chapitre 3: Les probiotiques	
3.1. Définitions et généralités	45
3.1.1. Probiotiques	46

	47
3.2. Composition et sélection	
3.3. Les effets bénéfiques	48
3.4. Les bifidobacteries, morphologie et caractéristiques taxonomiques	48
3.5. Les <i>bifidobacteries</i> et leur action au niveau du tractus gastro-intestinal	50
3.6. Méthodes de recherche traditionnelles des bifidobactéries	52

Partie pratique
Matériel et méthodes

1. L'objectif de l'étude	55
2. Matériel végétal et souche	55
2.1. la spiruline : (nature, origine, aspect)	55
2.2. La souche bifide utilisée	56
3. Echantillonnage	56
4. Méthodes d'analyse	57
4.1. Analyses physico-chimiques de la spiruline	57
4.1.1. Détermination de la teneur en eau	57
4.1.2. Mesure du potentiel d'hydrogène (pH)	58
4.1.3. Détermination de la teneur en azote en vu du calcul de la teneur en protéines brutes	58
4.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse	60
4.1.5. Détermination de la matière minérale	61
4.1.6. Dosage des glucides	62
4.1.7. Détermination de la teneur en composés phénoliques	63
4.1.8. Détermination de l'activité anti-oxydante	64
4.2. Analyses microbiologiques de la spiruline	65
4.2.1. La préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique	65
4.2.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux	66

4.2.3. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux-	68
	69
4.2.4. Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices	69
4.2.5. Recherche des <u>Staphylococcus aureus</u>	70
4.2.6. Dénombrement des levures et moisissures ; technique par comptage des colonies à 25°C	71
4.2.7. Méthode horizontale pour la recherche des <i>Salmonella</i> spp	71
4.3. La revivification de la souche bifide	72
4.4. Les essais <i>in vitro</i>	73
4.5. Identification de la population d'étude	74
4.6. Induction de diabète expérimental	74
4.7. Préparation du régime	75

Résultats et discussions

1. Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la poudre de la spiruline	78
	84
2. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les la poudre de <u>Spirulina maxima</u>	85
	85
3. Dtermination de la teneur en composés phénoliques	85
4. Détermination de l'activité anti-oxydante	88
	88
5. Résultats des essais <i>in vitro</i>	
6. Résultats du test <i>in vivo</i>	91

Conclusion

Références bibliographique

Tables des matières

Annexes

Lexiques

ANNEXE 1 : APPAREILLAGES ET MODES OPERATOIRES DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

1- Mesure du potentiel d'hydrogène (pH) (ISO 1842, NA 2233, 1993)

Appareillages

pH -mètre de type (Inlabo Multi 720) ; équipé d'un système de correction de la température

Mode opératoire

-régler le système de correction de la température du pH-mètre

-étalonner le pH-mètre en utilisant deux solutions tampons l'une à $\text{pH} = 7.00 \pm 0.02$, T (20°C) et l'autre à $\text{pH} = 4.00 \pm 0.02$, T (20°C) ; pour un mesurage précis, et afin de compenser la diminution de la sensibilité de l'électrode due ; au vieillissement.

-rincer l'électrode avec de l'eau distillée.

-essuyer l'électrode avec du papier Joseph.

- introduire l'électrode dans la prise d'essai préalablement homogénéisée

-lire le pH directement sur l'échelle de l'appareil lorsqu'une valeur constante a été obtenue

-effectuer trois déterminations sur la prise d'essai séparées provenant du même échantillon préparé.

2- Détermination de la teneur en eau (le Meste M., Simatos D. et Lorient D., 2002.)

Appareillage

- Récipient, en verre, muni d'un couvercle suffisamment étanche et présentant une surface utile permettant d'obtenir une répartition de la prise d'essai d'environ $0,3 \text{ g/cm}^2$ soient des vases à tare.
- Etuve électrique, bien ventilée, réglable à 103°C .
- Dessiccateur, garni d'un déshydratant efficace, soit sable de fontaine bleue.
- Balance analytique.
- Spatule

Mode opératoire

Les opérations décrites ci-après ont été effectuées immédiatement après l'ouverture des tubes à essai contenant les échantillons pour laboratoire.

-Peser, après refroidissement le récipient vide préalablement séché, ainsi que son couvercle, à 103⁰ C pendant 30 min.

-Peser, à 0.001 mg près, environ 1 g d'échantillon pour essai dans le récipient préalablement taré.

-Etaler uniformément la prise d'essai

- Placer le récipient dans l'étuve, préalablement chauffée à 103⁰ C. Mettre le couvercle du récipient à coté de celui-ci.

-Laisser sécher pendant 4 h comptées à partir du moment où la température de l'étuve atteint à nouveau 103⁰ C.

-Retirer le récipient de l'étuve, mettre le couvercle.

- Laisser refroidir pendant environ 30 min dans le dessiccateur.

- Peser à 0.001 mg près.

-Réintroduire le récipient dans l'étuve pendant 2 h ; peser chaque une heure afin de contrôler la stagnation du poids de l'échantillon.

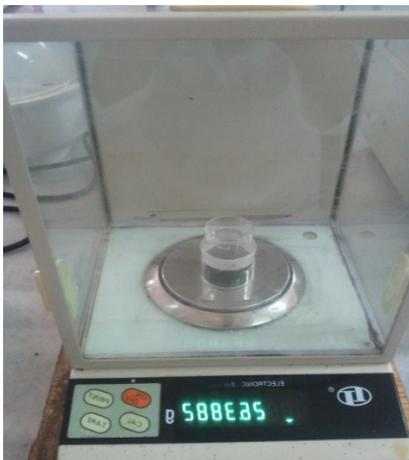


Figure 18 ♦ balance analytique
(Originale, 2013)



Figure 19 ♦ étuve de séchage, réglée à 103°C
(Originale, 2013)

3- Détermination de la teneur en azote en vu du calcul de la teneur en protéines brutes selon la méthode Kjeldahl (selon la norme ISO 646 modifiée par LCI)

Réactifs

- sulfate de potassium
- sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- acide sulfurique ou acide chlorhydrique
- saccharose
- indicateur mixte
- acide borique

Appareillage

Matériels courant du laboratoire, et notamment :

- balance analytique
- appareillage pour la minéralisation, la distillation et le titrage.

Mode opératoire

- la minéralisation de l'échantillon : pendant cette étape ; l'azote protéique se transforme en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique ; qui sert aussi à piéger l'ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d'ammonium par action de l'acide et la base ; en présence d'un catalyseur « sulfate de cuivre » et du sel K_2SO_4 qui a pour but d'élever le point d'ébullition de la solution pour accélérer la réaction de minéralisation

- introduire la prise d'essai (1g) dans un matras à minéralisation de Kjeldahl
- ajouter 15mL de sulfate de potassium K_2SO_4
- ajouter 1g de sulfate de cuivre CuSO_4 comme catalyseur
- ajouter 25mL d'acide sulfurique H_2SO_4 ; sous une hotte bien ventilée
- mélanger soigneusement de façon à assurer un mouillage complet de la poudre
- chauffer pendant 3h à 350°C
- laisser refroidir
- la distillation de l'ammoniac : avant de distiller l'ammoniac sous la forme du sel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'addition d'une solution de NAOH en excès ajouter 50mL d'eau pour

dissoudre complètement les sulfates .Le distillat d'ammoniac est recueilli dans 150mL d'acide borique afin de former des sels borates d'ammonium(cours contrôle de qualité) .

-titrage de l'ammoniac : l'ammoniac sous forme de borates d'ammonium est titré directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide sulfurique et d'un indicateur mixte. Ce titrage est recommandé car il facilite la vérification de la fin de distillation par changement de la coloration de l'indicateur mixte (cours contrôle de qualité).

Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en utilisant 1g du saccharose comme prise d'essai sans l'échantillon pour soustraire l'ammoniac contenu dans les réactifs.



Figure 20 ♦ distillateur de protéines
(Originale, 2013)

4- Détermination de la teneur en matière grasse selon la méthode de soxhlet

Réactifs

-n-hexane (C_6H_{14})

Appareillages

-appareil soxhlet

-vases à tare

-cartouches

-spatule

- coton
- étuve
- balance analytique
- rotavapeur

Mode opératoire

-les échantillons issus de la détermination de l'humidité sont réutilisés pour la détermination des matières grasses (il faut que l'échantillon soit sec pour minimiser le problème technique d'appareil utilisé)

-à l'aide d'une spatule ; introduire le contenu de la vase à tare dans la cartouche, bien récupérer toute la masse à l'aide d'un coton imbibé d'hexane

-remplir le ballon préalablement peser avec de l'hexane

-faire fonctionner l'appareil pendant 2 cycles contenant chacun 3 phrases afin d'assurer que toute la matière grasse est passée dans l'hexane

-évaporer l'hexane à l'aide du rotavapeur qui facilite sa récupération

-évaporer le reste d'hexane dans l'étuve

-peser de nouveau le ballon plein



Figure 21 ♦ appareil de Soxhlet
(Originale, 2013)



figure 22♦ rotavapeur
pour extraction du solvant
(Originale, 2013)

5- Dosage des glucides selon la méthode de Bertrand, 1994 :

Réactifs :

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

- solution de ferrocyanure de potassium à 15% dans l'eau.
- solution d'acétate de zinc à 30% : dissoudre 30g d'acétate de zinc dans l'eau et ajouter 3mL d'acide acétique à chaud. Ajuster à 100mL avec de l'eau.
- acide chlorhydrique concentré
- solution de sulfate de cuivre :
 - Sulfate de cuivre cristallisé : 40 g
 - Eau distillé : 1000mL
- solution alcaline :
 - Tartrate double de sodium et potassium : 200g
 - Soude caustique : 150g
 - Eau distillée : 1000mL
- solution ferrique :
 - Sulfate ferrique : 50g
 - Acide sulfurique pur : 200g
 - Eau distillée : 1000mL
- solution titrée de permanganate de potassium à 0.1N

Appareillages :

- agitateur magnétique
- bain marie réglé à 70°C
- creusets en verre filtré n°4
- fioles à vide
- ballons de 1litre

Mode opératoire

- poser 20g d'échantillon dans un ballon d'un litre
- ajouter 508mL d'eau à 60°C
- agiter pendant 30minutes sur agitateur magnétique
- prélever 200mL du liquide surnageant, transvaser dans une fiole de 250mL ; en rinçant la fiole de 200mL avec de l'eau distillée et procéder à la défécation en ajoutant 5mL de

sodium de ferrocyanure de potassium et après agitation 5mL de solution d'acétate de zinc. Agiter. Compléter à 250mL. Agiter. Filtrer.

-prélever 50mL de filtrat ; mettre dans une fiole de 100mL ; en rinçant la fiole de 50mL avec de l'eau distillée. Ajouter 1mL d'acide chlorhydrique pur.

-placer la fiole dans un bain marie à 70°C et la laisser 20minute.

-refroidir rapidement

-compléter à100mL avec de l'eau distillée ; bien mélanger et procéder au dosage des sucres réducteurs totaux

-prélever 20 à 25mL de solution soit V (selon la teneur présumée) dans un erlen de 250mL

-ajouter 20mL de solution de sulfate de cuivre

20mL de solution alcaline

-chauffer jusqu'à ébullition que l'on maintient 3mn exactement

-refroidir rapidement sous eau froide

-décanter sur creuset de verre filtré ne laissant pas passer de précipité

-laver à l'eau chaude le précipité, en veillant à ce que celui-ci ne s'oxyde pas à l'air

- transvaser tout le précipité sur le creuset après avoir placé celui-ci sur une fiole à vide propre

-rincer l'erlen ayant contenu le précipité par de la solution ferrique

-transvaser cette solution dans le creuset, le précipité se dissout, compléter la dissolution par 10mL de solution ferrique, ou plus si nécessaire.

-rincer 1 ou 2 fois avec de l'eau distillée

-titrer la solution recueillie dans la fiole à vide par la solution de permanganate de potassium



Figure 23 ♦ décantation du sur creuset de verre filtré placer sur une fiole à vide (Originale, 2013)

Tableau 17 : Sucres : Tableau de conversion

mL de Mn O ₄ K 0.1 N	Cuivre en mg	Glucose en mg
3.2	20.3	10.0
3.3	20.9	10.2
3.4	21.5	10.5
3.5	22.2	10.9
3.6	22.8	11.2
3.7	23.4	11.5
3.8	24.1	11.9
3.9	24.7	12.2
4.0	25.4	12.5
4.1	26.0	12.8
4.2	26.6	13.1
4.3	27.3	13.5
4.4	27.9	13.8
4.5	28.5	14.1
4.6	29.2	14.5
4.7	29.8	14.8
4.8	30.4	15.2
4.9	31.1	15.5
5.0	31.7	15.7
5.1	32.3	16.0
5.2	33.0	16.4
5.3	33.6	16.7
5.4	34.2	17.0

5.5	34.9	17.3
5.6	35.5	17.6
5.7	36.1	17.9
5.8	36.8	18.3
5.9	37.4	18.6
6.0	38.1	19.0
6.1	38.7	19.3
6.2	39.3	19.6
6.3	40.0	19.9
6.4	40.6	20.2
6.5	41.2	20.5
6.6	41.9	21.0
6.7	42.5	21.2
6.8	43.1	21.5
6.9	43.3	22.0
7.0	44.4	22.2
7.1	45.0	22.5
7.2	45.7	23.0
7.3	46.3	23.2
7.4	46.9	23.5
7.5	47.6	24.0
7.6	48.2	24.2
7.7	48.8	24.5

6- Détermination de la matière minérale (NA 1218, 1992)

Réactifs

-une solution d'acétate de magnésium ou de chlorure d'aluminium

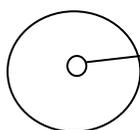
Appareillage

Matériels courant du laboratoire, et notamment :

-balance analytique

-creusets en porcelaine inattaquable dans les conditions d'essai

-rondelle de papier filtre sans cendres ; s'adaptant exactement aux creusets, ayant au centre un cercle de 2mm de diamètre et incisée le long du rayon (voir schéma)



-papiers filtre sans cendres

-baguette en verre

-four à moufle réglé à 550°C

-dispositifs appropriés pour la dessiccation et la préincinération (bain de sable, plaque chauffante)

Mode opératoire

-peser, à 0,001g près, 1g de l'échantillon dans un creuset

-ajouter 1,5mL d'acétate de magnésium

-mélanger soigneusement avec une baguette en verre

-essuyer celle-ci avec un morceau de papier filtre sans cendres, et le déposer dans le creuset

-recouvrir le creuset avec la rondelle de papier filtre sans cendres

-carboniser le produit dans un bain de sable

-introduire le creuset dans le four à moufle à $525 \pm 25^\circ\text{C}$

-incinérer pendant 60mn jusqu'à la disparition totale des particules charbonneuses

- il reste des particules charbonneuses, donc on procède comme suit :

-refroidir

-humidifier avec de l'eau

-évaporer l'eau sur la plaque chauffante

-réintroduire dans le four à moufle

- L'incinération est terminée lorsqu' on observe plus de particules charbonneuses



Figure 24 ♦ four à moufle. **Figure 25** ♦ bain de sable.



Figure 26 ♦ échantillon après incinération ; dans des creusets.

(Originale, 2013)

7- Détermination de la teneur en composés phénoliques selon la méthode de Folin- Ciocalteu d'après Li Y. et al, 2006 :

Mode opératoire

-dans un tube à essai, 0.5mL de l'extrait méthanolique (L'évaluation de la teneur en composés phénoliques s'est faite après extraction des polyphénols, se fait par agitation de 10g de spiruline dans un mélange méthanol : eau (4 :1/ V : V) à 25°C pendant 3h suivi d'une filtration et centrifugation à 4000 tours/ mn pendant 10mn. L'extrait ainsi obtenu, est sujet du dosage.) est ajouté à 2.5mL de réactif de folin-ciocalteu dilué dix fois.

-juste après un moment variant entre 30 s et 8mn, 2mL de carbonate de sodium à 7.5% (75 g/l) sont additionnées

-les tubes à essai sont maintenus à l'obscurité pendant 30mn à température du laboratoire, l'absorbance est mesurée à 760 nm

-un blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait méthanolique le méthanol

-les polyphénols totaux sont quantifiés à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue par mesure des absorbances des concentrations connues de solution étalons de l'acide gallique (0 à 0.17 mg/ mL)

-les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique par rapport à la matière sèche (mg EAG/g MS)



Figure 27 ♦ Filtration de l'échantillon

8- Détermination de l'activité anti-oxydante selon Sahin F. et al, 2004 :

Mode opératoire

- préparation de la solution DPPH méthanolique
- préparation des différentes concentrations d'extrait
- prélèvement de 0.1mL de chaque concentration défectuée en raison de deux tubes

-préparation de la solution contrôle → 3.9 mL de DPPH méthanolique
→ 0.1 mL méthanol

-le blanc → méthanol

-l'échantillon → 0.1 mL de chaque concentration
→ 3.9 mL méthanol

-échantillon test → 0.1 mL de chaque concentration
→ 3.9 mL DPPH méthanolique

-incuber pendant 30 mn

-lire au spectrophotomètre à la même longueur d'onde De la solution DPPH méthanolique



Figure 28 ♦ Etapes du pouvoir de piégeage du radical DPPH (image originale, 2013)

ANNEXE 2 : APPAREILLAGES ET MODES OPERATOIRES DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

1-Appareillages utilisés pour la préparation de la suspension-mère et les dilutions décimales :

Appareillage et verrerie

NOTE : Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, l'échantillon, les dilutions, sauf s'il est livré stérile (sacs en plastique, pipettes en plastique, etc. ...) doit être stérilisé

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

- Appareils pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave)
- Homogénéisateur, de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en plastique.
- Agitateur Vortex
- Tubes à essais ayant une capacité suffisante pour contenir, avec un espace libre suffisant pour permettre une agitation convenable, 10 mL de la suspension-mère, ou des dilutions décimales suivantes.
- Pipettes (bouchées avec du coton) ayant une capacité nominale de 1 mL
- Pipettes graduées de grande capacité (bouchées avec du coton), par exemple de 10 ou 20 mL.
- Balance, de portée suffisante (sensibilité 0,01 g).



Figure 29 ♦ préparation des dilutions décimales

2- Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (NF V 08-051, 2003)

Appareillage et verrerie

Matériels courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit :

- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave)
- Etuve, réglable à $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Boîtes de pétri
- Bain d'eau, réglable à une température comprise entre 44°C et 47°C
- Appareil de comptage de colonies
- Tubes à essai

Méthodologie

- A partir des dilutions décimales 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} , porter aseptiquement 1mL dans une boîte de pétri vide préparée à cet usage et numérotée.
- Compléter ensuite avec environ 20 mL de gélose PCA fondue puis refroidie
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 »
- Laisser solidifier sur paillasse, puis rajouter une deuxième couche d'environ 5 mL de la même gélose. Cette double couche a un rôle protecteur contre les diverses contaminations pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose. Les boîtes seront incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72 h avec :
 - première lecture à 24h
 - deuxième lecture à 48h
 - troisième lecture à 72h

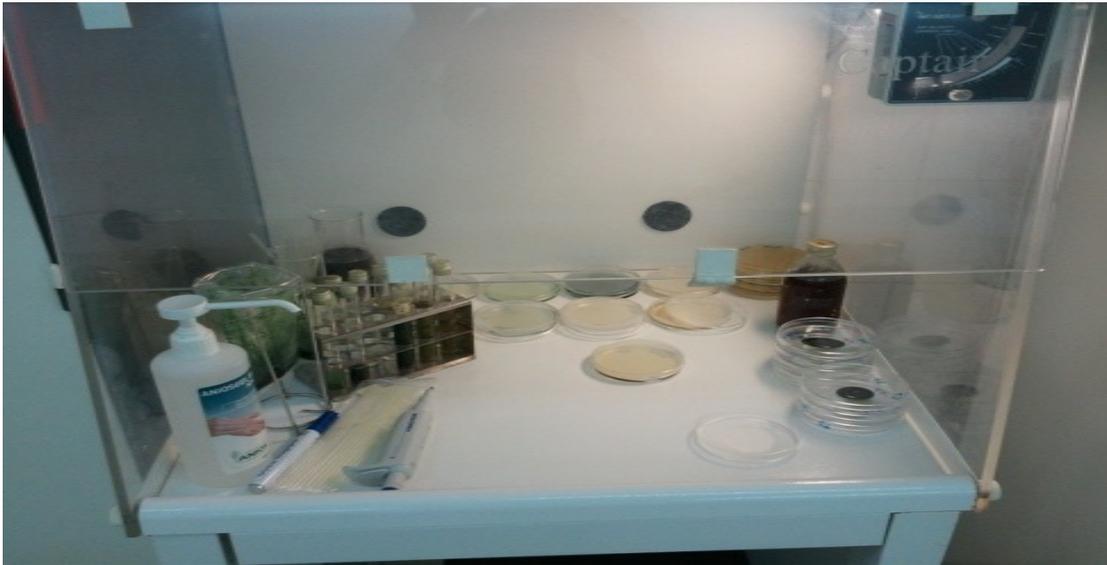


Figure30◆ ensemencement en profondeur du milieu de culture
dans une boîte de Pétri

3- Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux- méthode par comptage des colonies (ISO 4832, 2006)

Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment ce qui suit :

- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide soit un autoclave.
- Etuve, réglable à $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou 37°C .
- Boîtes de Pétri, en plastique d'un diamètre de 90 mm à 100 mm.
- Pipettes à écoulement total, ayant une capacité nominale de 1 mL.
- Bain d'eau, capable de fonctionner de 44°C à 47°C .
- Flacons, pour porter à ébullition et conserver les milieux de culture.
- pH-mètre, précis à 0,1 unité de pH à 25°C .
- anse bouclée, en platine iridiée ou en nickel chrome ayant un diamètre de 3 mm environ ou anses à usage unique.

Méthodologie

Ensemencement et incubation

- Prendre quatre boîtes de Pétri stériles.
- Transférer à l'aide d'une pipette stérile 1 mL de la dilution mère au centre de la boîte.
- Verser environ 15 mL du milieu VRBL, de 44⁰ C à 47⁰C, dans chaque boîte de Pétri ;(Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère et le moment où le milieu est versé dans les boîtes ne doit pas dépasser 15 min).
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture par des mouvements en 8 et circulaires.
- Laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Pétri sur une surface fraîche et horizontale.
- Préparer également une boîte témoin avec environ 15 mL du milieu de culture pour contrôler sa stérilité.
- Après solidification complète, couler à la surface du milieuensemencé environ 4 mL du milieu VRBL, de 44⁰C à 47⁰C ; laisser solidifier.
- Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber dans l'étuve réglée à 30⁰C ou 37⁰C pendant 24 h ± 2 h.

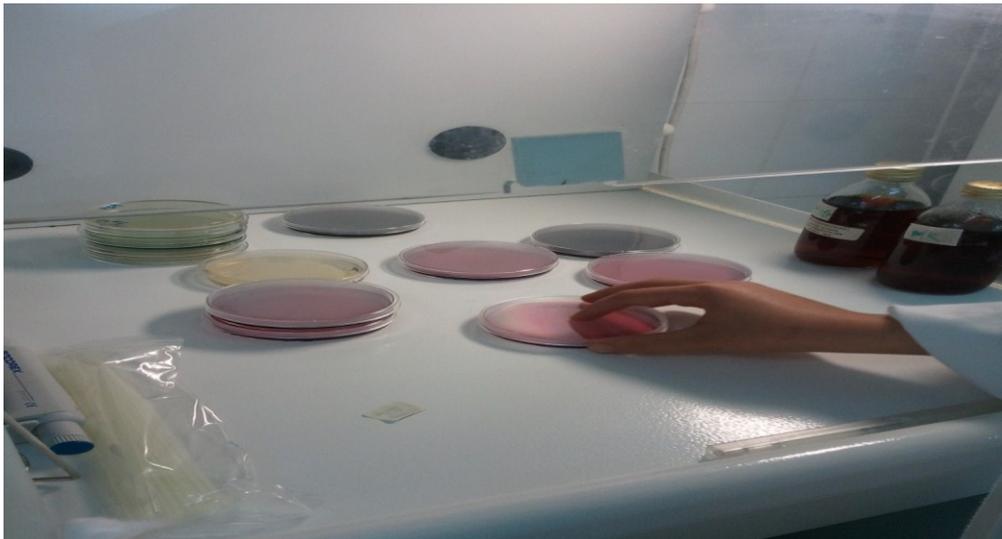


Figure 31 ♦ homogénéisation de l'inoculum au milieu de culture par des mouvements en 8 et circulaires.

4- Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices (XP V 08-601, 2005)

Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et en particulier ce qui suit :

- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide soit un autoclave.
- Etuve, réglable à $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Jarres pour anaérobiose.
- Bain d'eau, pouvant être maintenu à une température comprise entre 44°C et 47°C .
- Flacons de capacité appropriée (au maximum 100 mL).
- Tubes à essais stériles.
- Pipettes graduées à écoulement total, de capacités nominales de 1 mL.
- pH-mètre, précis à 0,1 unité pH à 25°C et de seuil minimal de mesure de 0,01 unité pH.

Méthodologie

Ensemencement et incubation

- Prendre les tubes de milieu désaéré et ramené à une température comprise entre 44°C et 47°C .
- A l'aide d'une pipette stérile, déposer 1mL de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1mL de la suspension-mère dans le cas d'autre produits, à la surface de milieu de culture.
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu sans faire de bulle pour ne pas provoquer une oxygénation du milieu.
- Recommencer ces opérations avec les dilutions suivantes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, pour chaque dilution décimale.
- Laisser le mélange se solidifier en posant les tubes dans de l'eau froide.
- Incuber à 46°C pendant $20\text{ h} \pm 2\text{ h}$ à l'aide de l'étuve.

5- Recherche des Staphylococcus aureus ; Norme afnor NF V 08-052.

Méthodologie

- Au moment de l'emploi faire fondre un flacon contenant 225 mL de gélose Baird Parker.
- Le refroidir ensuite dans un bain d'eau à 45°C, puis ajouter 15 mL d'une solution de téllurite de potassium, mélanger soigneusement et aseptiquement.
- Répartir le milieu en boîtes de pétri à raison de 15 à 18 mL par boîte.
- Laisser solidifier les boîtes sur paillasse.
- Inoculer les boîtes avec 0,1 mL de la dilution mère (en raison de quatre gouttes dans chaque boîte)
- Etaler les gouttes à l'aide d'un râteau.
- Incuber les boîtes pendant 48h \pm 2 à 37°C, première lecture après 24h \pm 2.

6- Dénombrement des levures et moisissures ; technique par comptage des colonies à 25°C (C.A.C.Q.E. N° 01-97-61)

Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave).
- Etuve, réglable à 25°C \pm 1° C.
- Bain d'eau, réglable à 45 \pm 1° C.
- pH-mètre à compensation de température, ayant une précision de réglage de + 0,1 unité de pH à 25° C.
- Flacons (des flacons de culture munis de couvercles à vis en métal non toxique peuvent être utilisés).
- Pipettes graduées, de capacités nominales de 1mL.
- Boîtes de Petri, d'un diamètre de 90 à 100 mm.

Méthodologie

-Ensemencement et incubation

-Prendre trois boîtes de Petri stériles.

-Transférer, dans chacune de ces boites, à l'aide d'une pipette stérile, 1mL de la suspension mère.

- Couler dans chaque boîte de Petri, environ 15 mL de la gélose, provenant d'un flacon de culture fondue au préalable et maintenue à $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dans le bain d'eau. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère ; au moment où le milieu est coulé dans les boites, ne doit pas dépasser 15 min.

-Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier en posant les boites de Petri sur une surface fraîche horizontale.

-Préparer également une boîte témoin avec 15 mL du milieu pour contrôler sa stérilité.

-Retourner les boîtes et les placer à l'étuve à $25^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$.

7- Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (ISO 6579, 2002)

Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et en particulier, ce qui suit :

- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide, soit un autoclave
- Etuve, réglable à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Etuve, réglable à $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Bain d'eau, réglable à 44°C à 47°C .
- Anses bouclées, d'environ 3 mm de diamètre.
- pH-mètre, ayant une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH de 20°C à 25°C .
- Tubes à essai, de capacité appropriée.
- Flacons à capsules métalliques à vis non toxiques peuvent être utilisés.
- Pipettes graduées, de 1 mL de capacité nominale.
- Boites de Petri, de petites dimensions (diamètre de 90 mm à 100 mm).

Méthodologie

- Pour la préparation de la suspension-mère, utiliser comme diluant le milieu de préenrichissement : eau peptonée tamponnée.
- Incuber la suspension-mère à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.
- Transférer 0,1 mL de la culture obtenue dans un tube contenant 10 mL de bouillon RVS et 1 mL de la culture obtenue dans un tube contenant 10 mL de bouillon MKTTn.
- Incuber le bouillon RVS ensemencé à $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ et le bouillon MKTTn à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- A partir de la culture obtenue dans le bouillon RVS, après $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ d'incubation, ensemencer avec une anse la surface d'une boîte de Petri contenant le premier milieu d'isolement sélectif (gélose XLD), de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

Utiliser deux boîtes, l'une après l'autre, en se servant de la même anse.

Opérer de même avec le deuxième milieu d'isolement sélectif en se servant d'une nouvelle anse et de boîtes de Petri de dimensions appropriées.

- A partir de la culture obtenue dans le bouillon MKTTn, après $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ d'incubation, répéter les opérations décrites ci-dessus avec les deux milieux d'isolement sélectifs.
- Dans le cas du premier milieu d'isolement, retourner les boîtes, les placer dans une étuve réglée à 37°C . Pour le second milieu d'isolement, suivre les recommandations du fabricant.
- Après $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ d'incubation, examiner les boîtes afin de rechercher la présence de colonies typiques de *Salmonella*, ainsi que les colonies atypiques susceptibles d'être des *Salmonella*. Marquer leur position sur le dessous de la boîte.

Les colonies typiques de *Salmonella* cultivées sur gélose XLD ont un centre noir et sont entourées d'un halo clair transparent rouge du à un changement de l'indicateur du milieu.

Incuber le second milieu sélectif à la température et au temps appropriés puis examiner la présence de colonies qui, d'après leurs caractéristiques, peuvent être considérées comme des *Salmonella* présumées.

ANNEXE 3 : RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

1- Mesure du potentiel d'hydrogène (pH) (1842, NA 2233, 1993)

Tableau 18 : résultats du pH

pH	1 ^{ère} détermination	2 ^{ème} détermination	3 ^{ème} détermination	Moyenne arithmétique
		7.79	7.80	7.85

2- Détermination de la teneur en eau le Meste M., Simatos D. et Lorient D., 2002.

Tableau 19 : résultats de la teneur en eau

	Vase à tare vide (g)	m ₀ (g)	Vase à tare pleine (g)	Vase à tare après séchage (g)	m ₁ (g)	$(m_0 - m_1) \times \frac{100}{m_0}$ (%)	Moyenne Arithmétique (%)
1	25.37	1	26.37	26.31	1	8	8
2	25.39	1	26.39	26.29	1	8	
3	25.33	1	26.33	26.25	1	8	

3- Détermination de la teneur en azote en vu du calcul de la teneur en protéines brutes selon la méthode Kjeldahl (selon la norme ISO 646 modifiée par LCI)

Tableau 20 : résultats de la teneur en protéines

	V ₀ (mL)	V ₁ (mL)	m (g)	$\frac{1,4(v_1 - v_0) \times N}{m}$ (%)	Moyenne arithmétique	Pourcentage de protéines brutes (%)
1	0,26	26,40	1	9.15	9.3	58.12
2		27,30	1	9.46		
3		26,80	1	9.29		

4- Détermination de la teneur en matières grasse selon le protocole interne de LCI

Tableau 21 : résultats de la teneur en lipides

	M (g)	$B_p - B_v$ (g)	Lipides (%)	Moyenne arithmétique
1	0.92	112.8-112.74= 0.06	6.52	6.52
2	0.92	111.5-111.56= 0.06	6.52	
3	0.92	112.91-112.85= 0,06	6.52	

5-Détermination de la matière minérale (NA 1218, 1992)

Tableau 22 : résultats de la teneur en matière minérale

	creusets vides m ₀ (g)	Creusets pleins m ₁ (g)	Creusets après l'incinération m ₂ (g)	Cendres totales = $\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$	Moyenne arithmétique
1	44,28	45,28	44,34	6,00	6,50
2	43,46	44,46	43,52	6,00	
3	36,75	37,75	36,82	7,00	

6- Dosage des glucides selon la méthode de Bertrand, 1994 :

Tableau 23 :_résultats de la teneur en sucres totaux (selon le tableau de Bertrand)

		Volume de kmno ₄ (mL)		Pourcentage en sucres totaux(%)
				$\frac{mg\ glucose \times 100 \times 250 \times 500 \times 100}{V \times 50 \times 200 \times Poids\ de\ la\ prise\ d'essai\ en\ mg}$
1	0.4	0.4		19.53
2	0.3			
3	0.5			

7- Détermination de la teneur en composés phénoliques selon la méthode de Folin-Ciocalteu d'après Li Y. et al, 2006 :

La concentration est 10 mg/mL → absorbance à 760 nm → A = 0.287

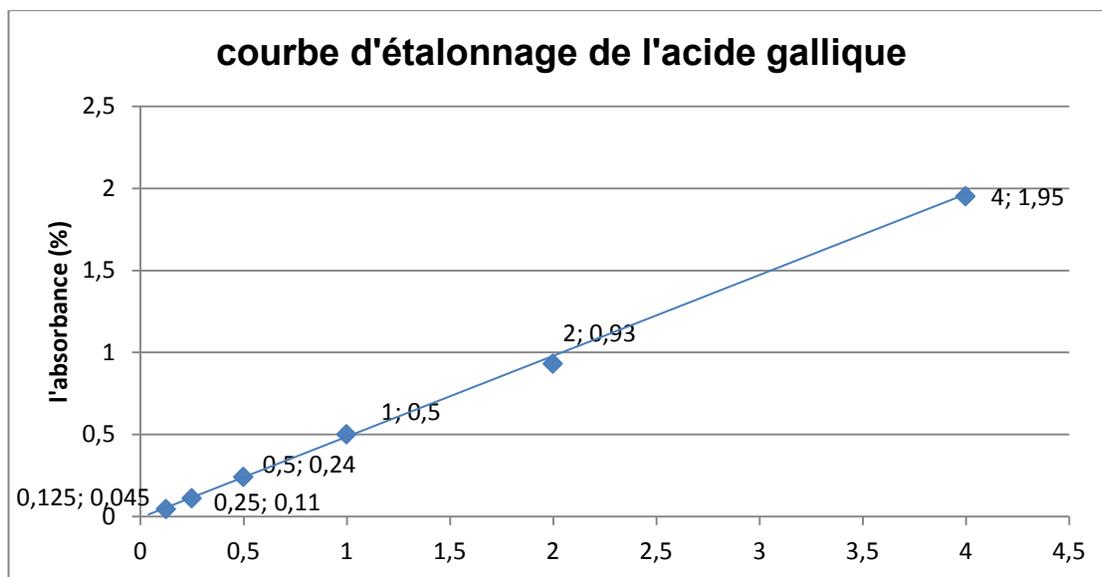


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

$Y = 0.487X - 0.010$

$$0,287 = 0.487X - 0.010$$

$$X = 0.610 \text{ mg EAG/g MS}$$

8- Détermination de l'activité anti-oxydante selon Sahin F. et al, 2004 :

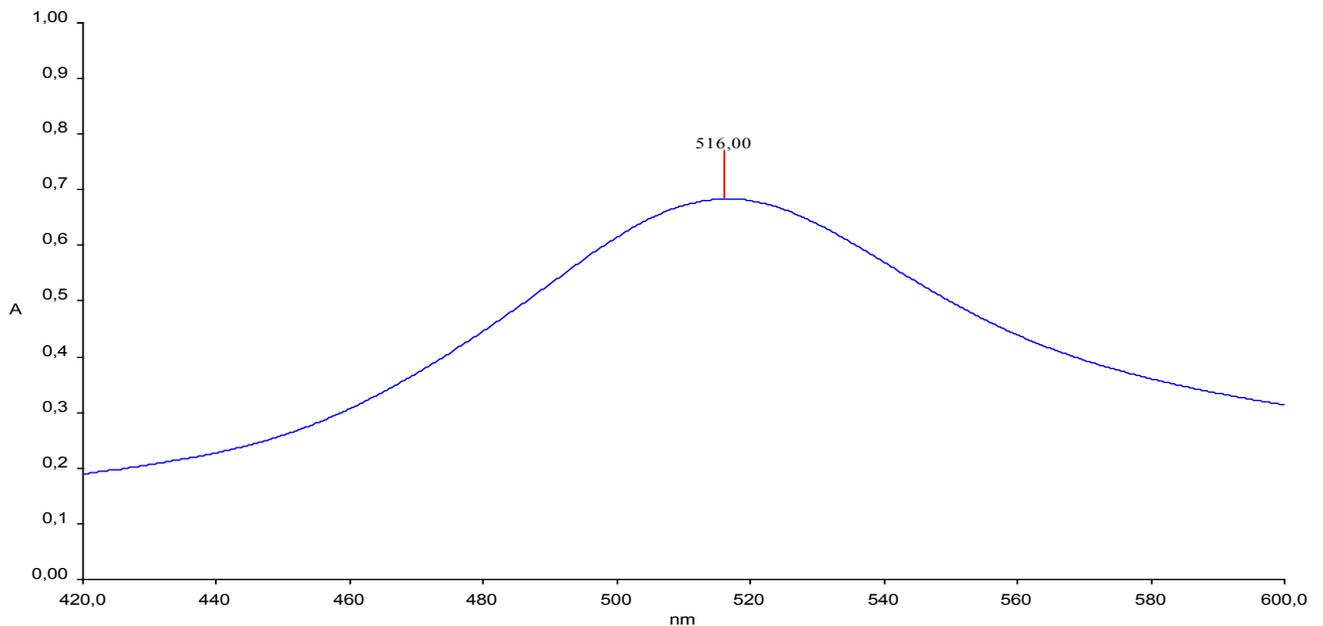


Figure 33 : L'absorbance du DPPH

Tableau 24 : les différents résultats de l'activité antioxydante

blanc	0.0031	0.00225	0.00112	0.00148	0.00443	0.0436	0	
DO	0.0257	0.0318	0.0556	0.0606	0.0619	0.0626	0.0669	
x[C] mg	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0	$\Sigma = 1.55$
DO	0.02885	0.03404	0.05677	0.06209	0.06641	0.06696	0.06695	
Y [AA%]	6.155	5.252	1.688	0.946	0.742	0.654	0	$\Sigma = 15.437$
X ²	0.25	0.16	0.09	0.04	0.01	0.0025	0	=0.5525
Y ²	37.884	27.583	28.493	0.895	0.551	0.427	0	=95.84
x.y	3.0775	2.1008	0.5064	0.1892	0.0742	0.0327	0	=5.9808

$$\bar{X} = \frac{\Sigma x_i}{n} = 0.221 \text{ mg}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} = 2.205\%$$

$$a = \frac{\sum x_i y_i - \bar{X} \cdot \bar{y}}{\frac{\sum x_i^2}{n} - \bar{X}^2} = \frac{5.9808 - 0.221 \times 2.205}{\frac{0.5525}{7} - (0.221)^2} = 182.58$$

$$b = \bar{y} - a \bar{X} = 2.205 - 182.58 \times 0.221 = -38.145$$

$$\bar{y} = 182.58x - 38.145$$

$$50\% = 182.58x - 38.145$$

$$IC_{50} = 0.236 \text{ mg/mL}$$

$$R = \frac{\sum (x_i y_i) - n \bar{X} \cdot \bar{y}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - n \bar{X}^2)(\sum y_i^2 - n \bar{y}^2)}} = 0.93$$

$$R^2 = 0.87$$

ANNEXE 4 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES

1- Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes-méthode par comptage des colonies (ISO 4832, 2006)

1.1. Milieu sélectif solide : gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL)

Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux	7g
Extrait de levure	3g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ,H ₂ O)	10g
Chlorure de sodium	5 g
Sels biliaires	1,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar-agar ^a	12 g à 18 g
Eau	1000 mL
selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

Préparation

On procède comme suit pour conserver au milieu son pouvoir sélectif et sa spécificité :

- Mélanger soigneusement le milieu complet déshydraté dans l'eau et laisser reposer plusieurs minutes.
- Ajuster le pH de sorte qu'après ébullition, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25°C .
- Chauffer jusqu'à ébullition en agitant de temps en temps.
- Laisser bouillir 2 min
- Mettre le milieu à refroidir immédiatement au bain d'eau de 44°C à 47°C .
- Eviter la surchauffe du milieu, un chauffage trop prolongé ou des chauffages répétés
- Ne pas stériliser à l'autoclave et contrôler la stérilité du milieu au moment de l'emploi
- Utiliser le milieu dans les 4 h qui suivent sa préparation

1.2. Milieu de confirmation : bouillon lactosé bilié au vert brillant

Composition

Digestat enzymatique de caséine	10 g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ,H ₂ O)	10 g
Bile de bœuf déshydratée	20 g
Vert brillant	0,0133 g
Eau	1000 mL

Préparation

- Dissoudre le milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant doucement si nécessaire dans un bain d'eau.
 - Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit $7,2 \pm 0,2$ à 25°C.
 - Répartir les milieux par quantités de 10 mL dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham.
 - Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.
- Les cloches de Durhm ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

2- RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES GERMES AEROBIES MESOPHILES TOTAUX GAMT (NF V 08-051, 2003)

GELOSE POUR DENONBREMENT(PCA) :

Composition :

Digestat enzymatique de caséine	5,0gr
Extrait de levure	2,5gr
Glucose anhydre	1,0gr
Agar	9 à 18gr
Eau	1000mL

Préparation :

- Préparation à partir de milieu commercial complet déshydraté ; suivre les instructions du fabricant.
- répartir le milieu dans des flacons.
- stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 10 min

-le refroidir entre 44°C et 47°C avant l'emploi dans un bain d'eau

3- RECHERCHE DES STAPHYLOCOCCUS AUREUS : NF V 08-052

BAIRD PARKER :

Préparation du milieu :

Au moment de l'emploi faire fondre un flacon contenant 225 mL de gélose Baird Parker, le refroidir ensuite dans un bain d'eau à 45°C, puis ajouter 15 mL d'une solution de téllurite de potassium, mélanger soigneusement et aseptiquement, puis répartir le milieu en boîtes de pétri à raison de 15 à 18 mL par boîte .

Laisser solidifier les boîtes sur paille, puis les sécher en les plaçant retournées couvercle en bas, dans une étuve de séchage réglée entre 45 à 55°C (les boîtes non séchées peuvent être conservées entre 0°C et 5°C au).

4- Le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices selon la norme (XP V 08-601, 2005)

1. Milieu de culture : gélose tryptose-sulfite à la cyclosérine (TSC) exempte de jaune d'œuf

Composition

Peptone pepsique de viande ¹⁾	15,0 g
Peptone de soja	5,0 g
Extrait autolytique de levure	5,0 g
Bisulfite disodique (Na ₂ S ₂ O ₅) anhydre	1,0 g
Citrate de fer (III) ammoniacal ²⁾	1,0 g
Agar-agar bactériologique	9 g à 18 g ³⁾
Eau	1000 mL
Ou toute autre peptone de qualité équivalente. Ce réactif doit contenir au moins 15 % (m/m) de fer. Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

Préparation

- Dissoudre les composants déshydratés dans l'eau, en portant à ébullition.
- Ajuster le pH si nécessaire, mesuré à l'aide du pH-mètre de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,6 ± 0,2 à 25°C.
- Répartir la quantité appropriée de milieu en flacons, et stériliser à 121°C pendant 15 min.

- Conserver au réfrigérateur à $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Si la préparation n'est pas extemporanée, les flacons de milieux de culture doivent être fondus et désaérés avant utilisation. la désaération nécessite au moins 15 min dans le bain de surfusion, après la fusion de la gélose, pour être effective.

Solution de D-cyclosérine

Composition

D-cyclosérine (n'utiliser que de la poudre blanche cristalline)	4,0 g
Eau	100 mL

Préparation

- Dissoudre la D-cyclosérine dans l'eau et stériliser la solution par filtration.
- Conserver au réfrigérateur à $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6- DENOMBREMENT DES LEVURES ET MOISSURES TECHNIQUE PAR COMPTAGE DES COLONIES A 25° C (C.A.C.Q.E. N° 01-97-61)

Gélose OGA

Milieu de culture déshydraté utilisé pour la recherche des moisissures et levures

Composition type g/litre

Extrait de levure.....	5
D(+) glucose.....	10, 0
Agar-agar.....	18
Gentamycine.....	0,015
Eau.....	1000 mL

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à l'ébullition. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6.

Répartir le milieu gélosé dans des flacons appropriés. Stériliser à 121°C pendant 15 min.

7- Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (ISO 6579, 2002)

Eau peptonée tamponnée

Composition

Digestat enzymatique de casséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Disodium hydrogénophosphate dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,5 g
Eau	1000 mL

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu, par quantités nécessaires pour l'analyse, dans des flacons de capacité adéquate.

Stériliser à l'autoclave réglé à 121°C pendant 15 min.

Bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn)

Composition

Extrait de viande	4,3 g
Digestat enzymatique de caséine	8,6 g
Chlorure de sodium (NaCl)	2,6 g
Carbonate de calcium (CaCO_3)	38,7 g
Thioisulfate de sodium pentahydraté ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O}$)	47,8 g
Sels biliaires à usage bactériologique	4,78 g
Vert brillant	9,6 mg
Eau	1 000 mL

Préparation

Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition durant 5 min.

Si nécessaire, ajuster le pH à $8,0 \pm 0,2$ à 25°C .

Bien homogénéiser le milieu.

Le milieu de base se conserve 4 semaines à $3^\circ\text{C} \pm 0,2$.

Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD)

Composition

Extrait de levure en poudre	3,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
Hydrochlorure de L-lysine	5,0 g
Thiosulfate de sodium	6,8 g
Citrate d'ammonium-fer (III)	0,8 g
Rouge de phénol	0,08 g
Désoxycholate de sodium	1,0 g
Gélose	9 g à 18 g (selon le pouvoir gélifiant de la gélose)
Eau	1 000 mL

Préparation

Dissoudre les composants de base déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Éviter de surchauffer.

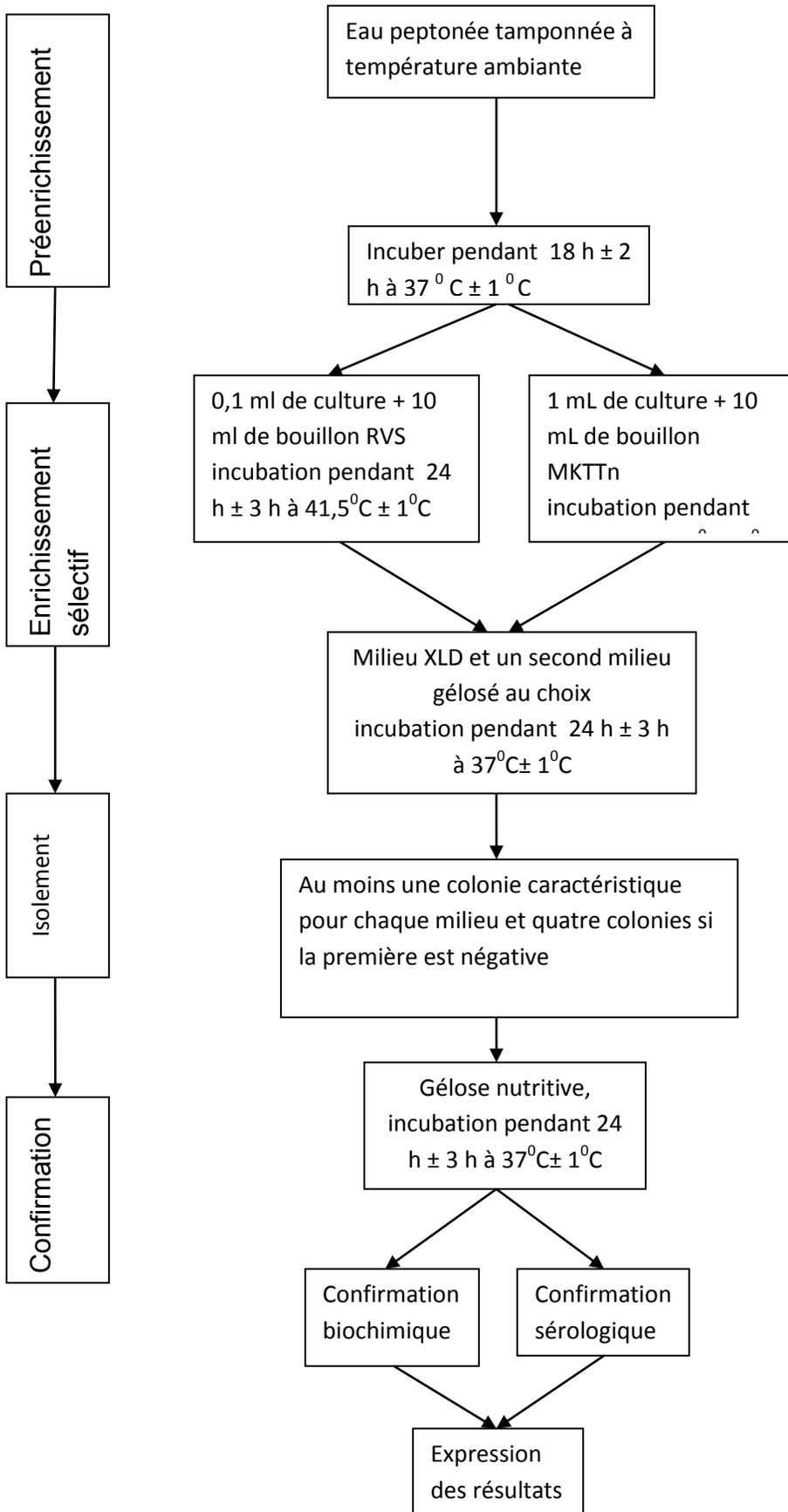
Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu de base dans des tubes ou flacons de capacité appropriée.

Chauffer en agitant fréquemment jusqu'à ébullition du milieu et dissolution de la gélose. ne pas surchauffer.

Annexe A

Schéma du mode opératoire dénombrement de *Salmonella*



Lexiques

- **Acides gras essentiels** ou **indispensables**, (ou anciennement [vitamine F](#)), constituent une famille d'[acides gras](#) contenant plusieurs [liaisons doubles](#), que ne peuvent fabriquer les mammifères, qui doivent les trouver dans leur alimentation.
- **Antioxydant** est une molécule qui diminue ou empêche l'[oxydation](#) d'autres substances chimiques.
- **Asthénie** est la faiblesse générale se caractérisant par une diminution du pouvoir de fonctionnement de l'organisme. Cet état survient après une activité physique, un travail intense ou encore un effort, et d'autre part ne disparaît pas avec le repos.
- **Catalyser** est le phénomène de modification notable de la vitesse d'une réaction chimique par l'action d'une substance appelée catalyseur. La catalyse peut aussi avoir un effet sur la sélectivité d'une réaction chimique dans le cas de réactions concurrentes en favorisant la production d'un produit plutôt qu'un autre. Le catalyseur est en général en quantité beaucoup plus faible que les réactifs. « Il n'est pas consommé et est restitué en fin de réaction ». Il n'apparaît donc pas dans le bilan de la réaction, et donc pas dans son équation. Ainsi, dans le cas fréquemment rencontré dans l'industrie où la réaction se déroule au contact d'un catalyseur solide, ce dernier serait utilisé indéfiniment s'il n'était pas empoisonné par des impuretés présentes parmi les réactifs. C'est également le cas des [pots catalytiques](#) des automobiles qui permettent aux [hydrocarbures](#) de l'essence imbrûlée de réagir avec les [oxydes d'azote](#) présents dans le gaz de combustion pendant le court temps de passage au sein du pot d'échappement.
- **Cécité** est une [déficience visuelle](#) totale. Le terme cécité est un emprunt au [latin classique](#) *caecitas* « perte de la vue »¹. La cécité est un [handicap](#) qui touche un grand nombre d'êtres humains dans le monde. Cette absence de la vue peut avoir de multiples causes.
- **Crises de goutte**, La goutte est une maladie rhumatologique qui touche en général les articulations, le plus souvent l'articulation de la base du grand orteil. Cette affection, souvent chronique, se caractérise par une inflammation intense de l'articulation qui engendre souvent une très forte douleur, on parle de crise de goutte ou au Canada d'attaque de goutte. La goutte est une forme d'[arthrite](#).

- **Dibutylhydroxytoluène (BHT) ; butylhydroxyanisole (BHA)** : Le BHT (2,6-ditertiobutyl 4-méthyl phénol) est un solide blanc, soluble dans les graisses et insoluble dans l'eau. C'est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position, le 2-tertiobutyl 4-hydroxyanisole et le 3-tertiobutyl 4-hydroxyanisole, dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT.
- **Dismutation** est une réaction d'[oxydo-réduction](#) dans laquelle une [espèce chimique](#) joue à la fois le rôle d'[oxydant](#) et de [réducteur](#). Ce qui signifie qu'un [atome](#) ou [groupe fonctionnel](#), initialement présent à un seul [degré d'oxydation](#) se trouvera, après la réaction, sous forme de deux espèces de degrés d'oxydation différents.
- **Disque de Secchi** ; un **disque Secchi** est un dispositif permettant de mesurer la transparence d'une étendue d'[eau](#). Il consiste en un disque d'une vingtaine de centimètres, noir et blanc (chaque quart alternativement). Le disque est fixé au bout d'une corde et lesté, qu'on laisse descendre jusqu'à disparition, puis on note la longueur de la corde. On remonte ensuite la corde jusqu'à réapparition puis on
- **Glycogénogenèse** est la voie [métabolique](#) qui permet, dans le [foie](#) et le [muscle](#), la [synthèse](#) de [glycogène](#) à partir du [glucose](#). Son but principal est la mise en réserve du [glucose](#) issu d'une alimentation riche en glucides.
- **Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)** est une [incrétine](#), c'est-à-dire une [hormone intestinale](#), sécrétée par les cellules L de l'[iléon](#) en réponse à un repas¹. Le GLP-1 fait partie des hormones de satiété.
- **Glycation** La [réaction de Maillard](#), connue dans le monde [médical](#) sous le nom de « glycation non enzymatique des protéines », a d'abord été étudiée dans le cadre du [diabète sucré](#) grâce à l'[hémoglobine glyquée](#). La glycation est une réaction naturelle qui a lieu notamment lors d'une [hyperglycémie](#)
- **Hétérocyste** du grec heteros, différent, et cystis, sac]: [cellule](#) fixatrice d'[azote](#), transparente, à paroi épaisse, qui se forme dans les filaments de certaines [cyanobactéries](#). La paroi est épaisse pour limiter la diffusion de l'oxygène, car la nitrogénase (complexe fixant l'azote) y est sensible
- **Homéostasie** (du [grec](#) ὁμοιος, hómoios, « similaire », et ἵστημι, hístēmi, « immobile ») -est la capacité que peut avoir un [système](#) quelconque ([ouvert](#) ou [fermé](#)) à conserver son [équilibre](#) de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. Selon [Walter Bradford Cannon](#), « l'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie ».
- **Hyponatrémie** est un [trouble hydroélectrolytique](#) défini par une concentration en [sodium](#) dans le [plasma sanguin](#) ([natrémie](#)) inférieure à 136 [mmol/l](#). Il en

découle une hyperhydratation intracellulaire par [effet osmotique](#) (l'eau libre passe du secteur extracellulaire au secteur intracellulaire afin d'égaliser les [pressions osmotiques](#) de part et d'autre de la [membrane cellulaire](#))

- **Infarctus du myocarde** (IDM étant une abréviation courante) est une [nécrose](#) (mort de cellules) d'une partie du [muscle cardiaque](#) secondaire à un défaut d'oxygénation ([ischémie](#)). En langage courant, on l'appelle le plus souvent une « crise cardiaque » ou simplement « [infarctus](#) ». Il se produit quand une ou plusieurs [artères coronaires](#) se bouchent, les cellules du [myocarde](#) (le muscle constituant le cœur) irriguées par cette (ou ces) [artère\(s\)](#) ne sont alors plus oxygénées, ce qui provoque leur souffrance (douleur ressentie) et peut aboutir à leur [mort](#) (cicatrice de l'infarctus qui persistera habituellement). La zone « infarctée » ne se contractera plus correctement.
- **In vitro** (en [latin](#) : « dans le verre ») signifie un [test en tube](#), ou, plus généralement, en dehors de l'[organisme](#) vivant ou de la [cellule](#)
- **Maladie métabolique** est un trouble médical qui affecte les [métabolismes](#) dans la [cellule](#), en particulier la production d'[énergie](#). La plupart des *maladies métaboliques* sont [génétiques](#), bien qu'un petit nombre d'entre elles soient "acquises" du fait du [régime alimentaire](#), d'[agents toxiques](#) ou de [toxines](#), d'[infections](#), etc. Les maladies métaboliques génétiques sont également appelées [maladies métaboliques congénitales](#)
- **Malondialdéhyde** (MDA), ou aldéhyde malonique, est un [composé chimique](#) de [formule](#) $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. La structure de cette [espèce chimique](#) est cependant plus complexe que ce que sa formule pourrait laisser penser, car elle est en fait constituée de deux [mésomères](#) en résonance entre lesquels la forme [énolique](#) $\text{HOHC}=\text{CH}-\text{CHO}$ prédomine sur la forme di-[aldéhyde](#) $\text{OCH}-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ². La forme [cis](#) est favorisée dans les solvants organiques tandis que c'est la forme *trans* qui est favorisée en solution aqueuse. Le malondialdéhyde est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du [stress oxydant](#). Il est issu notamment de l'action des [dérivés réactifs de l'oxygène](#) sur les [acides gras polyinsaturés](#)³. Il réagit avec la [désoxyadénosine](#) et la [désoxyguanosine](#) pour former des [adduits d'ADN](#), notamment le [M₁G](#), qui est [mutagène](#)
- **Oxydation** fait partie d'une [réaction d'oxydo-réduction](#) qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des [radicaux libres](#) qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des [thiols](#) et des [phénols](#).

- **Peroxydation des lipides** (ou encore la *peroxydation lipidique* ou *lipoperoxydation*) est l'oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes. La peroxydation est responsable du rancissement des aliments. Elle est aussi - *in vivo*, c'est-à-dire au sein des cellules et des organismes - responsable de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation. Les antioxydants pourraient réduire ces effets délétères¹. Ceci arrive en présence de certains produits ou toxiques dits « oxydants » ou facteur de stress oxydant. Les antioxydants freinent ce phénomène.

- **Photolyse et photosynthèse**, La photolyse fait partie de la photosynthèse, qui se produit dans les granums (amas de thylakoïdes) des chloroplastes. Au cours de la photolyse, la lumière absorbée par la chlorophylle est transformée en énergie chimique qui est utilisée pour scinder l'eau en hydrogène et en oxygène. L'oxygène est largué comme sous-produit alors que l'hydrogène se lie à la coenzyme NADP pour former du NADPH

- **Pouvoir antioxydant** d'un aliment, c'est-à-dire sa capacité de résister à l'oxydation, s'exprime en unités ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity : cette valeur mesure la capacité de l'aliment à neutraliser le radical peroxyde)

- **Polydipsie** est un symptôme rencontré le plus souvent en endocrinologie et caractérisé par une soif excessive avec augmentation de l'absorption de liquide, causée par la polyurie dans le cas du diabète, qu'il soit de type insipide (par diminution de la sécrétion de la HAD) ou sucré (augmentation de l'osmolarité due à l'augmentation de la concentration en glucose), ou dans certains cas de diabète sucré, par un dérèglement du centre hypothalamique de la soif.

- **Polyurie** est un symptôme ou une maladie caractérisée par des urines abondantes, fréquemment rencontrée dans le cas du diabète insipide et du diabète sucré. On parle généralement de polyurie quand le débit urinaire est supérieur à 2 ou 3 litres par jour, alors que chez un individu sain, la diurèse est comprise entre 0,8 et 1,5 litre.

- **Polyphagie** est un symptôme ou une maladie caractérisé(e) par une faim excessive avec une absence de sensation de satiété, traduisant un excès dans le comportement alimentaire.

- **Radicaux libres**; Un radical est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. Il se note par un point. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps, une grande instabilité (elles ne respectent pas la règle de l'octet), ce qui signifie

qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques, et que leur durée de vie en solution est très courte. Si un radical possède un, deux ou trois électrons célibataires, on le nomme respectivement monoradical, biradical, triradical, etc. La stabilité de ces entités chimiques décroît lorsque le nombre d'électrons célibataires augmente. Un radical libre, possédant un électron célibataire, aura des dérèglements de son champ magnétique, un déséquilibre qui le rendra réactif. Afin de se stabiliser, il va récupérer des électrons sur d'autres molécules, notamment les [acides gras polyinsaturés](#) (AGPI), créant ainsi de nouveaux radicaux.

- **Stress oxydatif** est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux [espèces réactives oxygénées](#)¹ (ROS, *Reactive Oxygen Species* en anglais) et aux espèces réactives oxygénées et azotées (RONS, N pour *Nitrogen* en anglais) [oxydantes](#). Ces espèces sont, par définition, des [radicaux libres](#). Par assimilation, le [peroxyde d'hydrogène](#) (H_2O_2) est considéré comme une ROS car, en présence de [fer](#) (sous forme ionique), il se dismute en deux radicaux [hydroxyle](#) (OH^\cdot) (réaction de Haber-Weiss). Le stress oxydatif (ou stress oxydatif) est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux [espèces réactives oxygénées](#)¹ (ROS, *Reactive Oxygen Species* en anglais) et aux espèces réactives oxygénées et azotées (RONS, N pour *Nitrogen* en anglais) [oxydantes](#). Ces espèces sont, par définition, des [radicaux libres](#). Par assimilation, le [peroxyde d'hydrogène](#) (H_2O_2) est considéré comme une ROS car, en présence de [fer](#) (sous forme ionique), il se dismute en deux radicaux [hydroxyle](#) (OH^\cdot) (réaction de Haber-Weiss).
- **Superoxyde dismutase** (SOD), est une [métalloprotéine](#) avec une activité [enzymatique](#): la catalyse de la [dismutation](#) du [superoxyde](#) en [oxygène](#) et [peroxyde d'hydrogène](#). Pour cette raison, cette enzyme est une partie importante du système de défense contre les [radicaux libres](#). Elle est présente dans presque tous les organismes [aérobies](#). Une des rarissimes exceptions est *Lactobacillus plantarum* et les [Lactobacillus](#) apparentés, qui n'en possèdent pas et utilisent un mécanisme de défense différent.
- **Trichomes** (du [grec](#) τρίχωμα - trikhoma qui signifie « croissance de [poil](#) ») sont de fines excroissances ou appendices chez les [plantes](#) et certains [protistes](#). Leurs fonctions et leur structure diffèrent. On peut citer comme exemple les poils, les poils glandulaires et les écailles.

