

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2020

N°32

THÈSE D'EXERCICE pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par Sandrine Bonnet,  
née le 13 juillet 1995 à Neuilly-sur-Seine (92)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 10/09/2020

**A LA RECHERCHE DES POUVOIRS D'APHANIZOMENON  
*FLOS AQUAE* SUR LE CORPS HUMAIN**

JURY

Président :

**Madame Isabelle Dimier-Poisson**, Professeur des Universités et enseignant chercheur,  
Laboratoire immunologie parasitaire à la faculté de pharmacie Philippe Maupas – TOURS  
(37200)

Membres :

**Monsieur Juste Matthieu**, Maître de Conférences et enseignant chercheur, Laboratoire  
immunologie parasitaire à la faculté de pharmacie (Tours, 37200)

**Monsieur Besson Pierre**, Maître de Conférences et enseignant chercheur, Laboratoire de  
physiologie à la faculté de médecine (Tours, 37200)

**Madame Berteaux-Pilleux Valérie**, Pharmacien titulaire d'officine (Dreux, 28100)

**ANNEE : 2019 - 2020**

Directrice : **Pr Véronique MAUPOIL**

Directeur Adjoint : **M. Hervé MARCHAIS**

Assesseurs : **Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### ***17 PROFESSEURS***

<b>ALLOUCHI</b>	<b>Hassan</b>	CHIMIE PHYSIQUE
<b>ANTIER</b>	<b>Daniel</b>	PHARMACIE CLINIQUE
<b>BARIN</b>	<b>Francis</b>	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
<b>BRAND</b>	<b>Denys</b>	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
<b>CHEVALIER</b>	<b>Stéphane</b>	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
<b>CHOURPA</b>	<b>Igor</b>	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
<b>CLASTRE</b>	<b>Marc</b>	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
<b>DIMIER-POISSON</b>	<b>Isabelle</b>	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
<b>EMOND</b>	<b>Patrick</b>	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
<b>ENGUEHARD-GUEIFFIER</b>	<b>Cécile</b>	PHARMACOGNOSIE
<b>GIRAUDEAU</b>	<b>Bruno</b>	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
<b>LANOTTE</b>	<b>Philippe</b>	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
<b>MAHEO</b>	<b>Karine</b>	PHYSIOLOGIE
<b>MAUPOIL-DAVID</b>	<b>Veronique</b>	PHARMACOLOGIE
<b>POUPLARD</b>	<b>Claire</b>	HEMATOLOGIE
<b>THIBAUT</b>	<b>Gilles</b>	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
<b>VIAUD-MASSUARD</b>	<b>Marie-Claude</b>	CHIMIE ORGANIQUE

### ***2 PROFESSEURS EMERITES***

<b>AGAFONOV</b>	<b>Viatcheslav</b>	CHIMIE PHYSIQUE
<b>GUILLOTEAU</b>	<b>Denis</b>	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

### ***38 MAITRES DE CONFERENCES***

<b>ALLARD-VANNIER</b>	<b>Emilie</b>	PHARMACIE GALENIQUE
<b>ARLICOT</b>	<b>Nicolas</b>	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
<b>AUBREY</b>	<b>Nicolas</b>	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
<b>BAKRI</b>	<b>Françoise</b>	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
<b>BESSON</b>	<b>Pierre</b>	PHYSIOLOGIE
<b>BONNIER</b>	<b>Franck</b>	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
<b>BOUDESOCQUE-DELAYE</b>	<b>Leslie</b>	PHARMACOGNOSIE
<b>BOUVIN-PLEY</b>	<b>Mélanie</b>	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
<b>BRAIBANT</b>	<b>Martine</b>	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
<b>BREDELOUX</b>	<b>Pierre</b>	PHARMACOLOGIE
<b>DAVID</b>	<b>Stéphanie</b>	PHARMACIE GALENIQUE
<b>DEBIERRE-GROCKIEGO</b>	<b>Françoise</b>	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
UDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
RESAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

## 2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA
<b>1 PRAG</b>		
WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
<b>1 PAST</b>		
JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie

## 3 AHU

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

## SERMENT DE GALIEN



*En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date : le 10 septembre 2020  
L'étudiant **Bonnet Sandrine**

---

Le Doyen de la Faculté  
Professeur Véronique Maupoil

# REMERCIEMENTS

---

**A mon Alto**, mon cheval mais avant tout mon grand amour sur cette Terre. Tu m'as appris ce qu'était l'amour, tu m'as appris à être forte et ne jamais abandonner quelles que soient les difficultés rencontrées.  
A toi pour toujours.

**A ma famille**, qui m'a toujours encouragée et soutenue pendant toutes mes études de pharmacie. Une famille soudée sur qui j'ai pu compter à chaque période de ma vie. Merci à mes deux parents pharmaciens, qui m'ont fait découvrir et aimer ce métier.

**A mon Phox**, le cheval de ma sœur, qui lui aussi fait partie de ma famille et dont je suis fière de pouvoir aider grâce aux connaissances que j'ai acquises en pharmacie.

**A Dylan**, un ami en or sur qui j'ai pu compter à tout moment aussi bien dans ma vie professionnelle que dans ma vie privée. Un pharmacien d'une extrême générosité qui s'est intéressé à ma thèse, qui m'a aidé à la construire et qui m'a appris ce qu'était une analyse critique.  
Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

**A Sophie Marchais**, qui m'a fait découvrir l'Aphanizomenon flos aquae : une cyanobactérie méconnue et au nom imprononçable que j'ai moi-même testé en toute confiance sur mes chevaux Alto et Phox.

**A madame Isabelle Dimier-Poisson et à mon jury de thèse, Mr Juste Matthieu et Mr Besson Pierre**, merci à vous de vous être intéressés à mon travail, de m'avoir écoutée et soutenue dans ce projet.

**A madame Valérie Berteaux-Pilleux**, mon maître de stage de 6<sup>ème</sup> année, merci à vous et à votre équipe m'avoir accueillie chaleureusement dans votre officine et de m'avoir appris ce merveilleux métier.

**A l'équipe de Jacques Prunier**, merci de m'avoir communiquée des documents concernant l'Aphanizomenon flos aquae et de m'avoir permis de les utiliser dans ma thèse. J'espère de tout cœur que vos recherches sur cette incroyable cyanobactérie se poursuivront et que vous serez récompensés pour votre travail.

**A tous,**  
**je vous promets de toujours exercer mon métier avec sérieux, bienveillance et passion.**

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
TABLE DES FIGURES .....	11
TABLE DES TABLEAUX .....	14
I. INTRODUCTION .....	15
II. HISTOIRE DE DEUX CYANOBACTERIES.....	16
A. Histoire de la découverte de la Spiruline .....	16
B. Histoire de la découverte d' <i>Aphanizomenon flos aquae</i> .....	16
III. LA CYANOBACTERIE <i>APHANIZOMENON FLOS AQUAE</i> .....	17
A. Apparition des cyanobactéries.....	17
B. Définition d'une cyanobactérie.....	17
C. Photosynthèse .....	18
1) Définition .....	18
2) Pigments photosynthétiques .....	18
D. Taxonomie d'AFA.....	19
E. Source nutritive .....	19
F. Vésicules gazeuses .....	20
IV. LIEU DE CROISSANCE D' <i>APHANIZOMENON FLOS AQUAE</i> .....	21
A. Principal biotope d'AFA : le lac Klamath (Etats-Unis).....	21
1) Paramètres influençant la croissance d'AFA .....	22
2) Récolte d'AFA.....	23
B. Autres biotopes.....	23
C. Essai de culture en France .....	23
V. TOXICITE D' <i>APHANIZOMENON FLOS AQUAE</i> .....	24
A. Enquête de la toxicité d'AFA originaire du Lac Klamath.....	24
1) 20 <sup>ième</sup> siècle : Hypothèse d'une potentielle toxicité .....	24
2) 21 <sup>ième</sup> siècle : AFA exempte de toxicité dans le Lac Klamath .....	25
3) Autres espèces présentes dans le Lac Klamath .....	25
4) Contrôle du lac Klamath.....	26
B. Toxicité liée aux différentes variétés d'AFA .....	26
C. Conclusion .....	26
VI. ANALAYSE NUTRITIONNELLE D' <i>APHANIZOMENON FLOS AQUAE</i> .....	27
A. Les acides aminés .....	28
1) Acides aminés essentiels.....	28

2) Acides aminés semi-essentiels .....	29
3) Acides aminés non essentiels.....	30
4) Tableau récapitulatif de la teneur en acides aminés.....	31
B. Les lipides.....	32
1) Les acides gras d'AFA .....	32
2) Effets des $\omega$ -3 et $\omega$ -6.....	33
3) Tableau des concentrations en acides gras d'AFA .....	34
4) Comparaison des teneurs en acide alpha-linolénique et linoléique d'AFA avec celles de la spiruline .....	34
C. Les vitamines .....	35
1) Rôles des vitamines liposolubles (non exhaustifs) .....	35
2) Rôles des vitamines hydrosolubles (non exhaustifs).....	36
3) Tableau représentant la teneur en vitamine dans AFA et la spiruline .....	37
D. Les sels minéraux .....	39
1) Les Macro-éléments.....	39
2) Les oligoéléments .....	40
E. Les pigments photosynthétiques .....	42
1) La Chlorophylle .....	42
2) La phycocyanine : une protéine pigmentaire.....	42
F. Autres composés .....	43
1) Glucides complexes.....	43
2) Enzymes .....	43
3) Flavonoïdes .....	43
G. AFA, une solution pour demain .....	43
<b>VII. RAPPELS SUR LES CELLULES SOUCHES .....</b>	<b>44</b>
A. Généralités sur les cellules souches .....	44
1) Définition d'une cellule souche.....	44
2) Types de cellules souches .....	44
a. Cellules souches totipotentes et pluripotentes.....	45
b. Cellules souches adultes (CSA) : multipotente et unipotente .....	45
B. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse .....	46
1) Particularité des CSH.....	46
2) Les chimiokines .....	47
3) Conclusion.....	47
C. Rôle d'AFA dans la stimulation et de la mobilisation des CSH .....	47
<b>VIII. PROPRIETES THERAPEUTIQUES D'APHANIZOMENON FLOS AQUAE.....</b>	<b>48</b>
A. Maintien de l'équilibre acido-basique .....	48
B. Effet antibactérien .....	49
C. Effet sur le système immunitaire .....	52

D.	Effet anti-inflammatoire .....	58
1)	La phycocyanine.....	58
	.....	60
2)	Oméga 3.....	66
3)	Conclusion.....	67
E.	Effet anti-oxydant .....	67
1)	La phycocyanine.....	68
a.	Action sur les globules rouges.....	68
b.	Action sur le rein .....	73
2)	Potentialisation des effets anti-oxydants.....	76
3)	Développement de biofilms bucco-adhésifs anti-oxydants .....	78
F.	Effet sur le cancer .....	79
1)	Pouvoir des antioxydants : caroténoïdes et $\omega$ -3 .....	79
a.	Caroténoïdes.....	79
b.	Oméga 3.....	80
c.	Conclusion.....	80
2)	Pouvoir de la substance polymérique extracellulaire .....	80
3)	Cytotoxicité des extraits d'algues sur les cellules normales et malignes.....	83
4)	La phycocyanine.....	89
5)	Etude du complément alimentaire « Alpha sun » .....	92
6)	Conclusion.....	92
G.	Effet sur le système cardiovasculaire .....	93
H.	Effet sur le poids des organes et la digestion.....	99
I.	Effet sur les taux de vitamines B <sub>12</sub> , d'homocystéine et d'acide folique dans le sang .....	104
J.	Effet sur la mobilisation des CSH .....	107
K.	Effet sur le diabète.....	113
1)	Etude chez l'animal : impact sur le diabète de type 1.....	113
2)	Etude chez l'Homme : impact sur le diabète de type 2.....	119
L.	Effet sur la régénération musculaire.....	121
1)	Muscle tibial.....	121
2)	Muscle cardiaque.....	124
M.	Effet sur le cerveau .....	125
1)	Inhibition sélective de la monoamine oxydase B .....	125
a.	Application dans la dépression .....	126
b.	Application dans les troubles déficitaires de l'attention .....	127
2)	Propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-fibrillogénèse sur le cerveau .....	130
a.	Pouvoir antioxydant : ERO provoquées par le TBH, un agent oxydant .....	131
b.	Pouvoir antioxydant : ERO provoquées par le peptide A $\beta$ , un agent pro-inflammatoire.....	132



c.	Conclusion pouvoir antioxydant .....	132
d.	Neuroinflammation.....	133
e.	Anti- fibrillogénèse.....	134
f.	Conclusion de l'étude.....	134
3)	Neurotoxicité des anesthésiques locaux.....	135
IX.	CONCLUSION .....	137
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	138
	ANNEXE 1 : COMPOSITION DES COMPLEMENTS ALIMENTAIRES .....	149

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>IP</b> : Iodure de Propidium
<b>AFA</b> : <i>Aphanizomenon Flos Aquae</i>	<b>LDH</b> : Lactate Déshydrogénase
<b>AFSSA</b> : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	<b>LDL</b> : Low Density Lipoprotein
<b>AG</b> : Acide Gras	<b>LMA</b> : Leucémie Myéloïde Aigüe
<b>AGPI</b> : Acides Gras polyInsaturés	<b>LLC</b> : Leucémie Lymphoïde Chronique
<b>AH</b> : Acide Hyaluronique	<b>MDA</b> : MalonDiAldéhyde
<b>AINS</b> : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	<b>MPO</b> : MyéloPerOxydase
<b>AJR</b> : Apport Journalier Recommandé	<b>NAPQI</b> : N-Acétyle-P-Benzoquinone Imine
<b>AS</b> : Apport Satisfaisant	<b>NK</b> : Natural Killer
<b>BHE</b> : Barrière HématoEncéphalique	<b>OGM</b> : Organisme génétiquement modifié
<b>BNM</b> : Besoin Nutritionnel Moyen	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline
<b>CAT</b> : Catalase	<b>PEA</b> : PhénylEthylAmine
<b>COX</b> : CycloOXygénase	<b>PGE<sub>2</sub></b> : ProstaGlandine E2
<b>CSA</b> : Cellule Souche Adulte	<b>PMN</b> : Cellules polymorphonucléaires
<b>CSH</b> : Cellule Souche Hématopoïétique	<b>PRAL</b> : Potential Renal Acid Load
<b>DHA</b> : Acide DocosaHexaénoïque	<b>PUFA</b> : PolyUnsaturated Fatty Acid (Acides gras polyinsaturés)
<b>DL50</b> : dose létale causant le décès de 50% des individus	<b>Rh123</b> : Rhodamine 123
<b>EFSA</b> : European Food Safety Authority (Autorité européenne de Sécurité des Aliments)	<b>RNP</b> : Référence Nutritionnelle pour la Population
<b>EPA</b> : Acide EicosaPentaénoïque	<b>SFA</b> : Saturated Fatty Acids (Acides gras saturés)
<b>EPS</b> : Extracellular polymeric substance	<b>SOD</b> : SuperOxyde Dismutase
<b>ER</b> : Equivalent en Rétinol	<b>SPE</b> : substance polymère extracellulaire
<b>ERO</b> : Espèce Réactive de l'Oxygène	<b>TDH</b> : Trouble Déficitaire de l'Attention avec ou sans Hyperactivité
<b>FAD</b> : Flavine Adénine Dinucléotide	<b>TBARS</b> : Substances Réactives à l'Acide ThioBarbiturique
<b>FMN</b> : Flavine MonoNucléotide	<b>TxA<sub>2</sub></b> : Thromboxane A2
<b>GPX</b> : Glutathion Peroxidase	<b>ω-3</b> : Oméga 3
<b>GSH</b> : Glutathion réduit	<b>ω-6</b> : Oméga 6
<b>GST</b> : Glutathion-S-Transférase	
<b>HbA1c</b> : Hémoglobine glyquée	
<b>HDL</b> : High Density Lipoprotein	
<b>CSH</b> : Cellule Souche Hématopoïétique	
<b>IDM</b> : Infarctus du myocarde	
<b>IMAO-B</b> : Inhibiteur de la MonoAmine Oxydase de type B	
<b>IMC</b> : Indice de Masse Corporel	
<b>iNOS</b> : oxyde nitrique synthétase induite	
<b>IOM</b> : Institute of Medicine	

# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique (7) .....	17
Figure 2 : Situation géographique du lac Klamath.....	21
Figure 3 : Diagramme représentant en % la composition d'AFA (pour 100 g) .....	27
Figure 4 : Graphique représentant la composition nutritionnelle en acides aminés d'AFA et de la spiruline (8).....	31
Figure 5 : Schéma représentant les principaux acides gras d'AFA (pour 100 g).....	32
Figure 6 : Effets principaux de la famille des $\omega$ -3 .....	33
Figure 7 : Effets principaux de la famille des $\omega$ -6 .....	33
Figure 8 : Graphique représentant le % en acide alpha-linolénique et linoléique dans l'AFA et dans la Spiruline ...	34
Figure 9 : Graphique comparant la teneur en % de la concentration en chlorophylle dans AFA et la Spiruline .....	42
Figure 10 : Propriétés des cellules souches .....	44
Figure 11 : Schéma représentant la mobilisation des CSH en fonction du gradient de chimiokine .....	47
Figure 12 : Charge acide rénale potentielle d'un aliment (116) .....	48
Figure 13 : Histogramme représentant les changements induits par la prise d'AFA sur le nombre de leucocytes sanguins .....	53
Figure 14 : Histogramme représentant les changements induits par la prise d'AFA sur le nombre de la sous-populations de lymphocytes.....	53
Figure 15 : Histogramme représentant les lymphocytes TCD4/TCD8 naïfs (en blanc) et les lymphocytes TCD4/TCD8 mémoires (en noirs).....	54
Figure 16 : Histogramme représentant les variations en % des cellules tueuses naturelles (NK) dans le sang chez des sujets naïfs d'AFA ou préalablement exposés au long terme.....	55
Figure 17 : Expression des récepteurs aux chémokines CXCR3 et CXCR4 pour les cellules NK et les cellules NKT ....	56
Figure 18 : Histogramme représentant la latence du retrait de la patte du rat en seconde en fonction du temps Pré-traitement .....	60
Figure 19 : Histogramme représentant la latence du retrait de la patte du rat en seconde en fonction du temps Post-traitement.....	60
Figure 20 : Histogramme représentant l'expression de la COX-2 en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane .....	61
Figure 21 : Histogramme représentant la production de PGE <sub>2</sub> (pg/mL) en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane .....	62
Figure 22 : Histogramme représentant l'expression d'iNOS en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane .....	63
Figure 23 : Histogramme représentant la production de nitrate en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane .....	63
Figure 24 : Histogramme représentant le taux de TNF- $\alpha$ en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine administrée 30 minutes avant le carraghénane, 4 heures après l'administration du carraghénane .....	64
Figure 25 : Histogramme représentant l'activité de la MPO en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine .....	64
Figure 26 : Graphique représentant les effets d'AFA, in vitro, sur l'hémolyse des globules rouges et sur la concentration en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et en glutathion (GSH) .....	68
Figure 27 : Effet dose-dépendante de l'extrait d'AFA, in vitro, contre les dégâts oxydatifs des globules rouges après 4 h d'incubation avec le 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 50 nM .....	69
Figure 28 : Métabolisme du Paracétamol.....	71
Figure 29 : Graphique représentant les effets de différentes doses d'EEAFA sur le taux de nitrites sériques chez des rats traités au cisplatine.....	74
Figure 30 : Image représentant les effets des extraits de myrtilles (BB), de thé vert (GT), de vitamine D3 (D3), de carnosine (Ca) et du complément alimentaire NT 020 sur la libération de LDH.....	77

Figure 31 : Graphique représentant la libération de LDH par les cellules endommagées en fonction des doses de NT 020.....	78
Figure 32 : Mesure du pourcentage de viabilité des lignées cellulaires cancéreuses : cellules HL-60 (A) et cellules MV-4-11 (B), traitées avec les quatre extraits éthanoliques pendant 24 heures (coloration annexine/IP) .....	84
Figure 33 : Histogramme représentant la viabilité des échantillons de blastes leucémiques primaires de LMA traités avec les quatre extraits éthanoliques de 8 et 15 µL/mL pendant 24 heures.....	85
Figure 34 : Histogramme représentant la viabilité des échantillons de blastes leucémiques primaires de LLC traités avec les quatre extraits éthanoliques de 8 et 15 µL/mL pendant 24 heures .....	85
Figure 35 : Histogramme représentant la formation de peroxy-nitrite dans les cellules blastiques de patient atteint de LMA traités avec les quatre extraits éthanoliques à 15 µL/mL.....	86
Figure 36 : Histogramme représentant la viabilité des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et des cellules CD34 + traitées avec les quatre extraits éthanoliques, chez des patients sains .....	87
Figure 37 : Effets des quatre extraits éthanoliques sur les marqueurs CFU-GM et BFU-E à partir d'une moelle osseuse de patient sain.....	88
Figure 38 : Composition en acides gras des quatre régimes administrés aux rats .....	94
Figure 39 : Composition en acides gras de l'huile de soja, l'huile de coco et AFA .....	94
Figure 40 : Histogramme représentant le profil lipidique du plasma dans les différents groupes .....	95
Figure 41 : Histogramme représentant le profil lipidique de certains acides gras du plasma dans les différents groupes.....	96
Figure 42 : Histogramme représentant les concentrations sanguines de cholestérol et de triglycérides dans les 4 groupes.....	97
Figure 43: Effets d'AFA sur le poids des rats.....	100
Figure 44 : Effet d'AFA sur la consommation totale d'aliments et le ratio d'efficacité .....	100
Figure 45 : Effet d'AFA sur le poids des viscères (g/100 g de poids corporel) .....	101
Figure 46 : Effets d'AFA sur l'activité des enzymes pancréatiques et intestinales.....	101
Figure 47 : Effets d'AFA sur les niveaux de protéines dans les viscères.....	102
Figure 48 : Effets d'AFA sur les taux de protéines et de glucose dans le sang du rat .....	102
Figure 49 : Concentrations individuelles de vitamines B <sub>12</sub> aux temps T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> pour 14 sujets.....	105
Figure 50 : Concentrations individuelles en homocystéine aux temps T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> pour 15 sujets .....	105
Figure 51 : Nombre de leucocytes et de lymphocytes circulants en fonction du temps chez les deux groupes de patients .....	112
Figure 52 : Valeurs des glycémies moyennes sur 4 semaines dans les 4 groupes .....	114
Figure 53 : Valeur moyenne (+/- écart-type) des cellules immunopositives pour CD34 dans le sang par cytométrie en flux dans les 4 groupes.....	116
Figure 54 : Histogramme comparant les valeurs moyennes du nombre de cellules immunopositives CD34 <sup>+</sup> pancréatiques dans les 4 groupes.....	117
Figure 55 : Histogramme comparant les valeurs moyennes du pourcentage de surface de cellules immunopositives à l'insuline dans les 4 groupes .....	118
Figure 56 : Comparaison des évaluations biochimiques avant et après étude entre les deux groupes.....	120
Figure 57 : Comparaison du marqueur cellulaire, des paramètres immunologiques et du niveau d'antioxydant avant et après intervention entre les deux groupes .....	120
Figure 58 : Courbe représentant le poids (en g) des souris en fonction des jours post-transplantation .....	122
Figure 59 : Numération des globules blancs (WBC), les globules rouges (RBC), l'hémoglobine (HGB), l'hématocrite (HCT), les plaquettes (Platelet) à J <sub>14</sub> et J <sub>28</sub> après l'irradiation et la transplantation dans le groupe traité par SE et dans le groupe contrôle .....	122
Figure 60 : Graphique montrant la zone couverte par la fluorescence dans le tibia antérieur droit (noir) et tibia antérieur gauche non traité (gris), 5 semaines après injection de Cardiotoxine pour le groupe placebo et le groupe SE.....	123
Figure 61 : Evaluation des enfants à l'aide de test standardisés.....	129
Figure 62 : Histogramme représentant la viabilité des cellules LAN <sub>5</sub> traitées par l'extrait Klamine à des concentrations différentes .....	130

Figure 63 : Histogramme représentant la viabilité des cellules non traitées (CTR) ou des cellules traitées avec du TBH ou co-traitées avec du TBH et des extraits d'AFA à des concentrations croissantes pendant 3 heures .....	131
Figure 64 : Histogramme représentant les cellules LAN5 (CTR) non traitées, les cellules LAN5 traitées avec l'extrait seul, A $\beta$ seul et les cellules LAN5 traitées avec l'extrait et A $\beta$ pendant 24 heures .....	132
Figure 65 : Mesure du niveau d'expression d'IL-1 $\beta$ et IL-6 dans des cellules LAN <sub>5</sub> non traitées (CTR) ou des cellules traitées avec A $\beta$ , ou avec A $\beta$ et AFA, ou AFA seul, par test ELISA.....	133

# TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Comparaison de la teneur en acides aminés contenus dans 100 g d'AFA et dans 100 g de Spiruline (8)	31
Tableau 2 : Taux d'AG saturés et insaturés dans 100 g d'AFA	34
Tableau 3 : Comparaison de la teneur en vitamines dans 100 g d'AFA et 100 g de Spiruline	37
Tableau 4 : Comparaison de la composition d'AFA avec les références nutritionnelles validées par le Comité d'Experts Spécialisé (CES) « Nutrition Humaine » (6)	38
Tableau 5 : Comparaison de la teneur en macroéléments (mg) pour 1 g d'AFA et de Spiruline	40
Tableau 6 : Comparaison de la teneur en oligoéléments (mg) pour 100 g d'AFA et de Spiruline	41
Tableau 7 : Extraits aqueux de cyanobactéries permettant d'étudier l'effet de leurs métabolites hydrophiles sur la croissance de quatre bactéries	50
Tableau 8 : Extraits méthanoliques de cyanobactéries permettant d'étudier l'effet de leurs métabolites hydrophobes sur la croissance de quatre bactéries	50
Tableau 9 : Rôles des cellules mononuclées et d'AFA dans l'activation des cellules NK	56
Tableau 10 : Augmentation de l'activité des cellules NK en présence d'AFA et IL-2	57
Tableau 11 : Latence du retrait de la patte du rat en seconde (sec) en pré et post-traitement	61
Tableau 12 : Effets de l'EEAFA sur la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez le rat	74
Tableau 13 : Effet de l'EEAFA sur la peroxydation lipidique chez les rats traités par la cisplatine en fonction des concentrations en acide thiobarbiturique (TBARS) et en diènes conjugués (CD)	75
Tableau 14 : Changements morphologiques des cellules A431 traitées par AFA (TEM) *EPS-A signifiant substance polymérique extracellulaire provenant d'AFA	81
Tableau 15 : Effet d'un extrait d'AFA (3 mg/mL) sur l'intégrité et le potentiel membranaire mitochondriale des cellules A431	82

# **I. INTRODUCTION**

Nourrir des milliards d'habitants tout en préservant notre planète : un réel enjeu pour les années à venir. La population mondiale est en constant accroissement, d'une part du fait de l'augmentation des naissances et d'autre part du fait de l'allongement de l'espérance de vie. On estime qu'en 2050, on frôlera les 10 milliards d'habitants sur Terre. Par conséquent, face à cette évolution, les Hommes vont devoir réussir à concilier cette population grandissante tout en continuant la lutte contre le réchauffement climatique (1).

Pour répondre à cette demande alimentaire croissante, l'agriculture intensive a fait son apparition à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle aux États-Unis. Ce mode agricole a eu pour but d'augmenter la productivité et les rendements de l'agriculture grâce à la mécanisation mais aussi par l'usage de pesticides, d'engrais, d'OGM etc... Malheureusement, ce système représente à l'heure actuelle un véritable problème écologique, notamment à cause de la pollution des eaux et de l'air.

Un bon état de santé est acquis et préservé par un bon mode de vie, une bonne qualité de sommeil, de l'exercice physique mais aussi une bonne nutrition. D'ailleurs, Hippocrate disait : « *que ton aliment soit ton seul médicament* ». Malgré de nombreuses initiatives de prévention nutritionnelle auprès de la population française, apportées depuis 2001 par le *Programme National Nutrition Santé*, l'alimentation des français reste bien trop souvent éloignée des recommandations officielles. En effet, leur alimentation reste déséquilibrée : « trop grasse, trop sucrée, trop salée ». De plus, la plupart de nos aliments poussent sur des sols pauvres en éléments nutritifs et de ce fait, leurs qualités nutritionnelles diminuent. C'est pourquoi, l'Homme doit trouver rapidement une solution pour restaurer la qualité nutritive de son alimentation : soit en essayant de modifier son système de production agricole, soit en apportant une supplémentation adaptée à son régime alimentaire.

*Aphanizomenon flos aquae* est une cyanobactérie qui contient une richesse de 115 nutriments. Totalement digeste et hautement assimilable, elle offre une palette complète d'acides aminés, de lipides, de vitamines, de sels minéraux, de pigments photosynthétiques, d'enzymes, de flavonoïdes et de glucides complexes, tous reconnus scientifiquement comme présentant de multiples effets bénéfiques pour la santé. Ainsi, elle représente l'aliment le plus complet et le plus équilibré de la planète.

Les effets d'AFA sur le corps humain ont principalement été découverts à la suite de témoignages faits par ses consommateurs. D'ailleurs, l'utilisation de cette cyanobactérie ne semble pas avoir de limite dans le domaine médical. En effet, elle est consommée pour tout type de maux : fatigue, dépression, cancers, troubles liés à la ménopause, infections virales, maladies inflammatoires, maladies cardiaques etc... Mais son potentiel ne se limiterait pas seulement à cela : cette cyanobactérie aurait la propriété de stimuler et d'activer la migration des cellules souches présentes dans la moelle osseuse. Par conséquent, *Aphanizomenon flos aquae* aurait la possibilité de régénérer et guérir toute cellule, tout tissu ou encore tout organe présent dans le corps humain.

Ainsi, dénuée de toute toxicité, nous verrons comment *Aphanizomenon flos aquae*, prise comme complément alimentaire, pourra coloniser petit à petit nos assiettes pour nous offrir un meilleur capital de santé.

Notons également qu'AFA est une cyanobactérie, et que cet embranchement a permis l'apparition de l'oxygène sur notre planète. Ainsi grâce à la photosynthèse, sa culture pourrait contribuer à la lutte contre le réchauffement climatique.

## II. HISTOIRE DE DEUX CYANOBACTERIES

### A. Histoire de la découverte de la Spiruline

La spiruline est une cyanobactérie filamenteuse très proche d'*Aphanizomenon flos aquae*, notamment en termes de composition.

#### ❖ Mexique : l'empire Aztèque

En 1520, le roi d'Espagne Charles Quint, envoya le conquistador Cortès, s'emparer de l'empire aztèque au Mexique. Sur place, ce dernier découvrit que les indigènes collectaient, à une certaine époque de l'année et avec des filets à mailles très fines, une sorte de purée qui se formait à la surface de l'eau des lacs.

Ce n'était ni de l'herbe, ni de la terre mais bien de la spiruline qui, une fois séchée et broyée, portait le nom de « *Tecuitlatl* ». A l'époque, cette nourriture fut très populaire et largement consommée par la population aztèque du fait de sa haute valeur nutritive. Malheureusement, ne l'appréciant guère, les conquistadors préférèrent assécher les lacs pour faire pousser des céréales. L'habitude de récolter cette cyanobactérie disparut donc avec leur brillante civilisation.

#### ❖ Tchad : le peuple Kanembou

En 1964, lors de la traversée du Tchad, le botaniste Jean Léonard fut surpris de la bonne santé du peuple Kanembou. Il décida alors de s'intéresser à leur alimentation, dont les fameuses galettes de « Dihé » consommée au quotidien par cette population. Ces galettes étaient composées uniquement de spiruline.

Ainsi, c'est seulement à partir du 20<sup>ème</sup> siècle que la spiruline fut l'objet d'études scientifiques complètes permettant aujourd'hui de connaître sa composition ainsi que ses propriétés thérapeutiques (2).

### B. Histoire de la découverte d'*Aphanizomenon flos aquae*

En 1975, l'américain Daryl J. Kollman fut l'un des premiers à faire pousser la Spiruline et la Chlorelle dans des bassins artificiels ainsi qu'à étudier leurs propriétés thérapeutiques.

En 1976, Anthony Gragomini, avocat de la ville de Klamath falls, prit contact avec lui afin de lui faire savoir que le lac de sa ville était envahi par une cyanobactérie qui y pousse naturellement et abondamment. Suite à l'analyse de cette nouvelle espèce, D.J. Kollman fonda en 1982 une compagnie exclusivement réservée à sa récolte, son traitement et à sa distribution. Cette cyanobactérie n'était autre qu'*Aphanizomenon flos aquae*. Ainsi depuis les années 80, cette dernière est en vente libre aux Etats-Unis (3).

Pendant une dizaine d'années, AFA va attirer l'attention et la curiosité de nombreux scientifiques grâce à son incroyable composition unique en son genre. Néanmoins, il faudra attendre 1995, pour qu'un programme de recherche soit enfin lancé pour comprendre comment cette cyanobactérie agit au sein de notre organisme (4) (5).



Concernant son arrivée en France, c'est seulement le 20 septembre 2007 qu'elle fera son apparition auprès du grand public grâce au chercheur Jacques Prunier. Cela peut s'expliquer par le fait que, le 16 mai 2003, l'AFSSA avait émis un avis défavorable sur cette cyanobactérie. En effet, il fut conclu à l'époque qu'elle ne présentait pas toutes les garanties d'innocuité et ne présentait également qu'un faible intérêt nutritionnel (6).

### III. LA CYANOBACTERIE *APHANIZOMENON FLOS AQUAE*

#### A. Apparition des cyanobactéries

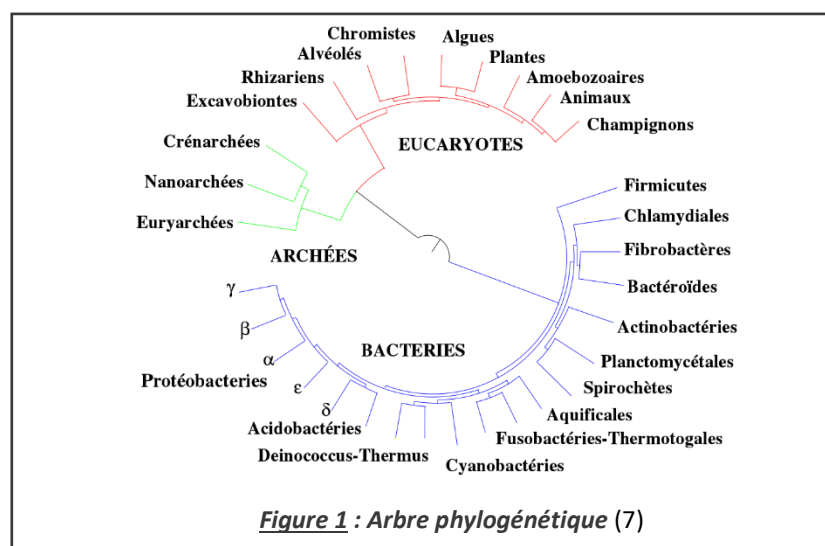
Apparues il y a environ 3,5 milliards d'années, les cyanobactéries sont les pionnières de la « grande oxygénation » de notre planète. En effet, ces organismes furent les premiers capables, à partir du gaz carbonique, de l'eau et de l'énergie lumineuse, de rejeter du dioxygène. Ce processus est plus communément appelé la photosynthèse. Cette libération d'oxygène fut à l'origine de la formation de la couche protectrice d'ozone autour de la Terre et a aussi participé à la naissance de multiples espèces grâce à l'apparition de la respiration. De plus, par leur contribution à la formation des stromatolithes, qui sont des constructions sédimentaires carbonatées, les cyanobactéries seraient également à l'origine de la majorité des dépôts calcaires sur la Terre.

Comptés parmi les plus anciennes formes de vie et omniprésents, ces organismes ont réussi, au fil du temps, à survivre et à s'adapter à toute une série de changements géochimiques marquant l'évolution de la biosphère de notre planète. En effet, possédant une excellente capacité d'adaptation, elles poussent aussi bien en milieu aqueux (eaux douces, saumâtres, marines, sources chaudes) qu'en milieu terrestre (déserts chauds, surfaces polaires).

Les cyanobactéries sont des organismes qui interagissent avec l'ensemble des formes de vie sur Terre. Comme les végétaux, elles réalisent la photosynthèse. Comme les animaux, leurs parois cellulaires se composent de protéines digestibles. Et enfin, comme les bactéries, leur information génétique n'est pas contenue dans un noyau.

#### B. Définition d'une cyanobactérie

Les cyanobactéries appartiennent au règne des Eubactéries et à la classe des cyanophycées.



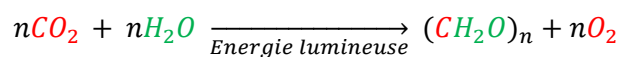
Du fait d'une ressemblance morphologique et écologique proche des algues, les cyanobactéries sont également appelées « algue bleu-vert ». Et pourtant, à l'inverse de ces organismes eucaryotes, les cyanobactéries sont dépourvues de compartiment intracellulaire soit : absence de noyau, de mitochondrie, d'appareil de Golgi, de plaste... De ce fait, le terme de cyanobactérie a été proposé plus tard pour remplacer cet abus de langage « d'algue bleue ». Ce nouveau terme permet ainsi d'insister sur la nature procaryotique des cyanobactéries (7).

## C. Photosynthèse

### 1) Définition

La photosynthèse est un processus permettant de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique, donc de créer de la matière organique à partir de la lumière du soleil. Ce phénomène contribue ainsi à l'équilibre entre le CO<sub>2</sub> et le O<sub>2</sub> dans l'atmosphère.

#### Equation de la photosynthèse :



De ce fait, les cyanobactéries sont photoautotrophes, ce sont des organismes qui utilisent la lumière comme source d'énergie et le CO<sub>2</sub> comme source carbonée. Indépendantes de la biosphère pour leur alimentation, elles peuvent se développer dans un environnement uniquement minéral en produisant elles-mêmes leurs composés organiques nécessaires à leurs développements.

### 2) Pigments photosynthétiques

Pour réaliser la photosynthèse, les cyanobactéries sont équipées de pigments capables de capturer l'énergie lumineuse du soleil. Chaque type de pigment absorbe des longueurs d'ondes spécifiques du spectre lumineux et est ainsi responsable de la coloration des organismes.

La composition en pigments varie en fonction de la taxonomie. Chez les cyanobactéries, la présence simultanée des différents pigments leur confèrent des couleurs dans le vert, le bleu ou le rouge. Toutefois, la couleur bleue reste la couleur la plus fréquemment rencontrée.

Il existe trois grandes familles de pigments impliqués dans la photosynthèse. Tout d'abord, on retrouve la chlorophylle qui est considérée comme le pigment le plus important. Ce pigment absorbe fortement le bleu et le rouge et de ce fait, réfléchit le vert, ce qui donne ainsi cette couleur à la chlorophylle. Ensuite, on retrouve des pigments dits « accessoires » qui absorbent dans les régions du spectre où la chlorophylle n'absorbe pas ou peu, puis, transfèrent cette énergie aux pigments chlorophylliens. On retrouve par exemple les caroténoïdes, pigments ayant une coloration jaune-orangé. AFA contient du lycopène, de la lutéine et de la zéaxanthine, qui ces derniers jouent un rôle photoprotecteur en dissipant l'excès de lumière. Enfin, on retrouve les pigments de la famille des phycobilines, tels que la phycocyanine et la phycocyanobiline. C'est d'ailleurs ce groupe qui sera à l'origine de la coloration bleue des cyanobactéries.

Aujourd'hui, ces pigments photosynthétiques sont très convoités par la population du fait de leur grand pouvoir antioxydant.

## D. Taxonomie d'AFA

*Aphanizomenon flos aquae* est une cyanobactérie filamenteuse dont la taxonomie est la suivante :

NOM SCIENTIFIQUE : APHANIZOMENON FLOS AQUAE	
REGNE	Eubacteria
EMBRANCHEMENT	Cyanobacteria
CLASSE	Cyanophyceae
SOUS-CLASSE	Nostocophycideae
ORDRE	Nostocales
FAMILLE	Aphanizomenonaceae
GENRE	<i>Aphanizomenon</i>
ESPECE	<i>flos aquae</i>

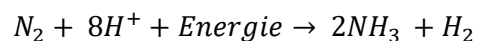
« *flos aquae* » signifie en latin « fleur d'eau »

## E. Source nutritive

Comme source nutritive, AFA utilise principalement de l'azote : soit sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) soit sous forme d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), directement assimilables par la cyanobactérie. Toutefois, lorsque ces derniers deviennent insuffisants dans l'environnement, AFA est capable d'utiliser le diazote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ), en principe non assimilable, grâce à la présence d'hétérocystes.

Les hétérocystes sont des cellules translucides renfermant de la nitrogénase, enzyme capable de réduire le  $\text{N}_2$  atmosphérique en  $\text{NH}_3$ . On estime qu'AFA peut transformer entre 5 et 10 % de ses cellules végétatives en ces cellules. Par conséquent, cette adaptation confère à AFA un réel avantage substantiel par rapport aux algues, dont les cellules eucaryotes ne peuvent fixer ce  $\text{N}_2$  atmosphérique. Ainsi, AFA peut assurer sa croissance quelle que soit la composition du milieu en azote (7).

### Equation de la fixation de l'azote atmosphérique :



De plus, AFA a aussi la possibilité de stocker cet azote, réserve-lui permettant de survivre lorsqu'il devient insuffisant dans son environnement. Par ailleurs, elle a aussi la capacité de stocker des nutriments tel que du glycogène ou encore des sources carbonées (7).

## **F. Vésicules gazeuses**

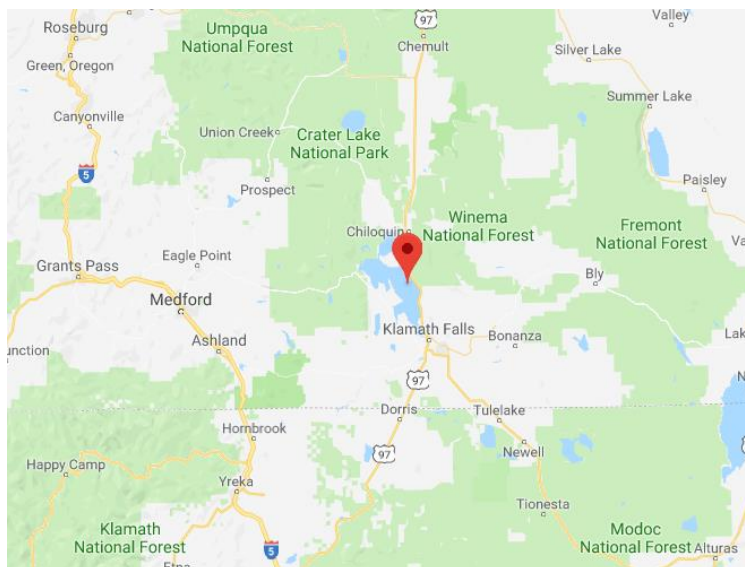
Dans le milieu aqueux, AFA peut effectuer des migrations verticales notamment grâce à la présence de vésicules gazeuses au sein de ses cellules. Cette caractéristique confère à la cyanobactérie une propriété de mobilité dans la colonne d'eau. Ainsi, elle peut profiter de l'éclairement du soleil en surface mais aussi des nutriments localisés en profondeur.

En fait, les vésicules ont une densité dix fois moins élevée que celle de l'eau, c'est cela qui permet à AFA de flotter à la surface. A l'inverse, les glucides et protéines sont beaucoup plus denses que l'eau et entraînent AFA vers le fond. De ce fait, cette cyanobactérie est capable de contrôler sa migration en agissant sur le nombre et la taille des vésicules et sur ses réserves accumulées. Cela lui permet donc de tirer tous les avantages du milieu dans lequel elle vit.

Ainsi, par ce système, AFA peut soit augmenter ses réserves nutritives en protéines et en glucides soit multiplier, par trois, son activité photosynthétique en surface (7).

## IV. LIEU DE CROISSANCE D'APHANIZOMENON FLOS AQUAE

### A. Principal biotope d'AFA : le lac Klamath (Etats-Unis)



**Figure 2 : Situation géographique du lac Klamath**

*Aphanizomenon flos aquae* croit dans un biotope : le lac Klamath. Ce vaste lac d'eau douce est situé au sud de l'Oregon aux États-Unis. Il s'agit de la plus grande réserve d'eau douce dans cet État avec une surface de 40 km de long sur 8 km de large. Le lac bénéficie d'un ensoleillement idéal sur toute sa superficie tout au long de la journée. Peu profond avec une moyenne de 1,50 mètres, cette étendue d'eau est située à une altitude de 1 262 mètres.

Oxygéné par un air pur et loin des activités industrielles, ce lac de 320 km<sup>2</sup> est entouré à l'ouest par les chaînes Cascade, à l'est par la forêt de Winema, au nord par le parc national du lac Crater et au sud par la réserve naturelle des oiseaux sauvages du lac Tule. Ce lac eutrophique et écologiquement sain offre donc un véritable havre de paix pour la faune et la flore s'y trouvant. D'ailleurs, cette région constitue la plus grande escale pour les oiseaux migrateurs vers le Pacifique, ce qui lui a valu le statut de zone naturelle protégée. Depuis 1990, l'eau du lac a fait l'objet de nombreuses analyses qui se sont toujours avérées exemptes de métaux lourds, de pesticides et autres contaminants chimiques.

Habituellement, les cyanobactéries se développent dans des eaux stagnantes, à l'inverse du lac Klamath qui possède plusieurs affluents. On retrouve, par exemple, la rivière Williamson, la rivière Woodriver, les eaux souterraines du lac Carter, ainsi que de nombreux autres petits cours d'eau s'y déversant. Par jour, on estime que le lac reçoit plusieurs millions de litres d'eau. Cet afflux constant permet de renouveler entièrement l'eau du lac en 4 an.

Le lac Crater s'est formé dans le cratère d'un ancien volcan endormi dénommé le « mont Mazama » en raison de sa ressemblance avec une montagne. Ce volcan est entré en éruption il y a environ 7000 ans et s'est effondré sur lui-même après avoir vidé sa chambre magmatique. Un bassin volcanique s'est ainsi formé et s'est rempli avec l'eau de pluie et de neige. Sa profondeur actuelle est d'environ 600 mètres. Connue comme étant l'un des lacs les plus purs du sol américain, l'eau est parait-il si limpide qu'il est possible de voir des objets à plusieurs mètres de profondeur à l'œil nu.

Parcourant près de 24 km sous la roche volcanique, l'eau pure du lac Crater enrichit le lac Klamath partageant ainsi à celui-ci sa richesse. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle AFA est récoltée au nord du lac Klamath, lieu de déversement de l'eau en provenance de ce lac.

## 1) Paramètres influençant la croissance d'AFA

Lorsque les conditions environnementales sont favorables, on assiste à une croissance massive d'AFA. On peut alors apercevoir à la surface de l'eau de nombreuses « fleurs d'eau », ou encore appelées « efflorescences », d'une coloration bleu-vert. En général, les rendements sont élevés en raison d'un ensoleillement optimal et de l'abondance en nutriments qu'offre la nature du lac Klamath. Sur le lac, leur croissance peut atteindre une épaisseur allant jusqu'à 7,5 cm (8).

### ❖ Richesse nutritive

Chaque été, on estime que plus de 30 000 tonnes d'AFA sont produites et qu'une grande partie de cette production n'est volontairement pas récoltée. En fait, cette part laissée se décomposera et permettra la formation de sédiments en profondeur. Ces sédiments, d'une épaisseur de plus de dix mètres, renferment une richesse nutritive supplémentaire pour la croissance future de la cyanobactérie. En 1967, les professeurs Miller et Tash (8) ont rapporté que, même en l'absence de tout apport nouveau de nutriments dans le lac, ces sédiments suffiraient à la croissance annuelle et massive d'AFA.

### ❖ Impact du vent en raison de la morphologie du Lac Klamath

Ayant une faible profondeur et une forme longitudinale, la morphologie du lac favorise les phénomènes de turbulences générées par le vent. Les courants d'air exercent une forte pression à la surface de l'eau la forçant ainsi à tourner, évitant sa stagnation.

De plus, ces turbulences entraînent une suspension de nombreux nutriments en surface favorisant la distribution et les échanges des minéraux et des ions au sein du lac Klamath. Par conséquent, ces derniers se retrouvent directement disponibles pour AFA, et favorisent sa croissance.

### ❖ Température du Lac Klamath

La température d'environ 7°C empêche le développement d'autres espèces dans le lac, laissant à AFA plus de place pour se développer.

### ❖ Croissance propre à AFA

Contrairement aux algues, les cyanobactéries ont un mode de croissance plus rapide par leur facilité d'adaptation à l'environnement. De plus, les cyanobactéries ont aussi une capacité de photosynthèse nettement plus efficace que ces dernières.

De plus, AFA peut utiliser l'azote atmosphérique, grâce à ses hétérocystes, lorsque celui-ci n'est plus disponible dans l'eau.

## 2) Récolte d'AFA

Pendant la période de croissance, la quasi-totalité du lac est recouvert par AFA, tellement sa croissance est importante. Son cycle de floraison est rapide, quelques jours seulement. AFA est récoltée à l'occasion de deux efflorescences, une ayant lieu entre mai et juin et une autre entre août et octobre. Sa récolte s'effectue par des barges, équipées de tapis roulants rotatifs, permettant de récupérer AFA uniquement à la surface de l'eau. Elle est immédiatement réfrigérée et filtrée pour supprimer toutes les impuretés. Enfin, elle sera séchée pour faciliter sa conservation.

Pendant cette période, le pH de l'eau peut descendre à 2 et son taux d'oxygène peut descendre à moins de 3 ppm. Ces nouvelles conditions environnementales défavorables peuvent, de ce fait, expliquer la mort de certains poissons pendant le cycle de floraison d'AFA. Ainsi, AFA s'avère néfaste pendant cette période pour d'autres espèces qui vivent au sein du lac Klamath (8) (9) (10).

## **B. Autres biotopes**

On retrouve aussi *Aphanizomenon flos aquae* dans le lac Kezar au New Hampshire, au nord des Etats-Unis, en Finlande, au Portugal, en Chine, au Danemark, au Japon ainsi qu'en Corée du Sud dans la rivière Nakdong. Cependant, nous verrons que seule la variété qui se développe dans le lac Klamath n'est pas nocive pour notre santé.

## **C. Essai de culture en France**

Fondée en 2016 à Toulouse, l'entreprise Kyanos Biotechnologies s'est donnée comme ambition de cultiver l'or bleu des Etats-Unis, qui pour l'instant n'est récoltée que dans le Lac Klamath (9).

En février 2017, un article issu du journal « LADEPECHE » paraît : des chercheurs toulousains ont réussi à faire pousser AFA dans leur laboratoire : d'abord quelques grammes puis ensuite quelques kilogrammes. Aujourd'hui, cette entreprise tente, sans relâche, d'améliorer leur rendement de culture. Leur objectif principal est de rendre AFA plus accessible au consommateur français car pour l'instant, AFA est considérée « aussi chère que du caviar ». Ces chercheurs ont l'espoir que, bientôt, AFA pourra être produite à grande échelle tout en respectant sa qualité et son innocuité.

Mais ce laboratoire pourra-t-il fournir une cyanobactérie de composition identique à celle du lac Klamath qui lui offre un milieu de croissance naturellement riche et pur ? C'est là où est toute la complexité de son industrialisation.

## V. TOXICITE D'APHANIZOMENON FLOS AQUAE

### A. Enquête de la toxicité d'AFA originaire du Lac Klamath

#### 1) 20<sup>ème</sup> siècle : Hypothèse d'une potentielle toxicité

A la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, plusieurs articles firent mention qu'*Aphanizomenon flos aquae* serait toxique pour la santé humaine ce qui alerta immédiatement les scientifiques et les consommateurs (3) (10) (8).

#### ❖ Article Phinney et Peek (1961)

Le premier article qui parut fut celui des biologistes Phinney et Peek en 1961. Ces derniers prélevèrent dans le lac Klamath des colonies dont la plupart n'avait pas l'apparence filamenteuse caractéristique d'AFA. En menant leurs expériences, ils montrèrent que l'ingestion de ces dernières était rapidement mortelle chez des souris.

N'arrivant pas à établir un lien entre cette croissance atypique et cette toxicité observée, un échantillon de leur prélèvement fut envoyé au Dr. Paul Gorham, travaillant au conseil national de recherche au Canada, pour réaliser une analyse toxicologique. Celui-ci détermina que l'échantillon prélevé n'était pas pur : dans ce dernier se trouvaient à parts égales AFA et une autre cyanobactérie : *Microcystis*, productrice de la toxine microcystine.

Ainsi, il fut conclu que la toxicité observée chez les souris était due uniquement à la toxine de *Microcystis* déjà connue comme capable, à forte concentration, d'entraîner des dommages hépatiques sévères, voir le décès.

Les chercheurs découvrirent alors qu'*Aphanizomenon flos aquae* n'était pas la seule cyanobactérie vivant dans le lac Klamath.

#### ❖ Docteur JH. Gentile (1971)

Le deuxième article paru fut celui du docteur Gentile JH. en 1971.

Comme précédemment, les prélèvements avaient montré une croissance anormale de certaines colonies d'AFA prélevées au sein du lac Klamath. De plus, lors de ses expériences sur des souris, il constata des signes d'empoisonnement similaires aux expériences réalisées sur les prélèvements des colonies atypiques d'AFA du lac de Kezar au New Hampshire, au nord des Etats-Unis. En fait, les colonies prélevées dans ce lac, à l'époque, avaient-elles-aussi été identifiées à tort comme AFA.

Là aussi face à ces croissances atypiques, le docteur Gentile mentionna bien dans son article que « cet essai de toxicité anecdotique sur le lac Klamath devait être réexaminé de manière rigoureuse avant de pouvoir conclure que cette cyanobactérie était bien productrice d'une toxine ». La toxicité identifiée était la saxitoxine, un composé neurotoxique.

#### ❖ Synthèse des articles

Bien que ces deux articles à l'époque semblaient démontrer une éventuelle toxicité d'*Aphanizomenon flos aquae* provenant du lac Klamath, c'était incohérent d'affirmer sa toxicité ou son danger pour la santé humaine sans que la taxonomie de la cyanobactérie testée ne soit établie. Cette croissance non caractéristique d'AFA laissait donc supposer que les chercheurs n'étaient pas en présence de la bonne espèce. De plus, il fut aussi conclu que certaines espèces d'AFA pouvaient être toxiques suivant l'origine des prélèvements.



## 2) 21<sup>ème</sup> siècle : AFA exempte de toxicité dans le Lac Klamath

### ❖ Etude du professeur Wayne W. Carmichael

Dans les années 2000, le mystère de la toxicité d'AFA fut enfin élucidé par le professeur Wayne W. Carmichael et son équipe. Ils démontrèrent que l'espèce productrice de saxitoxine, identifiée comme étant AFA par le docteur Gentile dans le lac Klamath et dans le lac Kezar au New Hampshire, était génétiquement différente.

Les chercheurs découvrirent alors une nouvelle espèce : *Anabaena flos aquae*, appartenant elle aussi à l'ordre des Nostocales. *Anabaena* est une cyanobactérie filamenteuse capable de produire des neurotoxines : anatoxine a, anatoxine a-S et des saxitoxines, toxiques pour la santé humaine (11).

### ❖ Extrait du rapport d'expertise du 25 octobre 2006 : docteur Gaillard, biologiste expert en toxicologie

« L'étude complète de la littérature scientifique montre que l'espèce *Aphanizomenon Flos-Aquae* qui pousse à l'état sauvage n'a jamais été rapportée comme étant toxique. Il existe une autre cyanobactérie bleu-vert, *Mycrocystis aeruginosa*, qui elle contient une toxine virulente : la microcystine. Dans ces conditions, il est clair que la toxicité exprimée au travers de la microcystine est à mettre en liaison avec la présence de *Mycrocystis Aeruginosa* et non de l'*Aphanizomenon Flos-Aquae*. En conclusion, le variant Américain de l'*Aphanizomenon Flos-Aquae* n'a jamais été rapporté comme ayant une action toxique ou délétère pour la santé » (8).

Ce rapport vient donc confirmer les travaux, faits au préalable, par le docteur Paul Gorham.

## 3) Autres espèces présentes dans le Lac Klamath

Bien qu'*Aphanizomenon flos aquae* soit l'espèce dominante dans le lac Klamath, d'autres cyanobactéries y vivent également, comme le révélèrent les études toxicologiques. En effet, pendant toute sa période de croissance, d'autres cyanobactéries comme *Mycrocystis aeruginosa* ou *Anabaena flos aquae* peuvent se développer en plus faibles quantités (12).

Qu'AFA soit l'espèce la plus présente dans le lac peut s'expliquer par la température de l'eau qui diminue quand elle se développe. Cela a pour conséquence d'empêcher le développement des autres cyanobactéries puisqu'elles nécessitent des eaux chaudes. Ceci limite le risque de contamination de la cyanobactérie AFA. Néanmoins, des contrôles fréquents sont nécessaires pour garantir une absence de toxines provenant des autres espèces du lac.

#### 4) Contrôle du lac Klamath

Chaque récolte d'AFA effectuée au sein du lac Klamath est réglementée par un programme d'assurance qualité. En effet, chaque lot récolté dans la journée est soumis à une série de contrôles afin d'affirmer sa qualité ainsi que sa pureté.

Il existe différentes méthodes de contrôle selon les toxines recherchées :

- Dosages biologiques sur des souris pour détecter des neurotoxines (anatoxines-a et saxitoxines)
- Dosages immunoenzymatiques (ELISA) ou dosages PPIA (Protein Phosphatase Inhibition Assay) pour détecter des hépatotoxines (microcystines)
- Dosages enzymatiques par spectrophotométrie pour détecter d'autres neurotoxines (anatoxine a-S)

Le Département de l'Agriculture de l'Oregon et l'OMS ont fixé une norme de sécurité limite : 1 µg de microcystine par gramme de poids sec d'AFA. Cette sécurité est jugée amplement suffisante puisqu'on estime qu'il faudrait des concentrations 10 000 fois plus élevées pour provoquer des lésions hépatiques chez un individu (13) (14). Par ailleurs, une étude menée par le docteur Scoglio a montré l'absence de toute toxicité chez des souris ayant ingéré des teneurs en microcystine supérieures à cette norme : soit de 333 µg/kg de poids corporel. Au bout de 6 mois d'étude, aucune hépatotoxicité n'a été détectée et toutes les souris étaient en bonne santé (15).

### **B. Toxicité liée aux différentes variétés d'AFA**

Grâce à l'identification des caractéristiques morphologiques et au séquençage du génome des cyanobactéries, les scientifiques découvrirent l'existence de différentes espèces et variétés d'*Aphanizomenon*.

Aujourd'hui, nous connaissons certaines variétés d'AFA capables de produire des toxines, telle que « CyanoHAB ». C'est le cas, par exemple, d'une variété d'*Aphanizomenon* qui croit dans la rivière Nakdong (16)(17).

Concernant la variété du lac Klamath « *Aphanizomenon flos aquae var flos aquae* », son séquençage n'a révélé aucun gène toxique. Cette avancée a permis de garantir l'innocuité ou non innocuité de chaque cyanobactérie étudiée.

### **C. Conclusion**

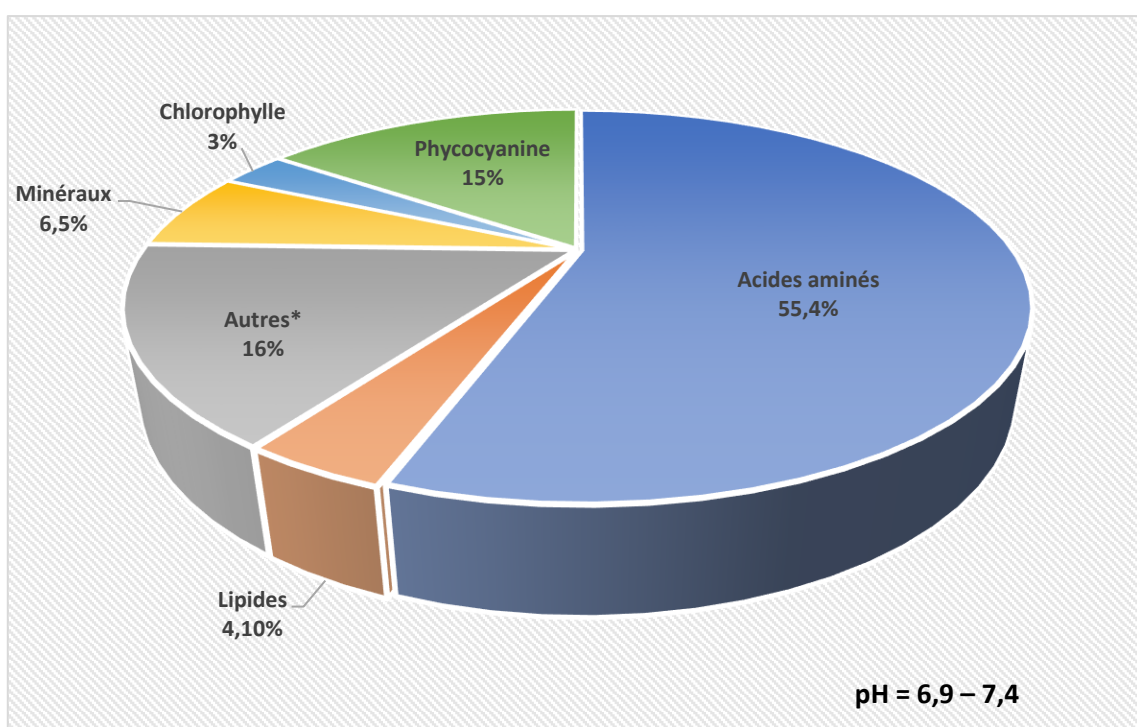
En conclusion, la variété « *Aphanizomenon flos aquae var flos aquae* » du lac Klamath n'est pas nocive pour notre organisme puisque cette variété est génétiquement incapable de produire des toxines.

Aujourd'hui, le seul risque est une éventuelle contamination par les autres cyanobactéries du lac comme *Mycrocystis aeruginosa* ou *Anabaena flos aquae*. Toutefois, grâce à des contrôles réguliers, tous les lots d'AFA commercialisés ont des taux de contaminants bien inférieurs aux limites fixées par l'OMS.

## VI. ANALAYSE NUTRITIONNELLE D'APHANIZOMENON FLOS AQUAE

Lipides, glucides, acides aminés, vitamines, oligo-éléments, minéraux et eau sont les sept constituants de base de notre alimentation. *Aphanizomenon flos aquae* se compose de tout un cocktail de macronutriments et micronutriments directement et hautement assimilables par notre organisme. Comptant 115 nutriments, c'est aujourd'hui l'aliment le plus complet de la planète (8) (18) (10) (19).

La nutrition est une science complexe où il est parfois difficile de déterminer avec exactitude la composition d'un produit. C'est pourquoi selon les sources, la composition d'AFA pourra fluctuer. Néanmoins, pour chaque source, nous retrouverons des valeurs proches.



**Figure 3 :** Diagramme représentant en % la composition d'AFA (pour 100 g)

Autres\* : glucides, vitamines, Superoxyde dismutase (SOD), fibres, flavonoïdes

Teneurs issues du site internet, « SynerJ Health » (19)

## A. Les acides aminés

Les acides aminés représentent plus de la moitié de la composition d'*Aphanizomenon flos aquae*. Ils interviennent dans la structure, le métabolisme et le bon fonctionnement des cellules puisqu'ils permettent, en s'enchaînant, de former les protéines (20).

### 1) Acides aminés essentiels

Un acide aminé essentiel, également appelé acide aminé « indispensable » est un acide aminé qui ne peut pas être synthétisé par notre organisme : l'apport est donc exogène par la nourriture. On retrouve l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la valine.

<b>ISOLEUCINE</b>	Amélioration des performances sportives et de l'endurance (21) Formation de l'hémoglobine (22) Régulation de la glycémie (22)(23)
<b>LEUCINE</b>	Amélioration des performances sportives, de l'endurance, de la récupération musculaire (24) Régulation de la glycémie (24) Cicatrisation tissulaire (24) Production de l'hormone de croissance (24)
<b>LYSINE</b>	Induction des réponses inflammatoires et immunitaires (25) (26) Lutte contre les infections au virus Herpès (27) Régulation de la glycémie (28) Favorise l'absorption du calcium (prévention de l'ostéoporose) (29) Cicatrisation tissulaire (30) Rôle antioxydant (31) (32)
<b>METHIONINE</b>	Empêche l'accumulation des graisses dans le foie (33) Facilite l'absorption et la biodisponibilité du sélénium et du zinc (33) Cicatrisation tissulaire (34) (33) Rôle antioxydant (précurseur de la cystéine) (35) (33) Protection contre les métaux lourds (plomb, mercure) Renforcement du système immunitaire (augmentation absorption sélénium et cuivre) Souplesse et croissance des cheveux / ongles (33)
<b>PHENYLALANINE</b>	Rôle dans le système nerveux central (participe à la formation de PEA, de noradrénaline, dopamine, adrénaline) <i>Dans 1 g d'AFA, on retrouve en moyenne 2 mg de PEA</i>

<b>THREONINE</b>	Formation de l'émail des dents, du collagène et de l'élastine (36) Augmentation de la capacité d'absorption et la digestion des nutriments (36) (37) Rôle dans le système nerveux central (anxiété, dépression) (36) Intervient dans le métabolisme de la porphyrine (composant de l'hémoglobine) (36)
<b>TRYPTOPHANE</b>	Rôle dans le système nerveux central (précurseur sérotonine, amélioration humeur, qualité du sommeil) (38) (39)
<b>VALINE</b>	Meilleure croissance musculaire et récupération à l'effort (40) Rôle dans le système nerveux central (maintien du calme émotionnel)

## 2) Acides aminés semi-essentiels

Un acide aminé semi-essentiel est un acide aminé qui, uniquement chez les jeunes enfants, n'est pas synthétisé par l'organisme à cause de l'immaturité de leur système enzymatique : l'apport est donc exogène par la nourriture. On retrouve l'Histidine et l'Arginine (41) (42).

<b>HISTIDINE</b>	Régénération tissulaire et croissance osseuse (43) Protection contre les métaux lourds et radiations (44) Précurseur de l'histamine (rôle dans l'inflammation et dans la sécrétion gastrique)
<b>ARGININE</b>	Augmentation de la production de monoxyde d'azote (diminution de la pression artérielle) (45) Diminution du taux de cholestérol sanguin Augmentation de l'élimination l'ammoniac (46) Stimule le système immunitaire (41)

### 3) Acides aminés non essentiels

Un acide aminé non essentiel est un acide aminé qui est synthétisé par notre organisme à partir d'autres acides aminés, de lipides, de glucides ou d'autres vitamines.

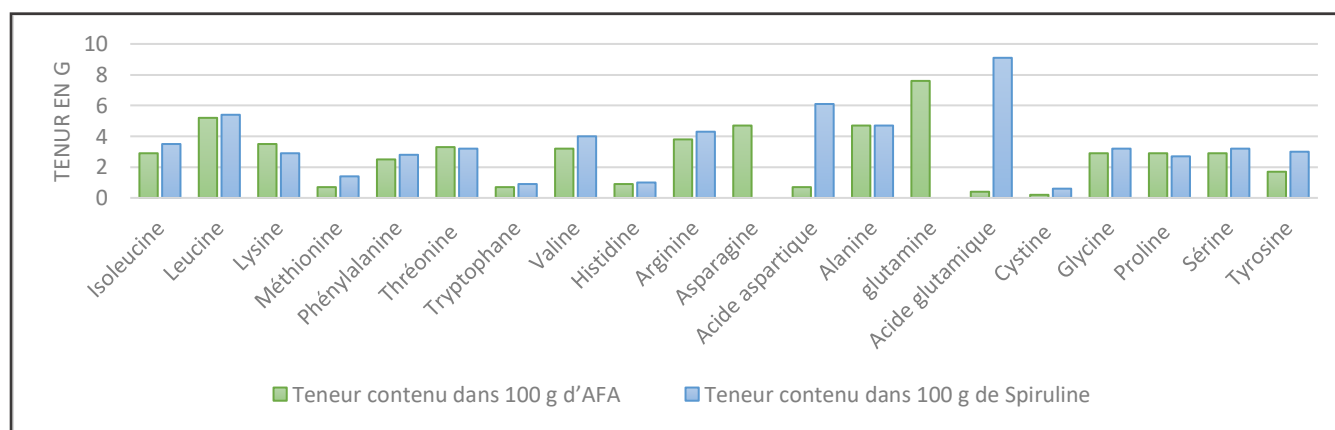
<b>ASPARAGINE ET ACIDE ASPARTIQUE</b>	Amélioration du métabolisme hépatique (44) Augmentation de l'élimination de l'ammoniac (47) Diurétique (47)
<b>ALANINE</b>	Augmentation de l'endurance et de la récupération à l'effort (48) Augmentation de la sécrétion de glucagon (49) (50) Rôle dans le système immunitaire (formation des globules blancs) (50)
<b>GLUTAMINE ET ACIDE GLUTAMIQUE</b>	Maintien de l'équilibre acido-basique (51) Rôle antioxydant (intervient dans la synthèse de glutathion) (52) Augmentation de la synthèse de glycogène (44) Favorise la récupération musculaire (53) Rôle dans le système nerveux central (participe à la formation de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs) (54) Augmentation de l'élimination de l'ammoniac (44) (54)
<b>CYSTINE</b>	Rôle antioxydant (précurseur glutathion) (55) Prévient la chute capillaire (combiné avec la vitamine B6) et active la croissance des ongles (55)
<b>GLYCINE</b>	Rôle dans le système nerveux central (diminution de l'hyperactivité neuronale, améliore la qualité du sommeil) (56) Rôle antioxydant (précurseur glutathion) (57) Anti-inflammatoire, cytoprotectrice et immunomodulatrice (57)
<b>PROLINE</b>	Cicatrisation tissulaire (intervient dans la synthèse de collagène) (20)
<b>SERINE</b>	Stimule le système immunitaire (58) (59) Rôle dans le système nerveux central (composant de la gaine de myéline) (60)
<b>TYROSINE</b> <i>Peut-être synthétisé à partir de la phénylalanine</i>	Contribue à la production de mélanine (61) Rôle dans le système nerveux central (précurseur de la noradrénaline, la dopamine et l'épinéphrine) (61)(62) Précurseur des hormones thyroïdiennes (61)(63)

#### 4) Tableau récapitulatif de la teneur en acides aminés

		Teneur dans 100 g d'AFA (en g)	Teneur dans 100 g de Spiruline (en g)
ACIDES AMINES ESSENTIELS	Isoleucine	2,9	3,5
	Leucine	5,2	5,4
	Lysine	3,5	2,9
	Méthionine	0,7	1,4
	Phénylalanine	2,5	2,8
	Thrénine	3,3	3,2
	Tryptophane	0,7	0,9
	Valine	3,2	4,0
ACIDES AMINES SEMI-ESSENTIELS	Histidine	0,9	1,0
	Arginine	3,8	4,3
ACIDES AMINES NON ESSENTIELS	Asparagine	4,7	/
	Acide aspartique	0,7	6,1
	Alanine	4,7	4,7
	Glutamine	7,6	/
	Acide glutamique	0,4	9,1
	Cystine	0,2	0,6
	Glycine	2,9	3,2
	Proline	2,9	2,7
	Sérine	2,9	3,2
	Tyrosine	1,7	3,0
TOTAL (%)		55,4	62

**Tableau 1 : Comparaison de la teneur en acides aminés contenus dans 100 g d'AFA et dans 100 g de Spiruline (8)**

Teneurs issues du livre de Jacques Prunier, « *Cellules souches adultes : Aphanizomenon et Synerstem Health* »



**Figure 4 : Graphique représentant la composition nutritionnelle en acides aminés d'AFA et de la spiruline (8)**

La spiruline possède une teneur plus élevée en acides aminés par rapport à AFA. D'ailleurs elle est exempte d'asparagine et de glutamine. *Aphanizomenon*, quant à elle, possède un pourcentage en acides aminés plus faible, même si certaines teneurs sont pratiquement identiques avec celle de la spiruline. Néanmoins contrairement à cette cyanobactérie, elle renferme la totalité des acides aminés essentiels au bon fonctionnement de l'organisme.

## B. Les lipides

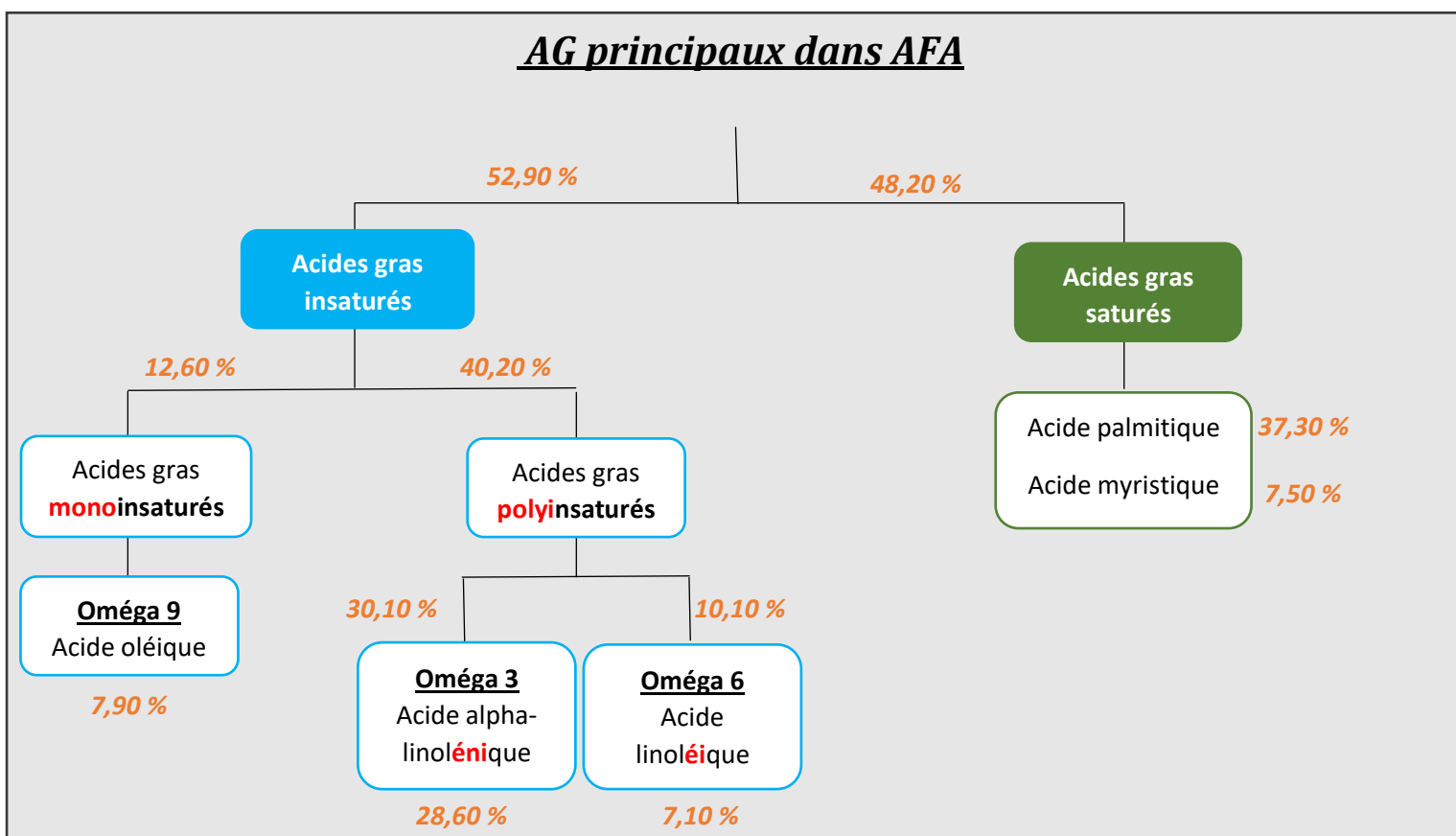
Les lipides participent au stockage de l'énergie et ont un rôle structural majeur en rentrant dans la composition des membranes cellulaires. Ils doivent représenter 30% des apports journaliers.

### 1) Les acides gras d'AFA

Il existe deux types d'acides gras : les acides gras saturés et les acides gras insaturés.

Les acides gras saturés sont majoritairement présents dans les matières grasses d'origine animale : viande, fromage, beurre, crème ; mais on les retrouve aussi dans le monde végétal : huile de palme, de coco. Consommés en excès, ils favorisent l'augmentation du mauvais cholestérol (LDL) responsable du développement de maladies cardiovasculaires. A l'inverse, les acides gras insaturés se retrouvent en grande majorité dans les matières grasses d'origine végétale : huile de colza, de maïs et d'olive.

Dans ce type d'acides gras, il existe deux acides gras polyinsaturés essentiels et fondamentaux au bon fonctionnement du système nerveux, immunitaire et cardiovasculaire. Notre organisme ne pouvant les produire, il est donc nécessaire de les apporter par l'alimentation. On retrouve l'acide alpha-linolénique dans la famille des  $\omega$ -3 et l'acide linoléique dans la famille des  $\omega$ -6.



**Figure 5 : Schéma représentant les principaux acides gras d'AFA (pour 100 g)**

Teneurs issues du livre de Jacques Prunier, « Cellules souches adultes : Aphanizomenon et Synerstem Health » (8)

Dans la plupart des pays occidentaux, la population consomme des acides gras polyinsaturés avec un ratio  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 bien supérieur aux recommandations (norme :  $\frac{\omega-6}{\omega-3} = \frac{4}{1}$ ), ce qui favorise l'apparition de maladies inflammatoires. Dans la composition de la cyanobactérie, on peut constater qu'elle est 4 fois plus riche en  $\omega$ -3 qu'en  $\omega$ -6. Par conséquent, AFA pourrait permettre de rétablir l'équilibre de nos apports en lipides.



## 2) Effets des $\omega$ -3 et $\omega$ -6

(64)

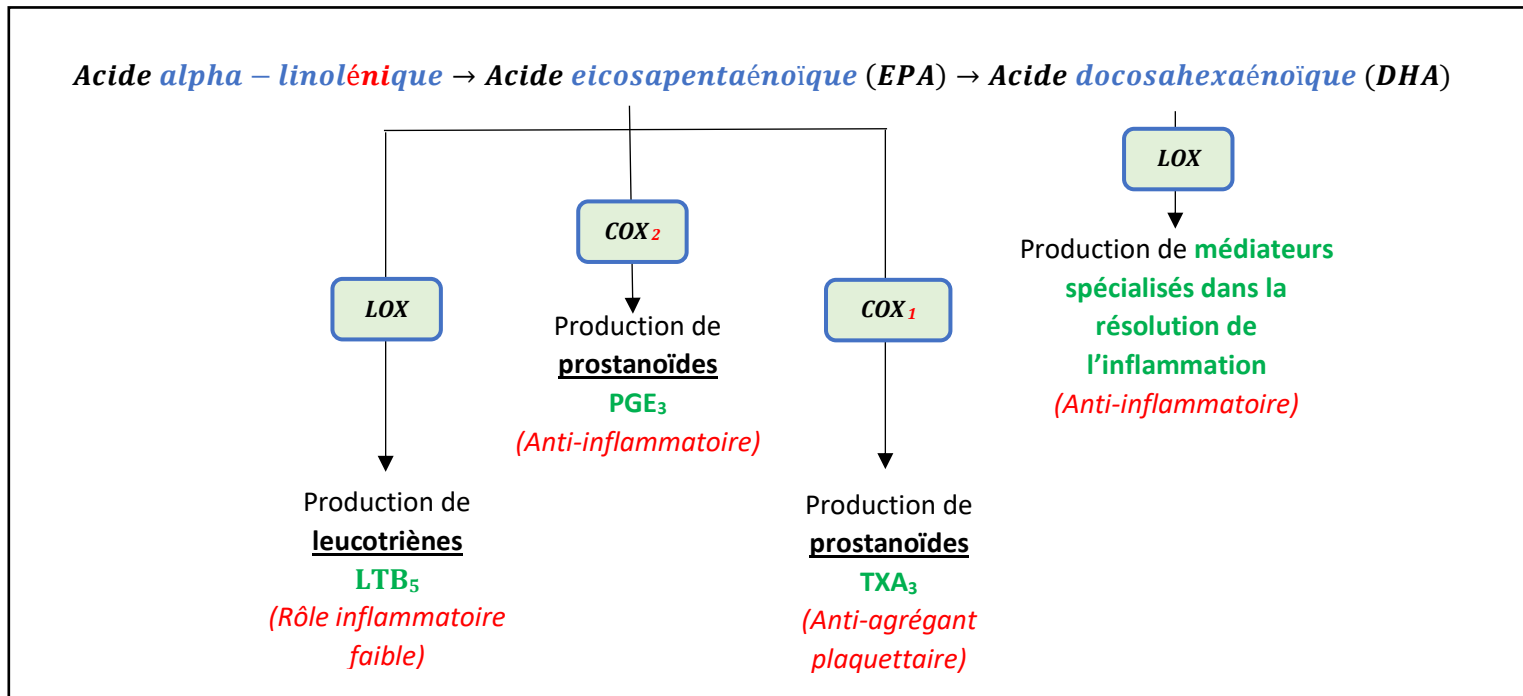


Figure 6 : Effets principaux de la famille des  $\omega$ -3

L'acide docosahexaénoïque est un composant clé de toutes les membranes cellulaires et se trouve en abondance dans le cerveau et la rétine aidant à leur bon fonctionnement (65).

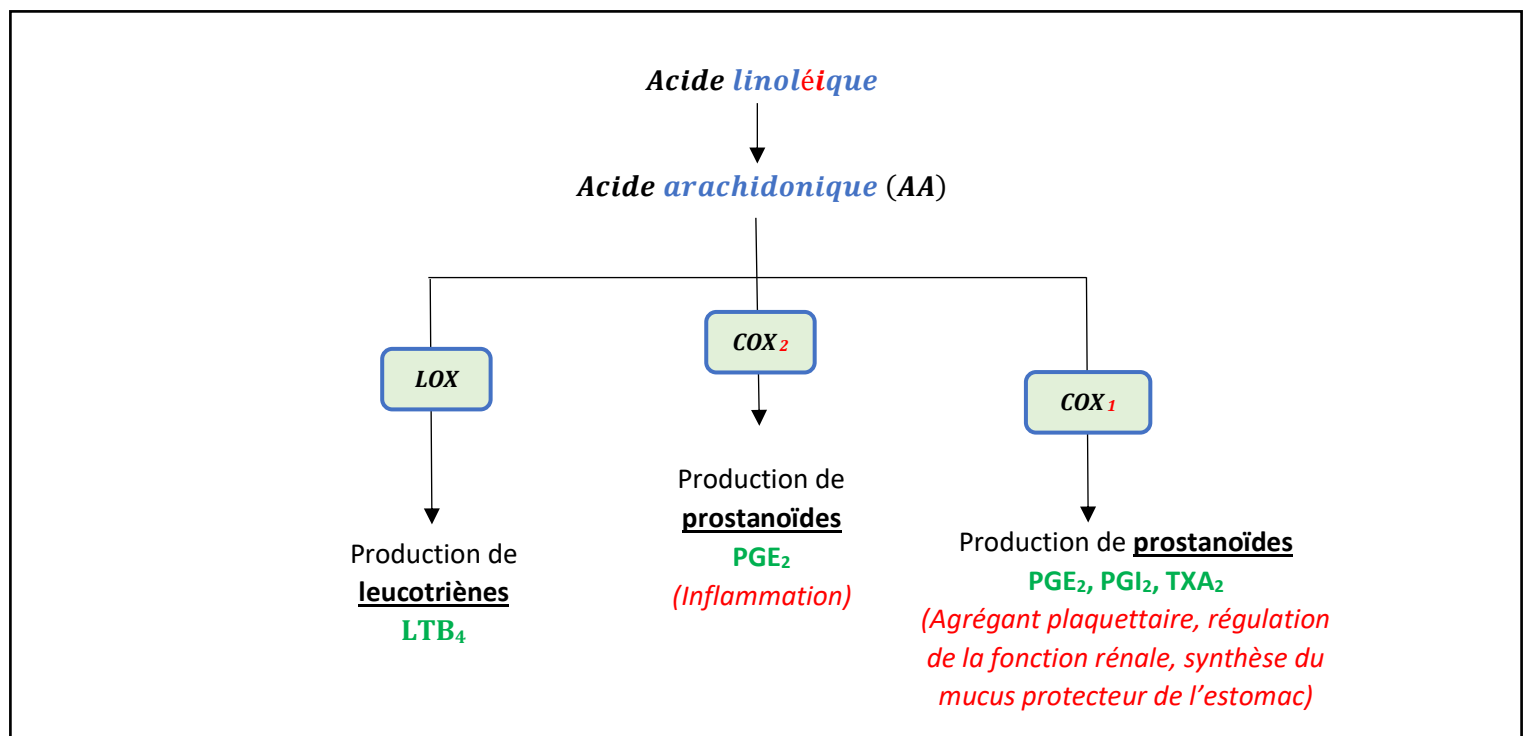


Figure 7 : Effets principaux de la famille des  $\omega$ -6

(66,67)

### 3) Tableau des concentrations en acides gras d'AFA

Acides gras saturés : 48,20 %	
Acide caprique (10C)	0,10 %
Acide laurique (12C)	
Acide tridécanoïque (13C)	
Acide nonadécanoïque (19C)	
Acide béhénique (22C)	
Acide lignocérique (24C)	
Acide hénicosanoïque (21C)	0,20 %
Acide arachidique (20C)	
Acide pentadécanoïque (15C)	0,60 %
Acide heptadécanoïque (17C)	0,60 %
<b>Acide stéarique (18C)</b>	<b>1,70 %</b>
<b>Acide myristique (14C)</b>	<b>7,50 %</b>
<b>Acide palmitique (16C)</b>	<b>37,30 %</b>

Acides gras monoinsaturés : 12,60 %	
Acide érucique (22 : 1, n-9)	0,10 %
Acide margaroléique (17 : 1, n-8)	0,20 %
Acide myristoléique (14 : 1, n-5)	0,40 %
Acide eicosanoïque (20 : 1, n-9)	0,50 %
Acide palmitoléique (16 : 1, n-7)	3,50 %
<b>Acide oléique (18 : 1, n-9)</b>	<b>7,90 %</b>

Acides gras polyinsaturés : 40,20 %	
ω-6 : 10,10 %	
Acide docosadiénoïque (22 : 2, n-6)	0,10 %
Acide arachidonique (20 : 4, n-6)	0,20 %
Acide gamma-linolénique (18 : 3, n-6)	2,70 %
<b>Acide linoléique (18 : 2, n-6)</b>	<b>7,10 %</b>
ω-3 : 30,10 %	
Acide docosahexaénoïque (22 : 6, n-3)	0,30 %
Acide eicosapentaénoïque (20 : 5, n-3)	1,20 %
<b>Acide alpha-linolénique (18 : 3, n-3)</b>	<b>28,60 %</b>

Tableau 2 : Taux d'AG saturés et insaturés dans 100 g d'AFA

Teneurs issues du livre de Jacques Prunier, « Cellules souches adultes : Aphanizomenon et Synerstem Health » (8)

### 4) Comparaison des teneurs en acide alpha-linolénique et linoléique d'AFA avec celles de la spiruline

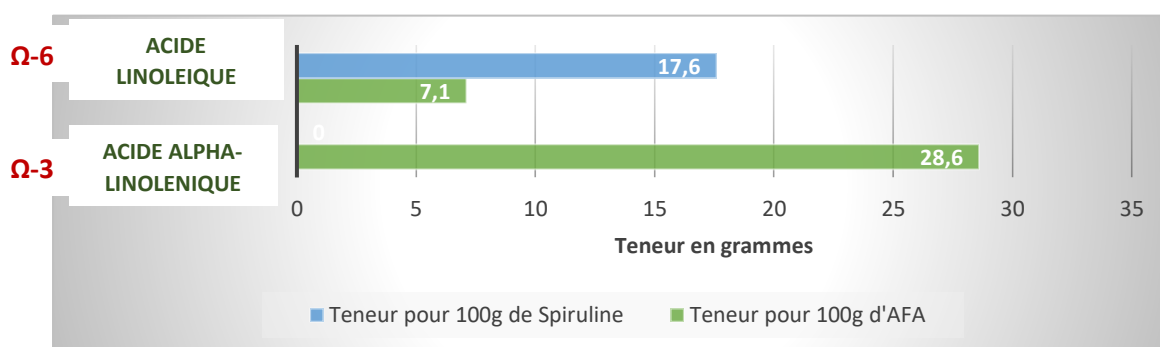


Figure 8 : Graphique représentant le % en acide alpha-linolénique et linoléique dans l'AFA et dans la Spiruline

Teneurs issues du livre de Jacques Prunier, « Cellules souches adultes : Aphanizomenon et Synerstem Health » (8)

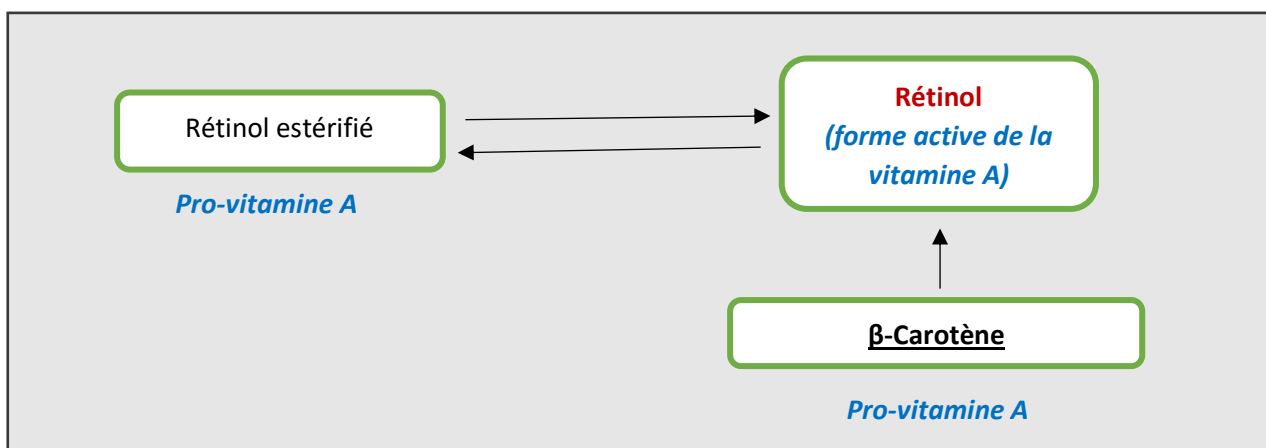
Selon ces données (figure 8), on observe que la spiruline est plus riche en acide linoléique que la cyanobactérie. De ce fait, elle n'est pas en faveur d'un bon ratio ω-6/ω-3. De plus, cette dernière ne contient que des traces d'acide linolénique, polyinsaturé essentiel à notre organisme alors que cet acide gras représente plus d'un quart de la masse séchée d'AFA (68).

## C. Les vitamines

### 1) Rôles des vitamines liposolubles (non exhaustifs)

<b>VITAMINE A</b> (Après conversion du $\beta$ -carotène)	Rôle antioxydant (69) Rôle sur le système immunitaire (stimule la production de cytokines pro-inflammatoires) (69) Développement embryonnaire (70) Amélioration de la vision nocturne (69)
<b>VITAMINE E</b> (Tocophérol)	Rôle antioxydant (71) Inhibition de l'agrégation plaquettaire (71) (72)

### Point sur la vitamine A



Pour transformer le  $\beta$ -carotène pro-vitaminique en rétinol, soit passer du précurseur à la forme active de la vitamine A, une conversion est nécessaire. L'activité vitaminique du composé sera exprimée en équivalent rétinol (ER) selon l'équation ci-dessous :

$$1 \mu\text{g rétinol} = 1 \mu\text{g ER}$$

$$1 \mu\text{g } \beta\text{-carotène} = \frac{1}{12} \mu\text{g ER}$$

Le coefficient de 1/12 est une valeur moyenne définie par l'IOM (*Institute of medicine*) pour un régime de type occidental et une population avec des réserves satisfaisantes en vitamine A.

A forte dose, le rétinol peut s'avérer toxique pour notre organisme : cirrhose, ostéoporose, sécheresse cutanée, maladies congénitales. Par conséquent, il est préférable que l'apport de cette vitamine se fasse sous forme de précurseur, qui sera converti en rétinol qu'en fonction des besoins.

## 2) Rôles des vitamines hydrosolubles (non exhaustifs)

(73)

<b>VITAMINE B<sub>1</sub></b> <b>(Thiamine)</b>	Production d'énergie (à partir des glucides) (74) Favorise le bon fonctionnement musculaire (74) Utilisé dans le sevrage alcoolique (dégrade les molécules d'alcool) (75)
<b>VITAMINE B<sub>2</sub></b> <b>(Riboflavine)</b>	Production d'énergie (à partir des glucides, protéines, lipides) (76) Stimule la production de kératine (peau, ongle, cheveux) (77) Rôle antioxydant (76) (77)
<b>VITAMINE B<sub>3</sub></b> <b>(Niacine)</b>	Rôle hypocholestérolémiant (78) Rôle antioxydant (79)
<b>VITAMINE B<sub>5</sub></b> <b>(Acide pantothénique)</b>	Participe à la synthèse de cholestérol , de lipides, des neurotransmetteurs (adrénaline), des hormones stéroïdes (cortisol) et de l'hémoglobine (80) Participe au métabolisme des glucides et lipides (80)
<b>VITAMINE B<sub>6</sub></b> <b>(pyroxidine)</b>	Intervient dans la formation des globules rouges (81) Rôle dans le système nerveux central (synthèse de neurotransmetteurs) (82)
<b>VITAMINE B<sub>8</sub></b> <b>(Biotine)</b>	Favorise la diminution du taux de glucose sanguin (83) Améliore la qualité des cheveux et des ongles (73)
<b>VITAMINE B<sub>9</sub></b> <b>(Acide folique)</b>	Participe à la l'hématopoïèse (formation des globules rouges) (84) Diminution des taux sanguins d'homocystéine (associée à la vitamine B <sub>12</sub> ) (85) Rôle dans le système nerveux central (85)
<b>VITAMINE B<sub>12</sub></b> <b>(Cobalamine)</b>	Participe à la l'hématopoïèse (formation des globules rouges) (86) Diminution des taux sanguins d'homocystéine (associée à la vitamine B <sub>9</sub> ) (86) Rôle dans le système nerveux central (86)
<b>VITAMINE C</b> <b>(Acide ascorbique)</b>	Rôle antioxydant (87)(88) Cicatrisation tissulaire / formation du cartilage, dents, os (87)(88) Augmente l'assimilation du fer (88)

### 3) Tableau représentant la teneur en vitamine dans AFA et la spiruline

	Teneur dans 100 g d'AFA (en mg)	Teneur dans 100 g de Spiruline (en mg)
PRO-VITAMINE A	144,00	139,80
VITAMINE E	13,30	10,00
VITAMINE B <sub>1</sub>	480,00	35,00
VITAMINE B <sub>2</sub>	5,70	0,04
VITAMINE B <sub>3</sub>	13,30	0,14
VITAMINE B <sub>5</sub>	0,01	0,001
VITAMINE B <sub>6</sub>	1,10	0,008
VITAMINE B <sub>8</sub>	0,0333	0,0001
VITAMINE B <sub>9</sub>	0,10	0,0001
VITAMINE B <sub>12</sub>	0,80	0,0030
VITAMINE C	66,70	/
TOTAL	725,0433	184,9922

**Tableau 3 : Comparaison de la teneur en vitamines dans 100 g d'AFA et 100 g de Spiruline**

Teneurs issues du site internet, « SynerJ Health » (19)

Le tableau 3 nous montre qu'*Aphanizomenon flos aquae* a une teneur en vitamines quatre fois plus élevée par rapport à la Spiruline. De plus, la vitamine C est uniquement retrouvée dans AFA, ce qui lui confère une plus grande richesse.

**Tableau 4 : Comparaison de la composition d'AFA avec les références nutritionnelles validées par le Comité d'Experts Spécialisé (CES) « Nutrition Humaine » (6)**

	Teneur en mg dans 100 g d'AFA	Teneur dans 1 g d'AFA	Besoin Nutritionnel Moyen (BNM)	Référence Nutritionnel pour la Population (RNP)	AS en mg	Référence (6)	AJR en %
<b>Pro-Vit A</b>	144	1,44 mg = 120 µg ER	(H) 570,00 µg ER (F) 490,00 µg ER	(H) 750,00 µg ER (F) 650,00 µg ER		EFSA, 2015	(H) 16 - 21,05 (F) 18,46 - 24,49
<b>VitE</b>	13,30	0,53 mg		(H) 10,50 mg (F) 9,90 mg		EFSA, 2015	(H) 5,05 (F) 5,35
<b>VitB<sub>1</sub></b>	<b>480,00</b>	<b>4,80 mg</b>			<b>(H) 1,50 (F) 1,20</b>	<b>AFSSA, 2001</b>	<b>(H) 320 (F) 400</b>
<b>VitB<sub>2</sub></b>	5,70	0,057 mg			(H) 1,80 (F) 1,50	AFSSA, 2001	(H) 3,17 (F) 3,8
<b>VitB<sub>3</sub></b>	13,30	0,133 mg	(H) 14,40 mg (F) 11,40 mg	(H) 17,40 mg (F) 14,00 mg		EFSA, 2014	(H) 0,76 - 0,92 (F) 0,95 - 1,17
<b>VitB<sub>5</sub></b>	0,01	0,1 µg		(H) 5,80 mg (F) 4,70 mg		EFSA, 2014	0,02
<b>VitB<sub>6</sub></b>	1,10	0,011 mg		(H) 1,80 mg (F) 1,50 mg		AFSSA, 2001	(H) 0,61 (F) 0,73
<b>VitB<sub>8</sub></b>	0,0333	0,333 µg		50 µg		AJR du Règlement 1169/2011	0,66
<b>VitB<sub>9</sub></b>	0,1	0,001 mg	250,00 µg	330,00 µg		EFSA, 2014	0,0003 - 0,0004
<b>VitB<sub>1</sub></b>	<b>0,8</b>	<b>8,00 µg</b>		<b>4,00 µg</b>		<b>EFSA, 2015</b>	<b>200</b>
<b>VitC</b>	66,7	667 µg	90,00 mg	110,00 mg		EFSA, 2013	0,61 - 0,74

(H) : Homme / (F) : Femme

Concernant la vitamine B<sub>12</sub>, pour 1 g d'AFA, on retrouve 8 µg de vitamine. L'apport journalier recommandé étant de 4 µg par jour on couvre donc 200 % des AJR. Cet apport est intéressant chez les végétariens qui sont souvent carencés en cette vitamine. De plus, même si l'apport en vitamine B<sub>12</sub> est supérieur aux AJR, le risque de surdosage est rare car seulement une fraction de la dose ingérée est réellement absorbée. Concernant la vitamine B<sub>1</sub>, on la retrouve également à des concentrations supérieures aux AJR ce qui est intéressant car une carence en cette vitamine peut provoquer la maladie de « Béribéri », maladie responsable de troubles cardiaques et neurologiques. Cette pathologie est d'ailleurs souvent rencontrée dans les pays où la malnutrition est présente.

## D. Les sels minéraux

On distingue deux catégories de sels minéraux : les macro-éléments, qui sont en concentration relativement élevés dans l'organisme, et les oligoéléments qui, au contraire, sont présents en très petites quantités, voir même à l'état de traces.

A l'inverse des macronutriments, les sels minéraux n'apportent aucune énergie au corps humain. Présents sous forme d'ions, ces substances sont néanmoins indispensables au bon fonctionnement de l'organisme : composants d'enzymes, d'hormones, de vitamines. Elles jouent un rôle dans le renforcement de la structure osseuse et dentaire ; le maintien du rythme cardiaque, dans la contraction musculaire, dans la conductivité neuronale, dans le maintien de l'équilibre acido-basique etc...

Quotidiennement éliminés par le rein, l'apport en sel minéraux doit être conséquent chaque jour.

### 1) Les Macro-éléments

<b>CALCIUM</b> (89)	Action minéralisante (os, dent) Rôle dans le système nerveux central (contraction neuromusculaire) Conduction nerveuse Intervient dans la coagulation sanguine Cicatrisation tissulaire
<b>MAGNESIUM</b> (90) (91)	Rôle dans le système nerveux central (contraction neuromusculaire) Action minéralisante (os) Rôle au niveau cardiaque (Régulation de la tension artérielle, excitabilité cardiaque) Métabolisme insuline
<b>PHOSPHORE</b>	Action minéralisante (os, dent) Intervient dans le stockage et la libération d'énergie Rôle dans le maintien de l'équilibre acido-basique Constituant de l'ADN/ARN
<b>POTASSIUM</b>	Constituant de l'aldostérone, glycogène Rôle au niveau cardiaque (régule la pression osmotique intracellulaire, régulation du rythme cardiaque) Maintien du taux d'acidité gastrique Rôle dans le système nerveux central (Contraction neuromusculaire) Rôle dans le maintien de l'équilibre acido-basique
<b>SODIUM</b>	Rôle au niveau cardiaque (régule la pression osmotique extracellulaire, régulation du rythme cardiaque) Rôle dans le maintien de l'équilibre acido-basique Rôle dans le système nerveux central (Contraction neuromusculaire)

	<i>Teneur dans 1 g d'AFA (en mg)</i>	<i>Teneur dans 1 g de Spiruline (en mg)</i>	<i>AFA en % de la spiruline</i>
CALCIUM	<b>14,00</b>	<b>10,00</b>	<b>140</b>
MAGNESIUM	<b>2,20</b>	<b>4,0</b>	<b>55</b>
PHOSPHORE	<b>5,10</b>	<b>8,0</b>	<b>63,75</b>
POTASSIUM	<b>0,012</b>	<b>0,014</b>	<b>85,71</b>
SODIUM	<b>2,70</b>	<b>9,0</b>	<b>30</b>
TOTAL	<b>24,012</b>	<b>31,014</b>	

**Tableau 5 : Comparaison de la teneur en macroéléments (mg) pour 1 g d'AFA et de Spiruline**

Teneurs issues du site internet, « SynerJ Health » (19)

On remarque que les macroéléments sont présents en plus grande quantité dans la spiruline sauf le calcium ([tableau 5](#)).

## 2) [Les oligoéléments](#)

	Pour 100 g sec d'AFA (en mg)	Pour 100 g sec de Spiruline (en mg)	Doses à ne pas dépasser (en mg/kg/ jour)	Dose d'AFA à ne pas dépasser (en g/kg)	Signes et symptômes de toxicité
BORE	4,0	/	<b>0,2</b> (92) (93)	5,00	Térogène (92)
CHLORE	46,4	/	<b>0,03</b> (94)	0,06	Toxicité respiratoire (94)
CHROME	0,053	0,28	<b>0,003</b> (95)	5,66	Cancérogène, toxicité respiratoire (96)
COBALT	0,2	/	<b>0,01</b> (97)	5,00	Symptômes gastrointestinaux, cardiovasculaires, respiratoires, hépatiques et rénaux, cancérogène (97)
CUIVRE	0,4	1,2	<b>0,01</b> (98)	2,50	<u>Aigu</u> : Vomissements, diarrhées, lésions rénales aiguës, nécroses hépatiques, décès (96) <u>Chronique</u> : Troubles neurologiques, insuffisances rénales et cirrhose (96)
ETAIN	0,046	/	<b>0,3</b> (99)	652,17	Symptômes gastrointestinaux, convulsions, maux de tête, neurotoxique (99)
FER	35,1	150,0	<b>0,7</b> (100)	1,99	Symptômes gastrointestinaux, toxicité hépatique (100)



FLUOR	3,8	/	5,00 (101)	131,58	<u>Aigu</u> : symptômes gastrointestinaux, hypotension, arrêt cardiaque (101) <u>Chronique</u> : Fluorose dentaire et squelettique, toxicité rénale, neurotoxique, foetotoxique (101)
GERMANIUM	0,026	/	0,9 – 6,7 (102)	3461,54 – 25769,23	Toxicité rénale, symptômes gastrointestinaux (102)
IODE	0,053	/	0,01 (103)	18,86	Troubles thyroïdiens, toxicité hépatique (96)
MANGANESE	3,2	5,0	0,16 (104)	5,00	Symptômes neuropsychiatriques, signes de type Parkinson (96)
MOLYBDENE	0,333	/	0,06 (105)	18,02	Toxicité pulmonaire (105)
NICKEL	0,533	/	0,01 (106)	1,88	Dermatite allergique, cancer pulmonaire, génotoxique (106)
SELENIUM	0,067	/	0,005 (107)	7,46	Fragilité des cheveux et des ongles, neuropathie périphérique, éruption cutanée, fatigue et symptômes gastro-intestinaux (96)
SILICE	18,7	/	Non connu		
TITANE	2,3	/	Non connu		
VANADIUM	0,266	/	0,01 (108)	3,76	Symptômes gastro-intestinaux, toxicité respiratoire, génotoxicité, tératogène, perturbateurs endocriniens (108)
ZINC	1,8	3,0	0,3 (109)	16,67	<u>Aiguë</u> : Des fortes doses orales peuvent provoquer des douleurs abdominales, des vomissements et de la diarrhée (96) <u>Chronique</u> : Des doses orales élevées peuvent entraîner une faible teneur en cuivre en interférant avec l'absorption (96)
<b>TOTAL</b>	<b>117,277</b>	<b>159,48</b>			

**Tableau 6 : Comparaison de la teneur en oligoéléments (mg) pour 100 g d'AFA et de Spiruline**

Teneurs issues du site internet, « SynerJ Health » (19)

On constate dans le tableau 6 que la concentration en oligoéléments est plus importante chez la Spiruline. Par contre, cette cyanobactérie ne dénombre que cinq oligoéléments (fer, zinc, chrome, manganèse, cuivre) tandis qu'AFA en possède une riche diversité, soit dix-huit au total.

Selon ces valeurs, les concentrations toxiques de chaque oligoélément, sauf le chlore, ne seraient atteintes que pour l'ingestion de quantités importantes d'AFA.

Pour le chlore :

- **Adulte de 50 kg : Dose de chlore à ne pas dépasser : 1,5 mg/jour**  
=> **Dose d'AFA/jour correspondante = 3,0 g**
- **Adulte de 70 kg : Dose de chlore à ne pas dépasser : 2,1 mg/jour**  
⇒ **Dose d'AFA/jour correspondante = 4,2 g**

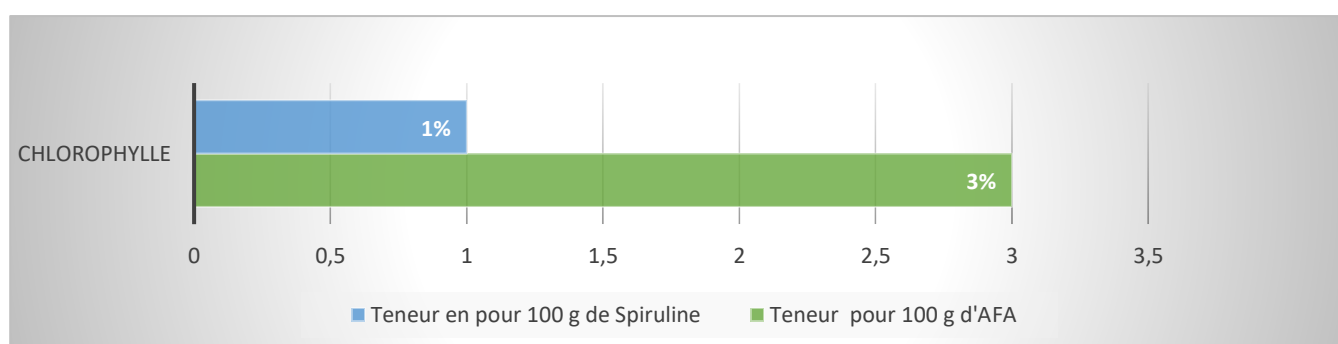
Les laboratoires commercialisant AFA conseillent une posologie d'un gramme par jour, cela est donc rassurant en termes d'utilisation d'AFA.

## E. Les pigments photosynthétiques

### 1) La Chlorophylle

La structure de la chlorophylle ressemble à celle de l'hème qui est un composant de l'hémoglobine intervenant dans le transport sanguin de l'oxygène. La différence majeure entre les deux structures se situe au niveau du noyau : la chlorophylle possède un noyau de magnésium tandis que l'hémoglobine possède un noyau de fer.

Ce pigment photosynthétique a un rôle anti-inflammatoire, antioxydant et antimutagène (110) (111).



**Figure 9 : Graphique comparant la teneur en % de la concentration en chlorophylle dans AFA et la Spiruline**

Teneurs issues du site internet, « SynerJ Health » (19)

Sur ce graphique (figure 9), on observe qu'AFA renferme une teneur en chlorophylle 3 fois plus élevée que la Spiruline, lui conférant une plus grande activité photosynthétique.

### 2) La phycocyanine : une protéine pigmentaire

Tout d'abord, la phycocyanine représente environ 15 % du poids sec d'AFA. Caractéristique des cyanobactéries, la phycocyanine tire son nom du grec avec « *phyco* » qui signifie algue et « *cyanine* » qui signifie cyan. C'est d'ailleurs par sa composition en phycocyanine qu'AFA a une couleur plus bleue. Dans la même famille pigmentaire, mais ayant un poids moléculaire plus faible, on retrouve la phycocyanobiline.

En fait, la phycocyanine est une association de protéines et de pigments participant, comme la chlorophylle, à la photosynthèse. Les protéines appartiennent à la famille des phycobiliprotéines et les pigments à la famille des phycobilines. Ces pigments « bilines » ont une structure très proche de la bilirubine présente dans le sang. La bilirubine est un pigment jaune orangé qui est le résultat de la dégradation

physiologique de l'hémoglobine dans la rate, après un cycle de vie de 120 jours. Cette dernière est ensuite transportée vers le foie puis excrétée vers le rein ainsi que vers le tube digestif.

Cette structure proche de la bilirubine semble suggérer que la phycocyanine possède des propriétés drainante et hépatoprotectrice, puisqu'elle permettrait de réduire l'hépatotoxicité causée par des produits chimiques (112).

La phycocyanine possède également des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires mais aussi anti-cancéreuses (113) (114).

## **F. Autres composés**

### 1) Glucides complexes

AFA contient de nombreux polysaccharides qui sont des glucides complexes formés par l'association de nombreux sucres. On retrouve du mannose, du rhamnose, du ribose, du galactose, du glucose, du fructose, du xylose et de l'arabinose.

### 2) Enzymes

AFA contient une superoxyde dismutase, puissante enzyme antioxydante qui intervient dans la neutralisation et l'élimination des radicaux libres responsables du vieillissement précoce des cellules. Cependant, lors de son ingestion par voie orale, elle sera digérée et ne pourra pas arriver jusqu'à nos cellules.

### 3) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une catégorie de polyphénols. Ils ont comme principales propriétés d'être antioxydants, veinotoniques et anti-inflammatoires.

## **G. AFA, une solution pour demain**

De nos jours, les nutriments présents dans l'alimentation issue de l'agriculture intensive ne sont plus suffisamment riches pour couvrir nos besoins journaliers.

Bien plus complète que la spiruline, cette cyanobactérie grâce à sa grande richesse contribue à apporter l'ensemble des nutriments utiles chaque jour. Par conséquent, l'*Aphanizomenon flos aquae* semble être le complément alimentaire idéal pour répondre à ce problème.

## VII. RAPPELS SUR LES CELLULES SOUCHES

### A. Généralités sur les cellules souches

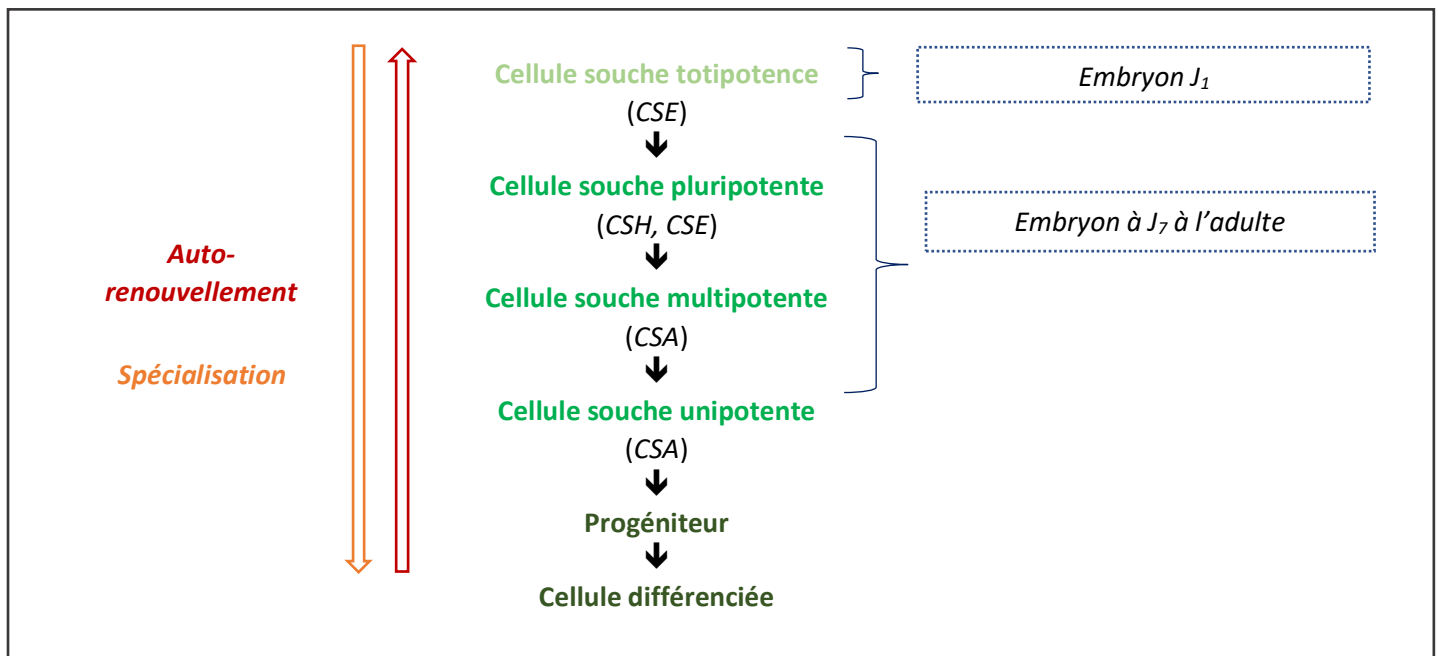
#### 1) Définition d'une cellule souche

Essentielles au développement et à la maintenance des organes et des tissus, les cellules souches sont des cellules indifférenciées, capables de s'autorenouveler, de se différencier et de proliférer. A elles seules, elles ont la capacité de générer tous les types cellulaires de notre organisme : globules rouges, globules blancs, cellules de peau, neurones etc...

Ces cellules ont la capacité de maintenir un état de quiescence : il s'agit d'une phase de dormance pendant laquelle elles possèdent une faible taille et une faible activité métabolique. Cet état leur confère une protection contre les agressions internes et externes pouvant les endommager.

#### 2) Types de cellules souches

L'être humain se compose de plus de 120 000 milliards de cellules, cellules appartenant à un type parmi les deux cents existants. Plus une cellule souche est différenciée plus sa capacité d'auto-renouvellement diminue (figure 10).



#### Légende :

- **CSA** : Cellules Souche Adulte
- **CSH** : Cellules Souche Hématopoïétique
- **CSE** : Cellules Souche Embryonnaire

Figure 10 : Propriétés des cellules souches

A partir d'un œuf issu de la fécondation, les cellules souches formeront un organisme entier. L'œuf subira de multiples divisions cellulaires durant lesquelles les cellules souches s'organiseront, se différencieront et s'engageront dans les différents feuilletts embryonnaires.

#### *a. Cellules souches totipotentes et pluripotentes*

Les cellules souches embryonnaires se retrouvent uniquement chez l'embryon le premier jour après la fécondation. Ces cellules sont dites totipotentes car elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires embryonnaires et extra-embryonnaires (placenta, cordon ombilical) ; et ont une capacité d'auto-renouvellement illimitée. A elles seules, elles peuvent donc engendrer un organisme entier.

Elles subissent ensuite une première différenciation et deviennent pluripotentes. Ces cellules peuvent générer les cellules des trois feuillets embryonnaires : endodermique (appareil digestif et respiratoire), mésodermique (appareil circulatoire, muscles, squelette, tissu conjonctif, organes génitaux) et ectodermique (système nerveux, peau, muqueuse, organes sensoriels).

Les cellules souches pluripotentes sont également à l'origine des cellules de la lignée germinale.

#### *b. Cellules souches adultes (CSA) : multipotente et unipotente*

##### **❖ Généralités**

Les cellules souches adultes sont soit multipotentes : elles peuvent donner plusieurs types cellulaires ; soit unipotentes : elles ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire. Ensuite, ces cellules souches unipotentes deviendront des cellules progénitrices et enfin des cellules différenciées.

Chaque jour, nous perdons des milliards de cellules, ce qui nécessite un processus de régénération permanent. Ce renouvellement est assuré par nos cellules souches adultes qui, tout au long de notre vie, remplaceront les cellules mortes par des nouvelles.

En vieillissant, la sollicitation de nos cellules souches ralentit ainsi que le remplacement de nos cellules détruites. Tout cela accélère le vieillissement tissulaire et limite la capacité de notre corps à se guérir. D'autres facteurs comme la sédentarité, le stress, les médicaments, les produits toxiques ou une mauvaise alimentation sont également responsables d'une baisse de la capacité de notre organisme à se renouveler. On arrive donc à un déclin de nos cellules plus important que leur renouvellement.

Par conséquent, il est alors primordial de trouver un moyen pour continuer à stimuler le rôle naturel de nos cellules souches afin de nous maintenir en bonne santé (115).

## ❖ Localisation

Pour soutenir cette fonction de renouvellement, il est nécessaire que tous nos organes et tissus possèdent des réservoirs de CSA. Ainsi, le foie possède des cellules souches pour fabriquer des hépatocytes, le cœur possède des cellules souches pour fabriquer des cardiomyocytes, la moelle osseuse possède des cellules souches pour fabriquer les trois lignées cellulaires sanguines etc... Toutes ces cellules baignent dans un microenvironnement spécifique, le stroma, produisant des cytokines responsables du contrôle de leur développement et de leur renouvellement.

Même si leur capacité de différenciation diminue en fonction de leur spécialisation, on estime que les CSA sont capables de donner au moins un type cellulaire (unipotence) et même plusieurs (multipotence) et de s'auto-renouveler afin de pouvoir soutenir l'organe dans laquelle elles résident.

Certains organes comme le cerveau, le cœur ou les reins, se renouvellent peu tandis qu'à l'inverse la moelle osseuse, la peau ou l'intestin sont en constante régénération. Chaque organe se régénère à des rythmes différents et plus le renouvellement est rapide et plus le besoin en CSA est important.

## **B. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse**

### 1) Particularité des CSH

Une grande quantité de cellules souches, marquées  $CD34^+$  et  $CD38^-$ , sont localisées dans la moelle osseuse. Leur particularité est d'être pluripotentes, à l'inverse des CSA.

Sous l'action de certains facteurs environnementaux et chimiques, ces cellules peuvent quitter leurs niches hématopoïétiques et se retrouver dans la circulation sanguine dans le but de migrer vers un tissu endommagé. Une fois le tissu atteint, ces dernières pourront ensuite se différencier et se transformer en cellules spécifiques de celui-ci pour renforcer sa régénération. Bien que chaque organe possède ses propres cellules souches, en fonction des dommages, une mobilisation importante et rapide de cellules souches peut être nécessaire.

Pour effectuer leur migration, les CSH doivent dans un premier temps être capable de se détacher de leur milieu environnant. Le rôle de la niche étant principalement l'ancrage, un certain nombre de molécules d'adhésion sont présentes pour les maintenir dans leurs microenvironnements. Par exemple, on retrouve la sélectine-L, glycoprotéine appartenant à la famille des lectines.

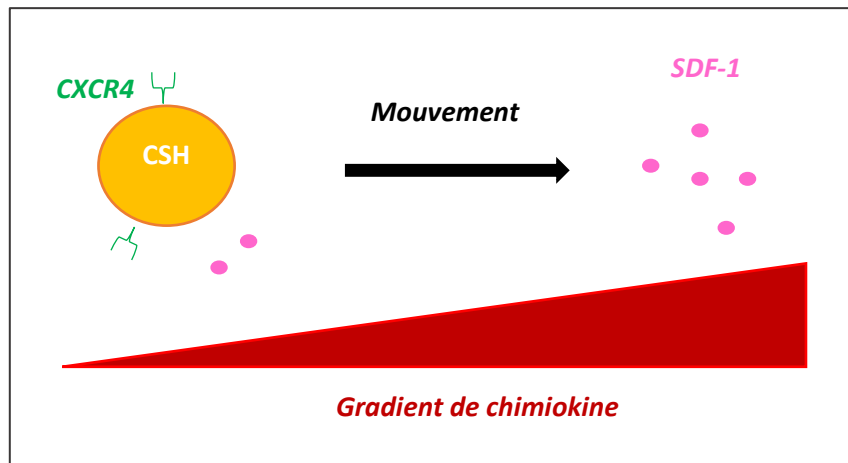
Puis, une fois libérées, les CSA adhéreront à la surface de l'endothélium vasculaire afin de ne pas être entraînées dans le flux sanguin. Ce mécanisme, appelé « rolling », a été décrit pour la première fois grâce à l'étude de la migration des lymphocytes.

Enfin, par l'intermédiaire de messagers chimiques, les CSH gagneront le tissu endommagé.

## 2) Les chimiokines

Les chimiokines sont des protéines qui ont la capacité d'induire la mobilisation des cellules souches. Lorsqu'une cellule exprime un récepteur pour une chimiokine, elle est capable de migrer en fonction du gradient où cette chimiokine est la plus élevée. Ce mécanisme est appelé « homing ».

On peut citer comme exemple le récepteur CXCR4 interagissant avec la chimiokine CXCL-12 ou SDF-1 (stroma derived factor-1).



**Figure 11 :** Schéma représentant la mobilisation des CSH en fonction du gradient de chimiokine

SDF-1 est synthétisé par les ostéoblastes de la moelle osseuse, permettant ainsi le maintien des CSH à cet emplacement. Mais, cette chimiokine peut aussi être synthétisée par les cellules de l'endothélium et être surexprimée par un tissu en cas d'inflammation. Par conséquent, la CSH migrera où le gradient de cette chimiokine sera le plus élevé, ce qui sera alors responsable de sa mobilisation (figure 11).

## 3) Conclusion

Le corps possède donc un mécanisme inné de régénération où toute blessure ou dérèglement interne peut être perçu par les CSH de la moelle osseuse. Elles assureront un système de maintenance et de réparation constant au sein de notre organisme.

## C. Rôle d'AFA dans la stimulation et de la mobilisation des CSH

L'étude des cellules souches est actuellement un sujet très populaire dans le domaine de la médecine. Leur découverte a provoqué une véritable révolution : véritables pépites d'or, ces cellules ont permis d'incroyables avancées médicales et ont amélioré le traitement de beaucoup de pathologies. Chaque jour, ne cessant d'émerveiller, elles continuent de livrer leurs secrets aux scientifiques du monde entier. Cependant, les cellules souches utilisées aujourd'hui sont des cellules souches embryonnaires, ce qui pose un véritable problème éthique. Par ailleurs, leur coût et leur réglementation pointilleuse sont également un frein à leur utilisation. Ainsi, les scientifiques cherchent d'autres solutions pour continuer de les exploiter le mieux possible.

La solution pourrait-elle être *Aphanizomenon flos aquae* ? En effet, certaines recherches préliminaires publiées dans des livres ont montré que cette cyanobactérie avait la capacité de stimuler et mobiliser les CSH de la moelle osseuse (8) (18) (10) (115).

VIII. PROPRIETES THERAPEUTIQUES D'APHANIZOMENON FLOS AQUAE

Depuis quelques décennies, les chercheurs s'intéressent aux différentes propriétés d'Aphanizomenon flos aquae. Grâce aux témoignages de consommateurs, des études scientifiques furent menées afin de vérifier son efficacité thérapeutique. Ainsi, les différents effets possibles d'AFA n'ont pas été découverts dans un laboratoire scientifique mais grâce à l'expérience de nombreuses personnes qui la consomment.

Le docteur Cousens constata qu'AFA aidait à la guérison de nombreuses pathologies comme : la dépression, le diabète, la fatigue chronique, l'anémie, les ulcères, les hépatites ... Tous les patients, grâce à AFA, ont obtenu une aide précieuse dans le soutien de leur maladie. Ainsi, AFA permettrait de guérir tout un ensemble de maladies allant des plus courantes au plus complexes (8) (18) (10).

A. Maintien de l'équilibre acido-basique

Lorsque nous consommons des aliments, ces derniers entraînent une variation du pH sanguin, habituellement neutre (compris entre 7,35 et 7,45), vers l'acidité ou la basicité. L'effet acidifiant ou alcalinisant d'un aliment sur l'organisme est défini selon l'indice PRAL (Potential Renal Acid Load). Cet indice permet d'indiquer la charge acide potentielle d'un aliment au niveau rénal (figure 12).

Cette charge est mesurée dans les urines et son unité est le milliéquivalent (mEq) (116).

Food	PRAL* (mEq)	
Fats and oils	0	
Fish	7.9	
Fruits and fruit juices	-3.1	
Grain products	3.5-7.0	Au-dessus de 0 : aliment acidifiant
Meat and meat products	9.5	Au-dessous de 0 : aliment basifiant
Milk and dairy products	1.0-23.6	Egal à 0 : neutre
Vegetables	-2.8	

Figure 12 : Charge acide rénale potentielle d'un aliment (116)

La somme de l'ensemble de ces charges est ensuite neutralisée par le système tampon de l'organisme. Toutefois, il arrive que ce système soit dépassé face à des quantités trop importantes de substances acides sanguines qui viendront s'accumuler dans les tissus.

Au fil du temps, si ce déséquilibre persiste, cela pourra engendrer une acidose métabolique chronique. C'est à ce moment-là qu'on parle de « terrain acide » propice à l'installation de pathologies telles que la fatigue chronique, la dépression, les douleurs articulaires et musculaires, les problèmes de peau... Pour corriger ce déséquilibre acide chronique, notre corps viendra puiser dans ses réserves alcalines pour reconstituer le système tampon. La plupart du temps, on observera une déminéralisation osseuse car l'os est un endroit stratégique de mise en réserve de deux minéraux : le calcium et le magnésium, ions clés dans la désacidification de l'organisme (117).

Si l'apport d'aliments basifiants est supérieur à l'apport d'aliments acidifiants alors ces bases alimentaires serviront à neutraliser l'acidité du sang sans que le système tampon n'ait besoin d'intervenir.



En situation de stress, l'organisme synthétise de l'adrénaline, un neurotransmetteur qui contribue à augmenter la production du glucose hépatique. Ce glucose sera ensuite dégradé, soit par la voie aérobie en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) puis en ion H<sup>+</sup>, soit par la voie anaérobie en acide lactique. Les ions H<sup>+</sup> et les acides lactiques produits par cette augmentation du métabolisme du glucose participeront alors eux-aussi à une acidification des tissus.

Concernant la cyanobactérie, à ce jour aucune étude n'a été faite sur cette potentielle propriété de « désacidification » de notre organisme. Néanmoins, par sa richesse nutritive, et notamment grâce à la présence de glutamine, de calcium et de magnésium, AFA pourra surement jouer un rôle dans le maintien optimal de l'équilibre acido-basique de l'organisme et par conséquent dans la conservation d'un terrain « sain ». Néanmoins, la quantité d'AFA a ingérée pour avoir réellement un impact sur cet équilibre reste à déterminer.

## **B. Effet antibactérien**

De nombreuses infections et maladies sont provoquées par des bactéries dont la plupart sont commensales à notre organisme. La raison du passage de ces bactéries à l'état de pathogène peut s'expliquer par une hausse anormalement élevée de leur nombre, une colonisation sur des sites où elles ne devraient pas être présentes ou une faiblesse du système immunitaire de l'individu. Face à l'émergence des résistances aux antibiotiques, il est nécessaire de chercher d'autres alternatives à ces médicaments.

En 1998, le professeur Ostenvik réalisa une étude au cours de laquelle, lui et son équipe, ont testé différents essais biologiques pour observer et quantifier une possible activité antibactérienne de cinq extraits de cyanobactéries. Parmi elles se trouvaient *Aphanizomenon flos aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Tychonema bourrellyi*, *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena lemmermannii* (118).

L'activité antibactérienne d'une cyanobactérie peut être portée par la production de métabolites secondaires, composés chimiques assurant des fonctions non vitales pour l'organisme. De ce fait, leur absence n'est pas létale, contrairement aux métabolites primaires qui permettent d'assurer la croissance et la reproduction d'un organisme. Souvent spécifiques d'une espèce et de structure complexe, on retrouve comme métabolites secondaires : les alcaloïdes, les flavonoïdes et les terpénoïdes. Ces composés phytochimiques peuvent jouer un rôle de défense ou encore établir des échanges entre la cyanobactérie et son environnement.

L'équipe de recherche du professeur Ostenvik prépara deux extraits différents à partir de chaque cyanobactérie étudiée : un extrait aqueux permettant d'étudier les métabolites hydrophiles et un extrait méthanolique permettant d'étudier les métabolites hydrophobes. Ensuite, ces préparations furent déposées sur des géloses et furent mises au contact avec différentes bactéries afin de mesurer leur activité antibactérienne. Cette activité fut représentée par le diamètre d'inhibition de la croissance des bactéries autour de la zone de dépôt de l'extrait.

Les résultats obtenus sont reportés dans les deux tableaux ci-dessous.

Les extraits aqueux furent préparés en mettant en suspension 50 mg de cyanobactérie dans 3 mL d'eau distillée. Puis ils furent broyés et centrifugés et 100 µL de surnageant fut prélevés et placés sur une gélose.

	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> à pH = 7,9	<i>Bacillus subtilis</i> à pH = 5,85	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b><u>Extraits aqueux</u></b>						
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Tychonema bourrellyi</i>	0	0	6 - 10 mm	6 - 10 mm	0	0
<i>Anabaena lemmermannii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0	1 - 5 mm	6 - 10 mm	6 - 10 mm	0	0
<i>Aphanizomenon flos aquae</i>	0	0	0	0	1 - 5 mm	0

**Tableau 7 : Extraits aqueux de cyanobactéries permettant d'étudier l'effet de leurs métabolites hydrophiles sur la croissance de quatre bactéries**

Les extraits méthanoliques furent préparés à partir du surnageant des extraits aqueux auxquels il fut ajouté 3 mL de méthanol et 100 µL d'acide acétique. Les échantillons furent centrifugés et 100 µL de surnageant, pour chaque extrait, furent prélevés. Une évaporation suivit et les résidus secs obtenus furent remis en solution dans 1 mL de méthanol et 3,75 mg de cyanobactérie. Ensuite, le mélange obtenu fut déposé sur des disques filtrants pour éliminer le méthanol.

	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> à pH = 7,9	<i>Bacillus subtilis</i> à pH = 5,85	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b><u>Extraits méthanoliques</u></b>						
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	0	0	11 - 20 mm	11 - 20 mm	11 - 20 mm	0
<i>Tychonema bourrellyi</i>	0	0	11 - 20 mm	11 - 20 mm	21 - 30 mm	1 - 5 mm
<i>Anabaena lemmermannii</i>	0	0	1 - 5 mm	1 - 5 mm	6 - 10 mm	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0	0	6 - 10 mm	6 - 10 mm	6 - 10 mm	0
<i>Aphanizomenon flos aquae</i>	0	1 - 5 mm	11 - 20 mm	11 - 20 mm	11 - 20 mm	6-10 mm

**Tableau 8 : Extraits méthanoliques de cyanobactéries permettant d'étudier l'effet de leurs métabolites hydrophobes sur la croissance de quatre bactéries**

Les résultats montrèrent que les métabolites secondaires hydrophobes d'AFA avaient inhibé la croissance bactérienne, sur une distance d'au moins 6 mm, pour quatre des bacilles testés : *Bacillus subtilis* à pH 5,85, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* et *Escherichia coli* (tableau 8).

Concernant, les métabolites hydrosolubles d'AFA, on remarqua uniquement une faible inhibition de la croissance du bacille *Aeromonas hydrophila*, inhibition bien moindre en comparaison de celle provoquée par les métabolites hydrophobes (tableau 7). Par contre, ni AFA ni les autres cyanobactéries testées ne furent capables d'inhiber la croissance de la cinquième bactérie, qui fut la seule à être une bactérie sphérique aussi appelée une « coque ». Les autres sont des bactéries allongées ou plus communément appelées des « bacilles ».

Ainsi, il est possible que les métabolites secondaires impliqués dans cette activité antibactérienne exercent une action uniquement sur les bacilles. Il faudrait, d'une part vérifier quels sont les métabolites secondaires impliqués, et d'autre part identifier le mécanisme mis en jeu. Autre point important, il semble que pour toutes les cyanobactéries testées, la valeur du pH du milieu de croissance a montré une influence importante sur l'activité antibactérienne. Il semblerait que celle-ci soit dépendante d'un pH acide. En effet, comme nous le montre le tableau n°1, l'extrait méthanolique d'AFA a inhibé la croissance bactérienne de *Bacillus subtilis* à pH 5,85, sur une distance entre 11 et 20 mm, tandis que l'inhibition de la croissance bactérienne de ce bacille à pH 7,9 était inférieure à 6 mm.

En conclusion, cette étude suppose l'existence d'une activité antibactérienne, et plus précisément bactériostatique, d'*Aphanizomenon flos aquae* mais cette observation fut réalisée sur un unique essai et ne permet pas de conclure à un effet statistiquement significatif. Par ailleurs, cette étude n'est pas suffisante pour juger de la pertinence de l'utilisation d'AFA dans la prévention ou dans le traitement d'infections bactériennes chez l'Homme. En effet, aucune activité bactéricide n'a été montrée au cours de cette étude et les bactéries dont la croissance a été inhibée par l'extrait méthanolique ne sont pas des pathogènes majeurs. Des études supplémentaires analysant le pouvoir antibactérien d'AFA sur des bactéries plus fréquemment retrouvées lors de pathologies devront donc être réalisées avant que son utilisation ne puisse être recommandée. Le pH optimal à cette activité antibactérienne devra également être déterminé afin qu'une technique de conservation et d'administration adaptée soit mise au point. À ma connaissance, aucune étude de ce type n'a été réalisée à ce jour.

## C. Effet sur le système immunitaire

Le corps humain est doté d'un système de défense très performant : le maintien de sa bonne activité permet de préserver notre capital santé.

Il existe différents types de cellules de défense aux fonctions immunitaires spécifiques. Toutes ces cellules ont pour rôle de défendre l'organisme contre des pathogènes exogènes : virus, bactéries, parasites, champignons, mais aussi contre certaines de nos cellules notamment lors du processus de cancérisation. Présentes à l'origine dans le sang, elles ont la capacité de migrer dans les tissus infectés grâce au guidage de messagers chimiques et de molécules d'adhérence. Leur trafic vers les sites d'infection est donc une étape clé du bon fonctionnement du système immunitaire.

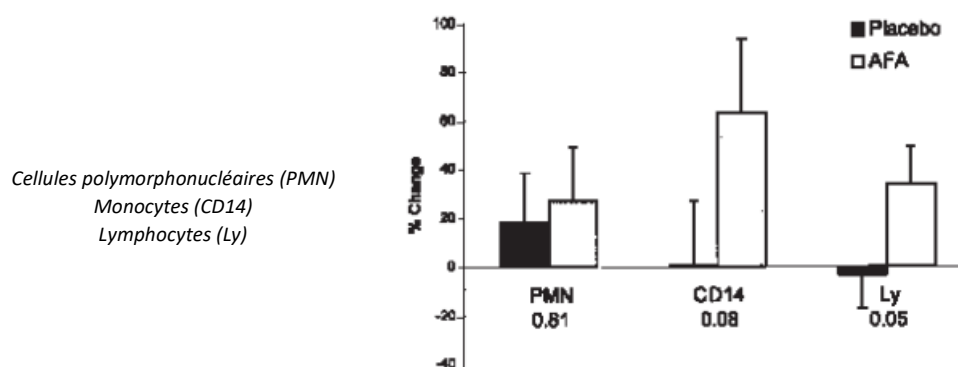
En 2000, une étude, menée par les professeurs Gitte S. Jensen et Christian Drapeau, tente de démontrer les effets à court terme d'une consommation modérée d'AFA, provenant du lac Klamath, sur le système immunitaire. Elle a été réalisée chez vingt et un volontaires sains : cinq consommant AFA depuis longtemps, deux en consommant occasionnellement et quatorze autres naïfs de la cyanobactérie. Aucun des volontaires choisis n'était atteint de pathologie chronique. (119) (120)

Il s'agit, ici, d'une étude randomisée en double aveugle, une partie des volontaires avait reçu un placebo et une autre avait reçu 1,5 grammes d'AFA en prise unique. Tous les sujets consommant AFA ont stoppé leur prise au moins vingt-quatre heures avant le début de l'étude. Le test a été réalisé le matin car des études ont montré l'influence du rythme circadien sur le nombre et sur l'activité des cellules circulantes, notamment les cellules NK (121).

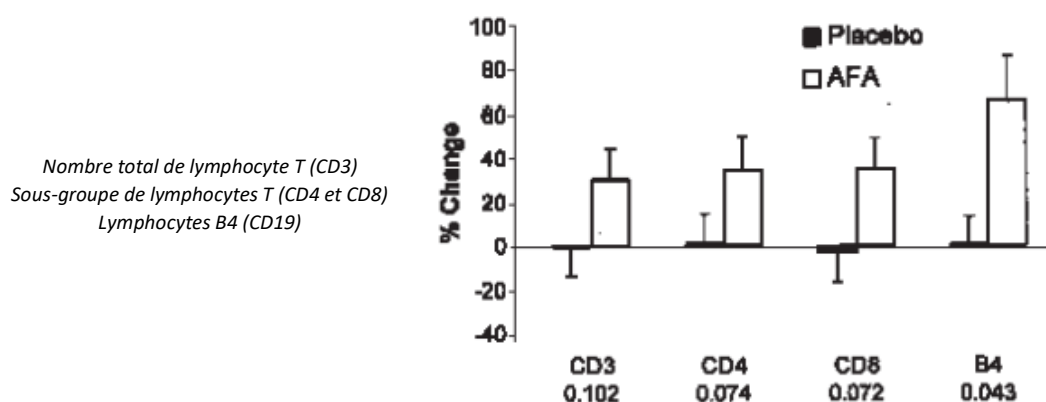
Chaque volontaire a été étudié sur deux jours pendant lesquels celui-ci a consommé les mêmes petits déjeuners aux mêmes horaires en s'abstenant de toute préparation vitaminique au minimum douze heures avant l'étude. De plus, une abstinence d'exercice physique de quarante-cinq minutes avant le début de l'essai devait être respectée pour ne pas fausser la proportion de leucocytes circulants. En effet, la pratique sportive, tout comme le stress, contribue à la libération de cortisol, une hormone anti-inflammatoire. (122)

Puis, deux prélèvements sanguins furent effectués pour chacun des volontaires : un avant la prise d'AFA et un autre deux heures après. Ces échantillons ont ensuite été centrifugés afin de séparer les cellules mononucléaires du sang périphérique. Les cellules furent dénombrées par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de chaque lignée cellulaire marqués d'un fluorophore.

### ❖ Nombre de leucocytes circulants



**Figure 13 :** Histogramme représentant les changements induits par la prise d'AFA sur le nombre de leucocytes sanguins



**Figure 14 :** Histogramme représentant les changements induits par la prise d'AFA sur le nombre de la sous-populations de lymphocytes

D'après ces deux histogrammes (figure 13 et 14), on remarque qu'une consommation d'AFA en prise unique entraîne une augmentation significative du nombre de lymphocytes et de monocytes circulants dans le sang en comparaison au placebo. ( $p > 0,05$ ). Au contraire, les résultats obtenus sur le pourcentage de cellules polymorphonucléaires n'est pas significatif ici.

Concernant les sous-populations de lymphocytes, on remarque une augmentation significative des lymphocytes B alors que l'augmentation observée pour les lymphocytes TCD4/TCD8 n'est pas significative.

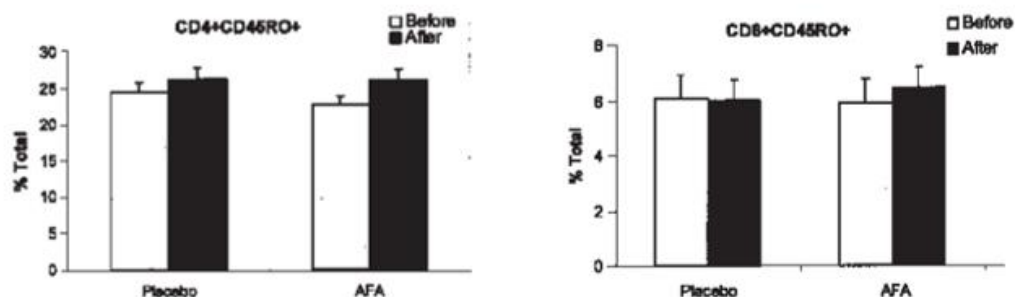
A ce stade, l'effet d'AFA semble limité à une mobilisation préférentielle des lymphocytes B et des monocytes en provenance des tissus lymphoïdes primaires ou secondaires vers la circulation sanguine.

Toutefois, les résultats obtenus ne séparent pas les personnes consommant AFA depuis longtemps, occasionnellement ou naïves de cette cyanobactérie. Il serait donc judicieux de refaire cet essai d'une part, en séparant les différents groupes et, d'autre part, sur un échantillon de volontaires plus grand afin de pouvoir affirmer que la cyanobactérie est bien impliquée dans la mobilisation des lymphocytes et des monocytes.

Sachant qu'AFA a été ingérée par voie orale et que son effet a été retrouvé au niveau sanguin, il est important pour la compréhension de son activité d'identifier les molécules de signalisation qui ont permis aux cellules immunitaires de rejoindre le sang. Les cellules immunitaires répondant à des signaux spécifiques de leur type cellulaire, il est possible que plusieurs molécules soient mises en jeu dans cette mobilisation.

### ❖ Activation lymphocytaire

Afin d'élargir leur étude, ces deux chercheurs ont également étudié si l'AFA était capable d'activer les lymphocytes *in vitro*.



**Figure 15 :** Histogramme représentant les lymphocytes TCD4/TCD8 naïfs (en blanc) et les lymphocytes TCD4/TCD8 mémoires (en noirs)

Sur ces histogrammes (figure 15), on ne remarqua aucune différence significative entre la proportion de lymphocytes T naïfs et la population de lymphocytes T mémoires et ce dans les deux sous-populations CD4 et CD8.

L'essai ne démontra donc aucun effet d'AFA sur l'activation lymphocytaire, ce qui est rassurant quant à la sécurité de son utilisation car elle n'entraîne pas de suractivation du système immunitaire. En effet, une trop forte augmentation de son activité augmenterait les processus inflammatoires et le nombre de complexes immuns circulants, ce qui pourrait être délétère pour notre santé.

Par conséquent, une prise unique d'AFA se traduit uniquement par une augmentation du trafic des cellules immunitaires. Cela résulte donc en une meilleure surveillance, sans pour autant activer de manière directe nos cellules de défense.

### Action sur les cellules NK

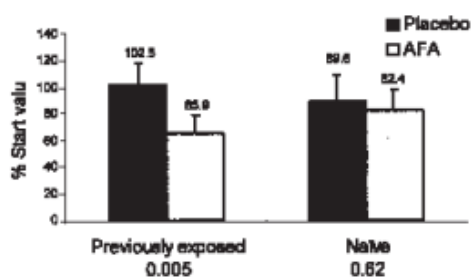
Les cellules NK, cellules tueuses naturelles, sont des cellules qui interviennent en première ligne de défense. Ces cellules sont aussi bien présentes dans le sang que dans nos tissus (poumons, foie).

Ces cellules de l'immunité innée sont capables d'éliminer, de manière sélective, des cellules tumorales ou infectées par des virus grâce à la sécrétion de cytokines. Ces médiateurs engendrent une destruction programmée par apoptose de la cellule infectée ou cancéreuse ; et ce tout en préservant les cellules saines voisines.

Par ailleurs, ces cellules de l'immunité innée sont aussi capables d'orienter les réponses de nos autres cellules comme les lymphocytes B et T.

### ❖ Diminution des cellules NK sanguines

Ici, les chercheurs se sont intéressés à quantifier les cellules NK dans le sang : toute diminution montre qu'il y a eu un passage de ces cellules du sang vers les tissus.



**Figure 16 :** Histogramme représentant les variations en % des cellules tueuses naturelles (NK) dans le sang chez des sujets naïfs d'AFA ou préalablement exposés au long terme

Pour les volontaires n'ayant jamais consommés AFA, on n'observe aucune différence significative sur la concentration des cellules NK dans le sang entre la prise unique d'AFA et la prise du placebo. Au contraire, pour les volontaires ayant déjà consommé antérieurement AFA, on s'aperçoit une diminution significative de 40 % des cellules NK dans le sang (figure 16).

En conclusion, ces résultats semblent montrer qu'une prise unique d'AFA par voie orale ne suffit pas à entraîner un passage des cellules NK du sang vers les tissus. Une prise d'AFA quotidienne et régulière est donc nécessaire pour observer un effet sur la mobilisation des cellules NK.

Pour exercer leur action infectieuse, les virus gagnent les tissus soit directement soit après leur passage dans le sang. L'augmentation du passage dans les tissus des cellules NK laisse donc supposer qu'il y ait un renforcement du système de défense antiviral au niveau tissulaire. De plus, ayant également un rôle dans le repérage des cellules anormales, cette migration tissulaire permettrait de réduire la survenue de cancer par un système de détection précoce.

Toutefois, là encore, aucune distinction entre les personnes en consommant depuis longtemps ou occasionnellement n'a été faite. Ainsi, il faudrait étudier la durée de prise nécessaire pour observer cet effet, et également le temps nécessaire pour que cet effet soit maximal.

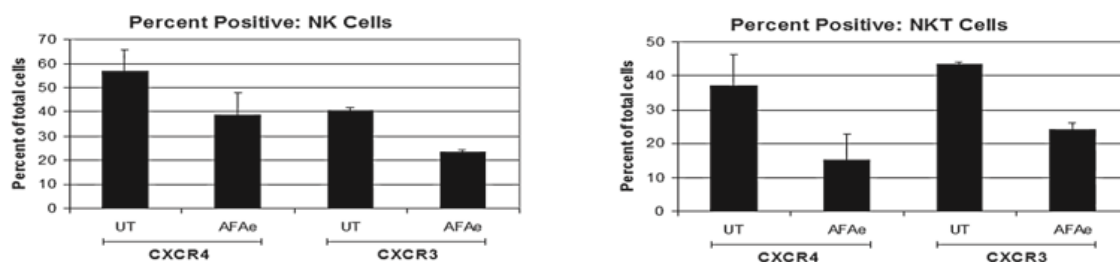
Enfin, aucune donnée ne précise dans quels tissus la migration des cellules tueuses s'est faite. Il faudrait donc réaliser une expérience complémentaire pour identifier vers quels sites les cellules NK ont migré afin de savoir si elles ont des sites préférentiels ou non.

### ❖ Régulation des récepteurs aux chimiokines

La localisation et la migration des cellules NK dans l'organisme est régulée très finement par l'expression de différents récepteurs de chimiokines. Cependant, l'influence précise de tous ces récepteurs n'est pas bien connue actuellement (123) (124) (125).

Ici, cette étude a tenté de se concentrer sur l'expression des récepteurs CXCR3 et CXCR4 qui promeuvent la migration des cellules NK : vers les sites inflammatoires pour le récepteur CXCR3 et vers la moelle osseuse et la rate pour le récepteur CXCR4. L'effet d'AFA sur l'expression des récepteurs CXCR3 et CXCR4, a été évalué par immunomarquage et cytométrie de flux.

Dans cet essai *in vitro*, des cultures de cellules mononuclées furent exposées pendant trente-minutes à un extrait d'AFA. Les cultures non traitées (UT : « Un-Treated ») ont servi de contrôle. Pour information, les cellules NKT sont un groupe hétérogène de lymphocytes T possédant à la fois des marqueurs des lymphocytes T et des lymphocytes NK. Une fois activées, ces cellules sont capables de produire de grandes quantités de cytokines (IL<sub>2</sub>, TNF) et de chimiokines.



**Figure 17 :** Expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CXCR4 pour les cellules NK et les cellules NKT

Les résultats ci-dessus (figure 17) indiquent que la présence d'AFA permet de réduire l'expression des récepteurs CXCR3 et CXCR4 aussi bien sur les cellules NK que les cellules NKT. Ainsi, AFA diminue la direction de ces cellules vers les sites inflammatoires et la moelle osseuse.

Cette modification du profil d'expression des récepteurs aux chimiokines peut suggérer qu'AFA augmente la sensibilité des cellules NK aux chimiokines, autres que celles se fixant à CXCR3 et CXCR4.

Ainsi, les cellules NK peuvent être dirigées dans d'autres tissus de l'organisme et auront alors un rôle de surveillance principalement.

## ❖ Activation des cellules NK

### • Rôle des cellules mononuclées

Suite à cela, il a été étudié si un extrait d'AFA seul était capable d'activer directement les cellules NK. Afin d'exclure le rôle des autres cellules mononuclées, une expérience fut réalisée où l'intensité de l'expression du récepteur CD69, marqueur de l'activation des cellules NK, avait été mesurée par fluorescence (120).

Pour cet essai, des cellules NK, mises en contact avec un extrait éthanolique d'AFA pendant 18 heures, furent comparées à des cellules non traitées (contrôle négatif), et ce pour des cellules NK mélangées aux autres cellules sanguines mononuclées ou isolées.

<u>Incubation</u>	<b>NK et cellules mononuclées sanguines *</b> ( <i>lymphocytes, monocytes</i> )	<b>NK *</b>
<b>Contrôle négatif sans AFA</b>	5,18 ± 1,13	2,14 ± 0,07
<b>En présence d'un extrait d'AFA</b>	<b>8,37 ± 0,52</b>	2,70 ± 0,08

**Tableau 9 :** Rôles des cellules mononuclées et d'AFA dans l'activation des cellules NK

\*Résultat en intensité de fluorescence



On observe sur le tableau 9 une augmentation significative de l'activation des cellules NK en présence des cellules mononuclées sanguines. De plus, on remarque que cette activité est renforcée lorsque ces cellules sont en présence avec AFA. Ainsi, une interaction existerait entre ces cellules mononuclées et la cyanobactérie AFA dans l'activation des cellules tueuses.

En fait, le marqueur CD69 est exprimé en temps normal après activation des cellules NK en réponse à une interleukine, IL-2. Cette interleukine est sécrétée par les cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes), cela expliquerait que les cellules NK sont davantage activées en leur présence.

- Rôle de l'interleukines 2

Pour confirmer l'hypothèse que l'IL-2, générée par les cellules mononuclées, augmente l'activation des cellules NK, une autre expérience a ensuite été réalisée. (120)

	Intensité d'expression de CD69 *
<b>Contrôle négatif</b>	2,91 ± 0,11
<b>AFA</b>	10,16 ± 0,39
<b>AFA + IL-2</b>	<b>27,63 ± 1,76</b> ( <i>p</i> < 0,05)
<b>IL-2</b>	17,18 ± 0,17

Tableau 10 : Augmentation de l'activité des cellules NK en présence d'AFA et IL-2

\*Résultat en intensité de fluorescence

Selon les résultats du tableau 10, on observe une intensité de l'expression de CD69 significativement plus importante dans le cadre de l'association d'un extrait d'AFA et d'IL-2 que lors de l'utilisation de chaque substance isolément. Cela montre donc une synergie d'action entre ces deux composés.

Bien que le mécanisme d'action d'AFA ne soit pas encore connu, la synergie découverte est très intéressante car elle sous-entend que l'IL-2, sécrétée en cas d'infection, pourrait collaborer avec AFA pour activer les cellules NK. L'activation étant renforcée, les cellules NK pourraient donc mieux combattre les pathogènes.

- Rôle des composants d'AFA

Afin d'identifier les composants d'AFA responsables de l'activation des cellules NK, les chercheurs ont ensuite réalisé une électrophorèse. Trois échantillons couplés avec des cellules mononuclées sanguines furent alors examinés : AFA brut, polysaccharides d'AFA de haut poids moléculaire et peptides d'AFA de bas poids moléculaire. Les résultats montrèrent une activation significative plus importante pour l'échantillon de bas poids moléculaire. Ceux-ci posséderaient la plus puissante capacité d'activation des cellules NK.

Une autre étude, quant à elle, identifia un polysaccharide de haut poids moléculaire d'AFA impliqué dans l'activation des monocytes et des macrophages humains. Ce polysaccharide porte le nom d'Immunon et représente entre 0,5 et 2 % du poids sec d'AFA (126).

Par conséquent, même si des études plus approfondies sont souhaitables, les chercheurs ont réussi à démontrer qu'AFA possédait des propriétés immunostimulantes. Cette cyanobactérie a donc un possible rôle à jouer dans l'arsenal thérapeutique de l'immunothérapie pour accompagner les patients atteints de cancers ou de maladies infectieuses.

### **Conclusion de l'étude des professeurs Gitte S. Jensen et Christian Drapeau**

Au cours de cette étude, il a été examiné plusieurs aspects de la migration, de l'activation et du fonctionnement des cellules immunitaires. Les données présentées dans cette étude, bien que certaines soient significatives, devront être réévaluées en raison d'un échantillon trop faible de volontaires et une durée trop courte de l'essai. De plus, il serait intéressant de réaliser ces tests à différents moments de la journée pour confronter le rythme circadien à l'effet d'AFA.

Néanmoins, on peut à l'heure actuelle, affirmer qu'AFA renforce l'immunosurveillance et possède également des propriétés immunostimulantes très intéressantes. Par ailleurs, au sein de cette cyanobactérie on retrouve de nombreux composants ayant une action sur le système immunitaire, comme des acides aminés (glycine, lysine, histidine, glutamine, alanine, sérine, tryptophane, arginine, méthionine), des vitamines (A, B<sub>6</sub>, C), des glucides complexes ou encore de la chlorophylle dont l'implication dans les résultats précédents devra également être étudiée. Ainsi, ce nouveau complément alimentaire semble être une piste de recherche prometteuse car son utilisation pourrait s'étendre à bon nombre de maladies.

Certaines plantes comme l'échinacée pourpre ou le ginseng qui ont aussi la propriété de stimuler les cellules du système immunitaire, comme les cellules NK. Mais aucun de ces végétaux n'a pu mettre en évidence un rôle sur la migration des cellules NK vers les tissus, ce qui confère à AFA un réel intérêt complémentaire (127) (128).

## **D. Effet anti-inflammatoire**

L'inflammation est une réponse des tissus vivants vascularisés à une agression. Elle se caractérise par quatre symptômes qui sont la rougeur, la chaleur, la douleur et la tuméfaction.

L'inflammation est une réaction bénéfique à l'organisme lui permettant de se défendre de façon ponctuelle contre un élément étranger. On parle alors de réaction inflammatoire aiguë. Toutefois, il arrive que celle-ci s'installe de façon chronique et devienne alors néfaste pour notre corps puisqu'elle échappe au contrôle du système immunitaire.

Une réaction inflammatoire peut survenir suite à une infection par un microorganisme ou bien provenir d'une source alimentaire. Par exemple, les aliments riches en  $\omega$ -6 contiennent des quantités importantes d'acide arachidonique, acteur majeur de l'activation de la cascade inflammatoire.

### **1) La phycocyanine**

La phycocyanine est un complexe pigment-protéine retrouvé dans toutes les cyanobactéries bleu-vert de la classe des Cyanophycées. Connue pour son incroyable activité antioxydante, elle suscite la curiosité des chercheurs en raison de ses possibles effets anti-inflammatoires.

L'inflammation est un processus complexe responsable d'une cascade d'événements où divers médiateurs sont synthétisés et libérés comme : l'histamine, la sérotonine, les cytokines pro-inflammatoires, l'oxyde nitrique (NO), les produits dérivés de la cyclooxygénase (COX) et les amines sympathomimétiques.

En 2009, une étude menée par le docteur Shih *et al.* montra les effets de la phycocyanine, contenue dans la Spiruline, dans l'inflammation aigüe et la nociception chez des rats suite à l'administration de carraghénane, molécule induisant des nécroses tissulaires (129).

Au cours de cette expérience cinq groupes de six rats ont été composés :

<b>Groupe « Contrôle »</b>	Traitement par solution saline <u>sans</u> injection de carraghénane
<b>Groupe « Ibuprofène »</b>	Traitement par Ibuprofène 50 mg/kg, 30 minutes avant l'injection de carraghénane
<b>Groupe « carraghénane »</b>	Traitement par solution saline Soit 30 minutes avant l'injection de carraghénane Ou soit 75 minutes après l'injection de carraghénane
<b>Groupe « 30 mg/kg »</b>	Traitement par phycocyanine 30 mg/kg Soit 30 minutes avant l'injection de carraghénane Ou soit 75 minutes après l'injection de carraghénane
<b>Groupe « 50 mg/kg »</b>	Traitement par phycocyanine 50 mg/kg Soit 30 minutes avant l'injection de carraghénane Ou soit 75 minutes après l'injection de carraghénane

Dans ce modèle expérimental, l'apparition de l'inflammation dans la patte arrière du rat a été décrite comme un événement biphasique.

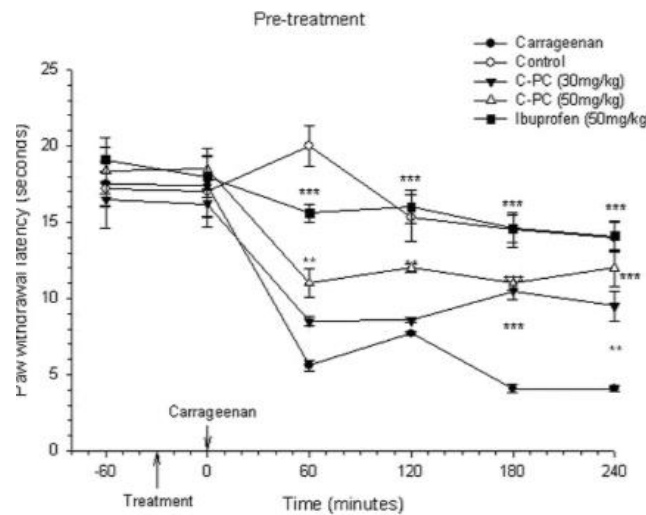
La phase précoce, au cours de la première heure, a été attribuée à une libération d'histamine et de sérotonine par les mastocytes, ayant pour résultat la formation d'un œdème.

La seconde phase, quant à elle, quatre heures après l'injection de carraghénane, a été attribuée à une libération de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , interleukines, leucotriènes) par les cellules mastocytaires.

Pour cette réponse inflammatoire, les exsudats et les tissus de la patte furent conservés.

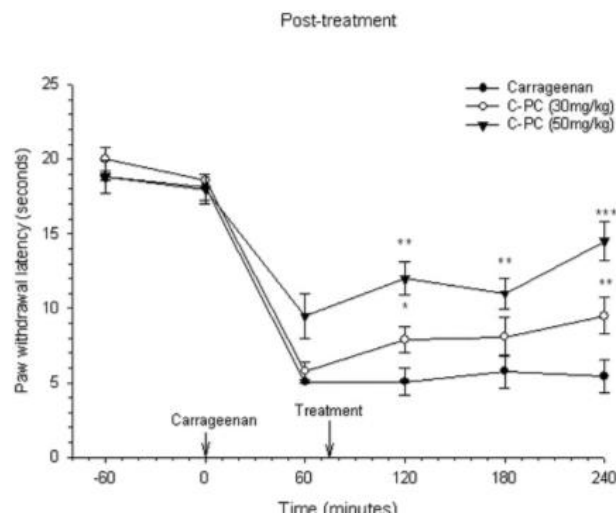
## Effet de la phycocyanine sur l'hyperalgésie

Ici, les chercheurs ont mesuré la perception de la douleur chez les rats 30 minutes après l'injection de carraghénane. Plus le rat retirait rapidement sa patte plus cela signifiait que la douleur était grande et donc plus l'inflammation était importante.



**Figure 18** : Histogramme représentant la latence du retrait de la patte du rat en seconde en fonction du temps Pré-traitement

Avec : \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$  \*\*\* /  $p < 0,001$  vs groupe carraghénane



**Figure 19** : Histogramme représentant la latence du retrait de la patte du rat en seconde en fonction du temps Post-traitement

Avec : \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$  \*\*\* /  $p < 0,001$  vs groupe carraghénane

	Groupe «50 mg/kg »	Groupe « 30 mg/kg »	Ibuprofène	Groupe Carragénane
<b>Pré-traitement</b> (début du traitement 30 min avant l'injection de carragénane)	12 sec	9 sec	14 sec	4 sec
<b>Post-traitement</b> ( début du traitement 75 min après l'injection de carragénane)	14 sec	9 sec	/	5 sec

**Tableau 11** : Latence du retrait de la patte du rat en seconde (sec) en pré et post-traitement

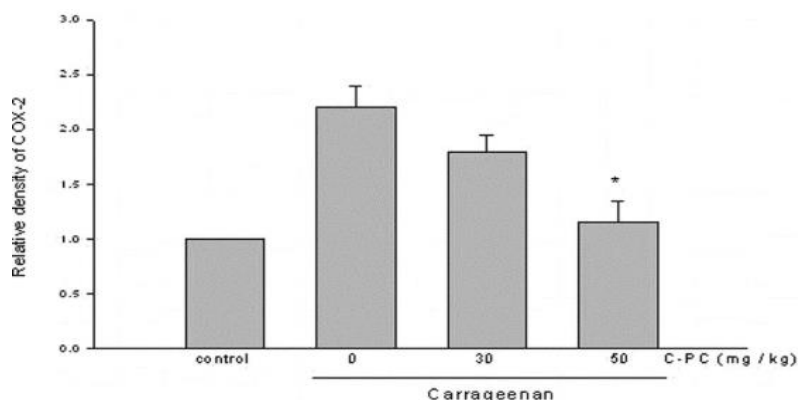
Tout d'abord sur le tableau 11, on constate que l'ibuprofène possède l'activité antihyperalgésique la plus puissante, résultat attendu par les chercheurs car ses effets anti-inflammatoires sont déjà connus. Ce groupe-là a donc été utilisé, ici, comme contrôle positif pour valider l'efficacité de cet essai.

Si l'on s'intéresse maintenant à la phycocyanine, on remarque qu'un prétraitement ou un post-traitement avec cette dernière à 30 mg/kg ou 50 mg/kg réduit significativement et de manière dose dépendante l'hyperalgésie des rats par rapport aux résultats du groupe carragénane ( $p < 0,01$ ).

Par conséquent, la phycocyanine a un rôle préventif et un rôle contre la réaction inflammatoire aiguë puisqu'elle est capable de retarder l'hyperalgésie provoquée par le carragénane.

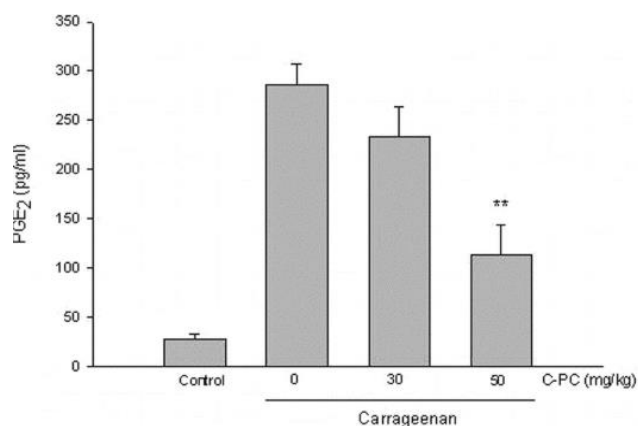
### Effet de la phycocyanine sur l'expression de COX-2 et sur la formation de PGE<sub>2</sub>

**COX-2 → Responsable de la production du médiateur pro-inflammatoire, PGE<sub>2</sub>**



**Figure 20** : Histogramme représentant l'expression de la COX-2 en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carragénane

Avec : \*  $p < 0,05$ / \*\*  $p < 0,01$ / \*\*\*  $p < 0,001$  vs groupe carragénane



**Figure 21** : Histogramme représentant la production de PGE<sub>2</sub> (pg/mL) en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane

Avec : \*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$  / \*\*\*  $p < 0,001$  vs groupe carraghénane

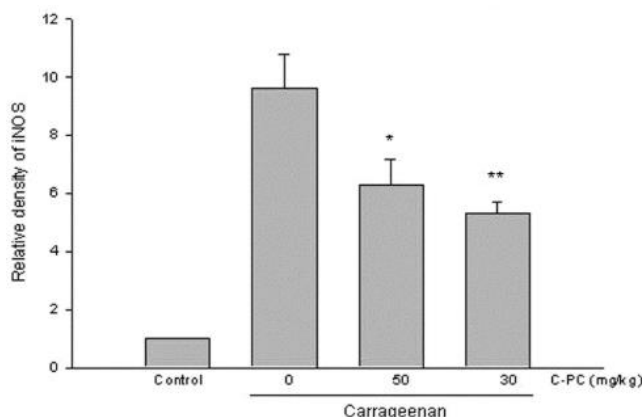
Sur ce graphique (figure 20), on observe une diminution significative de l'expression de la COX-2 pour le groupe ayant reçu une dose élevée de phycocyanine (50 mg/kg) en pré-traitement par rapport au groupe carraghénane ( $p < 0,05$ ). Par conséquent, il est également logique d'assister à une diminution significative de la formation de PGE<sub>2</sub> ( $p < 0,01$ ) (figure 21). Cette étude permet de confirmer le rôle préventif de la prise de phycocyanine sur le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

En parallèle, une autre étude menée par le professeur Reddy CM. a été menée pour savoir si l'inhibition de la COX-2 par la phycocyanine était sélective. Les résultats furent concluants et ne démontrèrent aucune inhibition de la COX-1 (130).

Cette inhibition unique de la COX-2, dite sélective, est une notion importante. Au sein de notre organisme, nous possédons deux types de cyclooxygénases : la COX-1 est une enzyme constitutivement active qui est localisée dans la majorité des cellules, elle permet la production de thromboxane A<sub>2</sub>, molécule ayant un rôle clé dans l'anti-agrégation plaquettaire, dans la synthèse de mucus protecteur de l'estomac et dans le maintien d'une bonne filtration glomérulaire ; à l'inverse la COX-2 est une enzyme inductible, c'est-à-dire qu'elle est activée par différentes molécules comme des cytokines ou des interférons. L'action de la COX-2 permet la production de prostaglandines ayant cette fois-ci, un rôle dans l'agrégation plaquettaire et l'inflammation. De ce fait, on comprend que seule la COX-2 a un impact sur la réaction inflammatoire puisque les eicosanoïdes qu'elle produit seront responsables de la douleur, de la chaleur, de la tuméfaction et de la rougeur. C'est pourquoi, des molécules comme le Celecoxib (Celebrex<sup>®</sup>) ou le Rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) furent développées et commercialisées pour pallier aux effets néfastes du blocage de la COX-1 qui est nécessaire au maintien du bon fonctionnement de notre organisme. Malheureusement, ces deux médicaments ne sont pas sans conséquences : œdèmes, problèmes cardiovasculaires... nombreux sont les effets indésirables ressentis et rapportés par les patients.

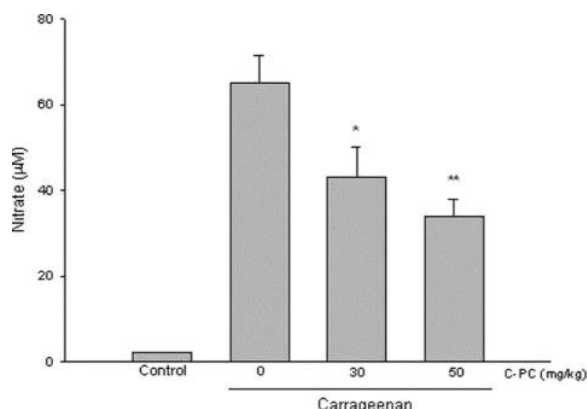
En conclusion, la phycocyanine semble être une bonne alternative, sans effets indésirables connus à l'heure actuelle, pour prévenir la réaction inflammatoire en agissant notamment en amont sur la COX-2.

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote est formé par une oxydation de l'arginine sous l'action de l'oxyde nitrite synthétase induite (iNOS) activée lors des processus inflammatoires. Ce radical libre, généré par les cellules endothéliales, entraîne une vasodilatation, responsable de la formation d'un œdème et d'un érythème.



**Figure 22 :** Histogramme représentant l'expression d'iNOS en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane

*Avec : \* p < 0,05/ \*\* p < 0,01/ \*\*\* / p < 0,001 vs groupe carraghénane*



**Figure 23 :** Histogramme représentant la production de nitrate en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine, 4 heures après l'administration du carraghénane

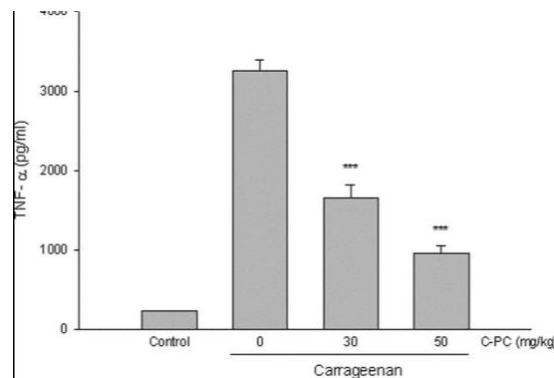
*Avec : \* p < 0,05/ \*\* p < 0,01/ \*\*\* / p < 0,001 vs groupe carraghénane*

On observe sur la [figure 22](#) une diminution significative et dose dépendante de l'expression de l'iNOS pour les rats ayant reçu de la phycocyanine ( $p < 0,01$ ) par rapport au groupe carraghénane. De ce fait, une diminution significative de la formation de NO ( $p < 0,05$ ) a aussi été observée ([figure 23](#)).

Donc, par ces résultats, on devrait observer chez les rats traités par la phycocyanine une diminution des symptômes inflammatoires tels que l'œdème et donc une diminution de la douleur.

## Effet de la phycocyanine sur la formation de TNF- $\alpha$ et d'IL-10

La première cytokine libérée suite à l'administration de carraghénane est un facteur de nécrose tumorale : le TNF- $\alpha$ . Ce dernier est responsable de la libération d'interleukines, de prostaglandines et des catécholamines du système sympathique.



**Figure 24 :** Histogramme représentant le taux de TNF- $\alpha$  en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine administrée 30 minutes avant le carraghénane, 4 heures après l'administration du carraghénane

Avec : \*\*\*  $p < 0,001$  vs groupe carraghénane

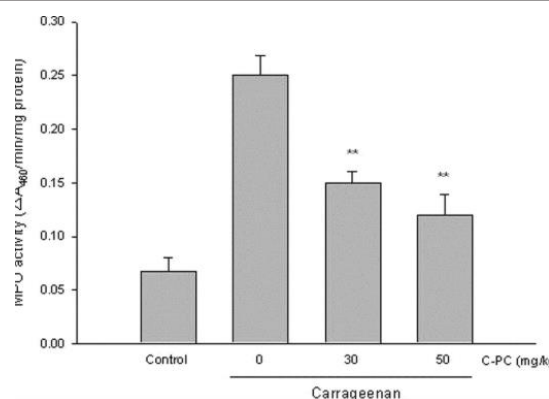
Ce graphique (figure 24) montre qu'un prétraitement avec de la phycocyanine à 30 ou 50 mg/kg entraîne une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de la formation de TNF- $\alpha$  par rapport au groupe carraghénane.

Par contre, aucun changement sur la concentration d'IL-10 n'a été rapporté. En fait, cette interleukine a la capacité d'inhiber la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . De ce fait, puisque sa concentration est inchangée, la diminution du TNF- $\alpha$  est donc bien liée à la phycocyanine.

Là encore, les chercheurs montrent l'intérêt de la phycocyanine lorsqu'elle est utilisée en prévention.

## Effet de la phycocyanine sur l'activité de la myéloperoxydase (MPO)

La MPO est une enzyme retrouvée dans les polynucléaires neutrophiles. Lorsque l'on retrouve des concentrations anormalement élevées de cette enzyme dans le plasma, dans les liquides biologiques ou bien dans les tissus cela montre une activation importante des polynucléaires (131).



**Figure 25 :** Histogramme représentant l'activité de la MPO en fonction de la dose (mg/kg) de phycocyanine

Avec : \*\*  $p < 0,01$  vs groupe carraghénane



Sur ce graphique (figure 25), on peut observer une diminution significative et dose dépendante de l'activité de la MPO dans les pattes des rats suite à l'administration de phycocyanine à 30 mg/kg ou à 50 mg/kg ( $p < 0,01$ ) par rapport au groupe carraghénane.

Pour appuyer ce résultat, une autre étude a mesuré l'activité de la MPO dans des cas de colites chez des rats, induites par l'acide acétique (132). La phycocyanine permettait de réduire l'activité de cette enzyme, ce qui s'est donc traduit par une inhibition de l'infiltration des cellules pro-inflammatoires et une réduction des dommages dans le côlon chez les rats traités à la phycocyanine.

En conclusion, la phycocyanine exerce une activité anti-inflammatoire préventive dans les modèles d'inflammation aiguë.

### **Conclusion de l'étude du docteur Shih *et al.***

Cette étude a permis de démontrer que l'administration de phycocyanine avant ou après le début du déclenchement d'une réaction inflammatoire permettait de réduire de manière significative l'hyperalgésie provoquée par le carraghénane. On peut alors en déduire que la phycocyanine a bien un rôle dans la prévention et le traitement de la nociception inflammatoire.

De plus, une étude menée par Romay C. chez des souris a montré que l'extrait de phycocyanine réduisait les niveaux de leucotriènes  $B_4$  par inhibition de la lipoxigénase. Les leucotriènes  $B_4$  sont des médiateurs impliqués dans l'asthme. L'utilisation de la phycocyanine pourrait donc soulager l'inflammation des bronches de près de 235 millions d'asthmatiques (chiffre OMS) au quotidien (133).

Des tests de sécurité furent également réalisés au cours de l'étude du docteur Shih *et al.* pour tenter de déterminer un seuil de toxicité de la phycocyanine afin de garantir son utilisation. Les chercheurs avaient traité des rats avec une dose élevée de phycocyanine, soit 3 g/kg par voie orale. Résultat : aucune mortalité, aucune atteinte d'organe ou d'altération du comportement ne fut observée.

Enfin, n'ayant aucun impact sur la cyclooxygénase constitutive, la phycocyanine permet de lutter contre l'inflammation sans pour autant perturber l'organisme en bloquant certaines actions physiologiques essentielles au maintien de notre bonne santé.

Ainsi, la phycocyanine peut être une alternative intéressante aux AINS qui ont une action sur les deux cyclooxygénases et qui sont également responsables de nombreux effets indésirables.

### **Phycocyanine et AFA**

Concernant maintenant la correspondance de dose avec la cyanobactérie, on sait que pour 100 g d'AFA on retrouve environ 15 g de phycocyanine.

Poids des rats : 200-250 g	Pour 1 g AFA
30 mg/kg : entre 6 mg et 7,5 mg de phycocyanine	150 mg de phycocyanine
50 mg/kg : entre 10 mg et 12,5mg de phycocyanine	

Bien qu'AFA contienne de la phycocyanine en grande quantité, pour pouvoir confirmer à l'heure actuelle son rôle anti-inflammatoire il faudrait d'une part, que la phycocyanine utilisée dans les études soit extraite d'AFA et non de la Spiruline, et d'autre part, que des études *in vivo* soient réalisées. En effet, l'étude du docteur Shih *et al.* fait abstraction de la digestion. Etant une protéine, la phycocyanine administrée par voie orale, est détruite par des protéines digestives avant de passer dans le sang. Cette étude nous laisse donc perplexe puisqu'un effet anti-inflammatoire a quand même été constaté suite à une administration de la phycocyanine chez les rats. Il serait donc intéressant d'essayer de doser la phycocyanine ou bien ses produits de dégradation dans le sang des rats pour connaître l'origine de ces effets observés.

De plus, il serait intéressant d'utiliser l'ensemble des composants d'AFA qui pourraient, en effet, renforcer les effets anti-inflammatoires observés.

## 2) Oméga 3

*Aphanizomenon flos aquae* renferme des quantités importantes d'acides gras assimilables par notre organisme. Ayant un taux d' $\omega$ -3 bien supérieur au taux d' $\omega$ -6, AFA permet de réduire certains processus inflammatoires.

En effet, les polyinsaturés, EPA et DHA, sont capables d'inhiber le mouvement des leucocytes le long de l'endothélium (chimiotactisme), la production d'eicosanoïdes (prostaglandines) ou encore la production de cytokines. Le mécanisme par lequel les  $\omega$ -3 inhibent la chimiotaxie n'est pas encore bien établi, mais les chercheurs optent actuellement pour la diminution de l'expression des récepteurs chimio-attractifs des leucocytes et/ou un antagonisme, ce qui pourrait expliquer la réduction de leur mouvement.

Ensuite, ces acides gras agissent à la surface des cellules inflammatoires en venant modifier la composition de leurs membranes lipidiques riches en acide arachidonique. En inversant le ratio  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3, notre organisme revient alors en faveur d'un état anti-inflammatoire. Ils agissent aussi en altérant l'expression de certains gènes ce qui se traduit par une baisse de la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines ou les eicosanoïdes (134) (135). Ainsi, cela a pour conséquence de perturber la signalisation des cellules inflammatoires.

En 1987, le docteur Sperling et son équipe étudièrent les effets d'une supplémentation de 20 g en huile de poisson de mer (EPA et DHA) sur la génération de médiateurs lipidiques leucocytaires. L'étude avait concerné douze patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et avait duré six semaines. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique des articulations dont la prévalence est de 1 %, et pour laquelle aucun traitement actuel ne permet de guérison : les médicaments sur le marché ne peuvent qu'en retarder la progression ou en limiter les symptômes (136).

Les résultats ont montré que le rapport entre l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) présents dans les neutrophiles des patients avait significativement diminué : on passe d'un ratio d'acide arachidonique / EPA de 87:1 à 2,7:1. On note aussi une diminution de la génération de leucotriène B<sub>4</sub> de 33 %, diminution également constatée dans l'étude de Romy C. qui affirmait que cette baisse était due à la présence de la phycocyanine. Ainsi, une supplémentation par une forte dose d' $\omega$ -3 présente un bénéfice clinique significatif pour les patients et peut donc amener à une possible diminution de la consommation de médicaments anti-inflammatoires (137).

Des recherches sur l'Homme ont ensuite été menées pour déterminer la dose à laquelle les  $\omega$ -3 commençaient à avoir des effets anti-inflammatoires. Une expérience montra qu'un apport d'EPA de 1,35 g jour pendant 3 mois n'était pas suffisant pour influencer la production de PGE<sub>2</sub>, tandis qu'un apport de 2,7 g avait entraîné une diminution significative de la production de cette prostaglandine. Ainsi, il semble qu'une dose supérieure à 2 g par jour soit nécessaire pour obtenir un effet anti-inflammatoire, dose qui pourra néanmoins fluctuer en fonction de la consommation en oméga 6 des individus.

Bien qu'il soit possible d'incorporer chaque jour dans notre alimentation des  $\omega$ -3, l'apport recommandé par cette étude paraît difficile à atteindre pour une grande majorité de la population. En prenant en compte le pourcentage d' $\omega$ -3 dans la cyanobactérie AFA, soit 30,10 %, si notre apport se limitait à AFA, alors pour observer une réponse anti-inflammatoire il faudrait consommer, en moyenne, 9 grammes par jour.

Ayant un rôle de complément alimentaire, AFA pourrait donc permettre à la population de compenser le manque d'oméga 3 dans l'alimentation sans pour autant en représenter 100 % des apports (138).

### 3) Conclusion

En conclusion, AFA est un complément prometteur pour mieux soigner et contrôler les maladies inflammatoires chroniques, comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, la sclérose en plaque, l'arthrose ou encore l'asthme. Toutefois, il serait judicieux de déterminer la dose exacte à consommer par jour et la durée du traitement pour réellement obtenir un effet anti-inflammatoire sans ignorer la biodisponibilité de chaque individu. De plus, il faudrait étendre les études sur d'autres maladies inflammatoires chroniques et recruter un maximum de patient pour les études. Il faudrait également que AFA soit utilisée pendant les essais pour mieux en apprécier son efficacité et potentiellement visualiser une synergie d'action entre ses divers composants. (139)

## E. Effet anti-oxydant

Le corps humain est composé de plus de 120 000 milliards de cellules dont chacune, selon le professeur Bruce Ames, est exposée 10 000 fois par jour à des radicaux libres.

Les radicaux libres sont des molécules instables qui cherchent à se lier à d'autres atomes pour obtenir un état d'équilibre. Lorsqu'un radical libre se stabilise, il le fait au détriment d'une autre molécule voisine qui devient à son tour instable et ainsi de suite, ce qui provoque une véritable réaction en chaîne. Espèces très réactives, on assiste alors à des destructions ou à des mutations des cellules environnantes induisant une perturbation de l'homéostasie de notre organisme ou encore à l'apparition de pathologies.

Les facteurs responsables de la genèse de ces radicaux sont multiples : tabac, stress, infections, inflammation, soleil, exposition à des polluants, alimentation mal équilibrée... Malgré une bonne qualité de vie, il est évident qu'il est difficile de nos jours de supprimer toutes les causes générant ces radicaux. C'est pourquoi la population d'aujourd'hui se tourne vers la nature pour y puiser des agents protecteurs appelés « anti-oxydants ».

Les anti-oxydants sont des alliés pour notre santé, ils permettent de lutter contre les maladies cardiovasculaires, de prévenir des cancers, de protéger des maladies oculaires, de contrer les effets de la pollution ou encore de retarder le vieillissement cellulaire (140).

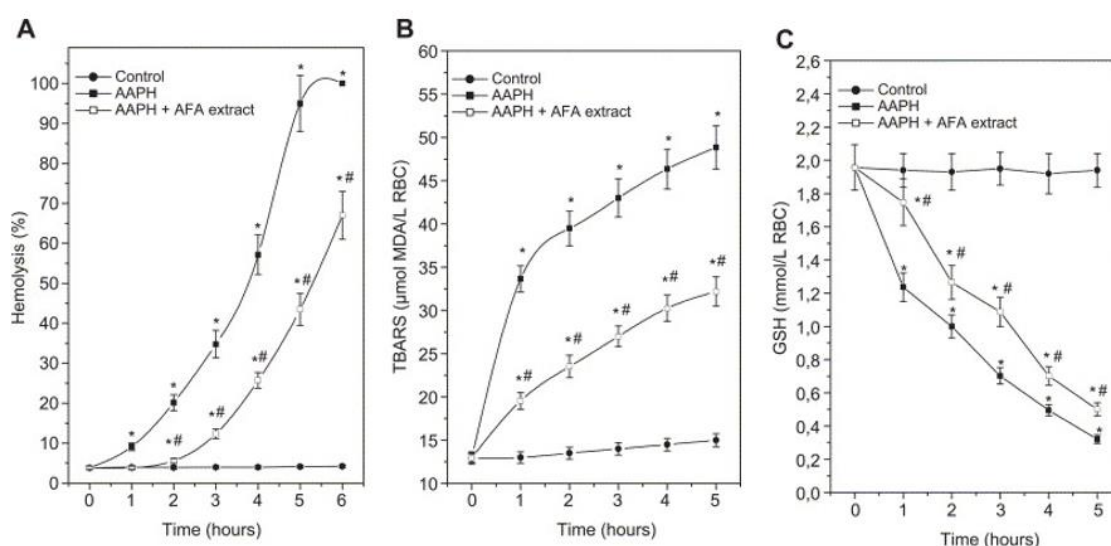
Considéré comme aliment le plus riche du monde, AFA possède de nombreux antioxydants comme des pigments (chlorophylle, phycocyanine, caroténoïdes), des enzymes antioxydantes, des acides aminés, des vitamines (A, B, C et E), des flavonoïdes et enfin des oligoéléments comme le cuivre, le zinc, le manganèse et le sélénium (141).

## 1) La phycocyanine

### a. Action sur les globules rouges

En 2004, une étude *in vitro* menée par le chercheur Benedetti S. a évalué la capacité d'un extrait d'AFA, enrichi en phycocyanine, à protéger les érythrocytes humains contre les lésions provoquées par des radicaux libres par l'administration de 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ou de chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ). Dans cette expérience, aucune donnée sur le nombre de volontaires n'a été communiquée, ni même le nombre d'échantillons testés.

La phycocyanine contenue dans AFA représente 15 % de son poids sec. Ici, l'extrait d'AFA utilisé a été enrichi en phycocyanine afin d'obtenir une teneur de 30 à 40 % de sa matière sèche. Cet extrait a ensuite été dissous dans une solution saline tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 puis centrifugé pendant dix minutes afin d'éliminer toute matière insoluble. La solution mère obtenue avait une concentration en phycocyanine de 10  $\mu\text{M}$ , concentration évaluée en utilisant le coefficient d'extinction molaire à 620 nm (142).



**Figure 26 :** Graphique représentant les effets d'AFA, *in vitro*, sur l'hémolyse des globules rouges et sur la concentration en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et en glutathion (GSH)

(A) Graphique représentant le pourcentage d'hémolyse des globules rouges en fonction du temps (en heures)

(B) Graphique représentant la concentration de TBARS (en  $\mu\text{mol MDA/L}$ ) en fonction du temps (en heures)

(C) Graphique représentant la concentration de GSH (en nmol/L de globule rouge) en fonction du temps (en heures)

Avec : \*  $p < 0,05$  du groupe témoin et  $p < 0,05$  du groupe AAPH

Concentration de PC dans l'extrait d'AFA (nM)	Hémolyse (%)	TBARS ( $\mu\text{mol MDA} / \text{L RBC}$ )	GSH (mmol / L RBC)
0	58,2 $\pm$ 4,6	46,3 $\pm$ 3,9	0,49 $\pm$ 0,04
dix	49,8 $\pm$ 3,5	42,6 $\pm$ 3,3	0,55 $\pm$ 0,05
50	37,6 $\pm$ 3,4	35,2 $\pm$ 2,9	0,64 $\pm$ 0,05
100	25,7 $\pm$ 1,9	30,1 $\pm$ 2,7	0,72 $\pm$ 0,06
250	13,0 $\pm$ 1,1	23,8 $\pm$ 2,2	1,18 $\pm$ 0,08
500	5,9 $\pm$ 0,5	16,9 $\pm$ 1,4	1,66 $\pm$ 0,11
1000	4,3 $\pm$ 0,4	15,3 $\pm$ 1,4	1,87 $\pm$ 0,12

Valeurs témoins (suspension de RBC incubée avec du PBS): hémolyse 4,0  $\pm$  0,3%; TBARS 14,5  $\pm$  1,1  $\mu\text{mol MDA} / \text{L RBC}$ ; GSH 1,94  $\pm$  0,14 mmol / L RBC.

**Figure 27 :** Effet dose-dépendante de l'extrait d'AFA, *in vitro*, contre les dégâts oxydatifs des globules rouges après 4 h d'incubation avec le 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 50 nM

L'ajout de l'extrait d'AFA à la suspension de globules rouges en l'absence d'AAPH n'a pas provoqué d'hémolyse ni de modification de la teneur en malondialdéhyde (MDA) et en glutathion après 6 heures d'incubation. Ces données n'ont pas été présentées dans les deux figures ci-dessus mais ont bien été étudiées (figure 26 et 27).

### **Hémolyse des globules rouges**

Tout d'abord, des échantillons de sang hépariné furent prélevés chez des volontaires sains après avoir obtenu leur consentement éclairé. Les globules rouges, cellules dépourvues de noyau, furent centrifugés et lavés trois fois avec du PBS puis ont été remis en suspension. Ensuite, ils ont été pré-incubés pendant quinze minutes avec des extraits d'AFA, prélevés à partir de la solution mère. Puis, afin d'induire un stress oxydatif dans les globules rouges, une partie de ces échantillons a été exposée à 50 mM d'AAPH pendant six heures.

- **Préincubation avec 100 nM d'extrait d'AFA (figure 26)**

En l'absence de préincubation par l'extrait d'AFA enrichi en phycocyanine, on observe une hémolyse rapide et totale au bout des six heures. A l'opposé, pour les échantillons enrichis avec la cyanobactérie avec une concentration de 100 nM de phycocyanine, on observe que le début de l'hémolyse induite par AAPH a été significativement retardé et que le taux d'hémolyse au bout des six heures est de seulement 65 %.

- **Préincubation avec des concentrations croissantes d'extrait d'AFA (figure 27)**

On observe que plus la concentration en phycocyanine est élevée, plus le pourcentage d'hémolyse des globules rouges après quatre heures d'incubation avec l'AAPG diminue.

- **Conclusion**

Lorsque les globules rouges sont exposés à des radicaux libres, on assiste à une destruction de leurs composants membranaires, soit une oxydation de leurs phospholipides. Il se produit une modification de leur structure et donc par conséquent de leur fonction, accélérant leur destruction.

A partir de ces premiers résultats, on peut dire que la présence d'un extrait d'AFA enrichi en phycocyanine permet d'une part de retarder le début de l'hémolyse et d'autre part de réduire le pourcentage total d'hématies entrant en destruction. De plus, ces observations sont doses-dépendantes : plus la concentration en phycocyanine est élevée et plus les hématies semblent être préservées.

Pour compléter cet essai, il faudrait renouveler ce test sur des périodes plus longues pour savoir si, même en présence de l'extrait, l'hémolyse des globules rouges aurait atteint 100 %.

Par ailleurs, il est possible que d'autres composés présents naturellement au sein de cette cyanobactérie soient impliqués dans la réduction de cette hémolyse. C'est le cas, par exemple, des acides aminés leucine, isoleucine, thréonine ; des vitamines du groupe B ou encore des oligoéléments tels que le cuivre ou le fer, qui ont tous une action sur la lignée érythrocytaire.

### **Peroxydation des lipides**

Les TBARS, substances réactives à l'acide thiobarbiturique, sont des marqueurs utilisés pour visualiser l'oxydation des lipides. Les espèces réactives de l'oxygène possèdent des demi-vies extrêmement courtes et sont donc difficiles à mesurer. C'est pourquoi, les chercheurs dosent préférentiellement les produits de dégradation des composants touchés par les radicaux libres.

Ici, les chercheurs ont donc quantifié le malondialdéhyde (MDA) qui est l'un des nombreux produits finaux de faible poids moléculaire formés lors d'une peroxydation lipidique.

Sur le graphique de la figure 26, au bout des cinq heures, on observe que la teneur en MDA est passée de  $12,9 \pm 0,6 \mu\text{mol/L}$  à  $48,8 \pm 2,5 \mu\text{mol/L}$  après introduction de l'AAPH à 50 mM : soit une augmentation d'environ  $36 \mu\text{mol/L}$ .

A l'inverse, l'incubation avec l'extrait d'AFA contenant 100 nM de phycocyanine pendant 15 minutes a permis de réduire significativement la formation de MDA induite par AAPH.

*In vitro*, on constate que l'extrait limite de manière significative la peroxydation des lipides et ce de manière dose-dépendant (figure 27).

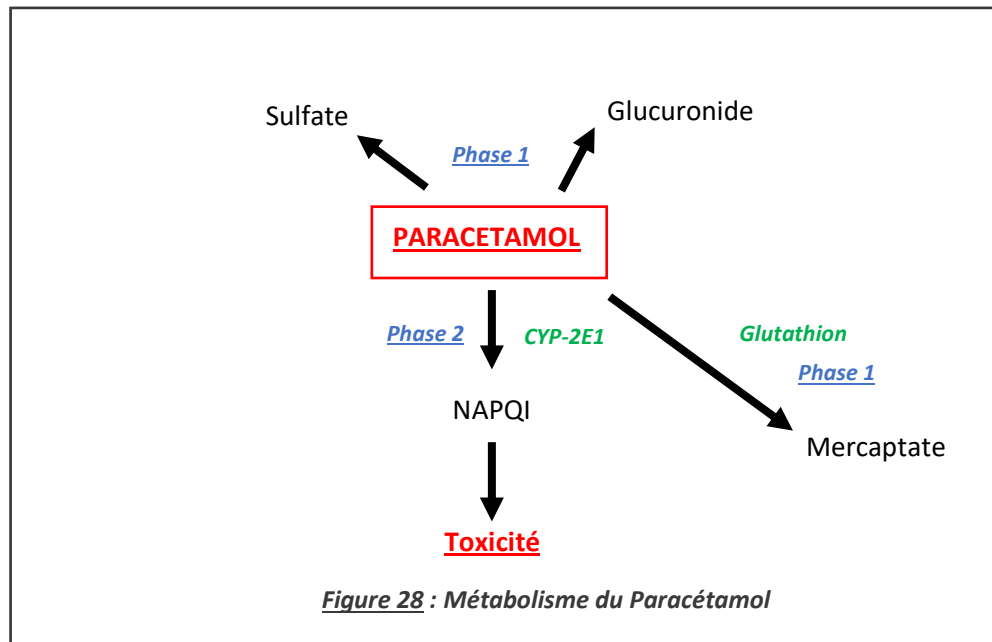
## Teneur en glutathion (GSH) dans les érythrocytes

Dans cette expérience, afin de quantifier le glutathion contenu dans les globules rouges, ces derniers ont été lysés. Sur le graphique de la [figure 26](#), on observe que la teneur en glutathion dans les globules rouges pour le contrôle est restée pratiquement inchangée au bout des cinq heures d'incubation avec une valeur moyenne de  $1,92 \pm 0,12$  mmol/L. Par contre, on observe que l'exposition à 50 mM d'AAPH au fil des cinq heures a provoqué une consommation significative du glutathion cytosolique avec une réduction significative de  $1,96 \pm 0,14$  à  $0,32 \pm 0,02$  mmol/L.

Concernant l'extrait d'AFA contenant 100 nM de phycocyanine, on note une diminution significative de la déplétion, induite par AAPH, du glutathion cytosolique. Donc l'extrait d'AFA enrichi en phycocyanine permet de retarder l'épuisement du glutathion intracellulaire, principal anti-oxydant de notre organisme et ce de manière plus importante en fonction d'une concentration élevée de phycocyanine ([figure 27](#)).

Le glutathion, formé par l'association d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, intervient dans les réactions de détoxification et d'élimination des espèces réactives de l'oxygène. AFA étant riche en ces différents acides aminés, on comprend que grâce à sa composition on la retrouve aussi impliquée dans l'augmentation de la production de ce glutathion.

Par ailleurs, AFA a un possible rôle à jouer dans la détoxification des médicaments métabolisés par le glutathion grâce, d'une part à sa composition en acides aminés, et d'autre part grâce à sa teneur en phycocyanine. C'est le cas, par exemple, du paracétamol qui est largement utilisé par la population en tant qu'antalgique et antipyrétique. Chez le rat, une étude a d'ailleurs été réalisée et a démontrée qu'AFA avait un rôle hépato-protecteur en augmentant la dégradation du NAPQI (N-Acétyl-p-benzoquinone imine) qui est une molécule toxique pour le foie générée par le métabolisme du Paracétamol (143) ([figure 28](#)).



*Figure 28 : Métabolisme du Paracétamol*

**NAPQI** : N-Acétyl-p-benzoquinone imine

*Le paracétamol est principalement métabolisé par le foie en métabolites non toxiques (phase 1). S'il y a un excès de paracétamol, celui-ci emprunte alors une deuxième voie de métabolisation (phase 2) qui sera responsable de la production d'un métabolite toxique : le N acétyl-parabenzoinone-imine.*



## Effet de l'AAPH et du CuCl<sub>2</sub> sur les propriétés spectroscopiques de la phycocyanine

Pour démontrer l'action de la phycocyanine dans la protection antioxydante, l'absorbance à 620 nm de la phycocyanine mélangée soit à l'AAPH soit au CuCl<sub>2</sub> a été suivie au cours du temps. L'incubation de l'extrait d'AFA avec ces agents a provoqué dans les deux cas une diminution significative de l'absorption de la phycocyanine à 620 nm. Cette diminution s'est accompagnée d'une disparition de la couleur bleue de l'extrait, signifiant l'oxydation rapide de la protéine. Ainsi, cette protéine photosynthétique est un nutriment clé pour s'opposer à l'action des radicaux libres.

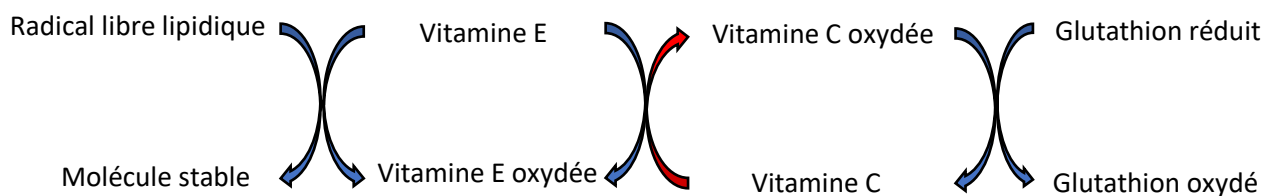
### Conclusion de l'étude du chercheur Benedetti S.

En conclusion, les résultats de l'étude ont montré qu'un extrait d'AFA enrichi en phycocyanine permettait de réduire significativement en fonction du temps et de la dose, l'hémolyse des globules rouges et la peroxydation lipidique causées par l'AAPH. De plus, la consommation intracellulaire du glutathion a été diminuée, reflétant ainsi une plus grande capacité des cellules à résister au stress oxydatif.

Toutefois, bien que ces effets soient d'avantage observés pour une concentration élevée en phycocyanine, il faudrait étudier l'AFA dans sa globalité pour savoir si d'autres de ces composants sont aussi impliqués dans l'obtention de ces résultats. En effet, l'extrait utilisé dans l'étude n'était pas pur : il ne contenait pas que de la phycocyanine.

Par exemple, les vitamines C et E, contenues dans AFA, sont de puissants antioxydants qui agissent en synergie pour garantir une meilleure protection contre le stress oxydatif. La vitamine E, vitamine liposoluble, permet d'empêcher les réactions en chaîne de peroxydations lipidiques dans les membranes cellulaires en interférant avec la propagation des radicaux lipidiques. A l'inverse, la vitamine C étant soluble dans l'eau, on la retrouve dans le cytosol et les liquides extracellulaires. Cette localisation lui permet alors d'interagir directement avec les radicaux en circulation. Du fait de cette distribution, un apport combiné de ces deux vitamines s'est avéré avoir un meilleur effet antioxydant que chaque vitamine séparément.

En fait, lorsque des radicaux libres sont générés près des membranes cellulaires, la vitamine E va les capter : il y aura alors la formation d'un radical tocophéroxyle. La vitamine C étant capable de réduire ce radical régénère alors la vitamine E qui redevient à nouveau efficace. Puis, le glutathion va, à son tour, régénérer la vitamine C oxydée. (144)



Enfin, là aussi dans cette étude *in vitro*, les chercheurs ont fait abstraction de la digestion de la phycocyanine. Ainsi, il semble difficile d'observer les effets décrits dans cette étude *in vivo*.



b. Action sur le rein

En 2008, une étude menée par les chercheurs Kuriakose GC. et Kurup MG, chez des rats a montré le potentiel néphroprotecteur d'AFA contre le stress oxydatif et contre le dysfonctionnement rénal induit par le cisplatine. Le cisplatine est une molécule de chimiothérapie utilisée dans le traitement de nombreuses tumeurs malignes chez l'enfant et chez l'adulte. La néphrotoxicité cumulée en fonction de la dose administrée est la principale toxicité de cette molécule. A cause de cet effet sur le rein, cette molécule nécessite parfois une réduction de la dose, et même un arrêt du traitement (145).

Les animaux de l'étude ont reçu un extrait éthanolique d'AFA (EEAFA) de 25, 50 ou 100 mg/kg, qui a été administré deux jours avant et trois jours après le traitement par cisplatine à raison de 5 mg/kg, posologie nécessaire pour provoquer une perturbation rénale en une seule administration. Les animaux ont été divisés en cinq groupes de six.

- **Groupe n°1 (contrôle)** : administration d'un volume de carboxyméthylcellulose sodique pendant cinq jours
- **Groupe n°2** : administration d'une dose de cisplatine à 5 mg/kg sans supplémentation en AFA
- **Groupe n°3** : administration d'une dose de cisplatine à 5 mg/kg avec supplémentation de 25 mg/kg en AFA
- **Groupe n°4** : administration d'une dose de cisplatine à 5 mg/kg avec supplémentation de 50 mg/kg en AFA
- **Groupe n°5** : administration d'une dose de cisplatine à 5 mg/kg avec supplémentation de 100 mg/kg en AFA

Puis, au sixième jour, les rats furent sacrifiés. L'atteinte rénale fut mesurée en évaluant les taux de créatinine sérique et d'azote uréique dans le sang, la clairance de la créatinine et de l'urée ainsi que les taux sériques de nitrites.

## Taux d'azote uréique dans le sang, créatinine sérique, clairance de la créatinine et de l'urée

	Normal	CIS	CIS + EEAFa, 25 mg	CIS + EEAFa, 50 mg	CIS + EEAFa, 100 mg
BUN	13.64 ± 0.64	82.22 ± 2.99*	64.98 ± 0.32 <sup>†</sup>	43.78 ± 0.75 <sup>†</sup>	24.55 ± 0.08 <sup>†</sup>
Serum creatinine (mg/dL)	0.26 ± 0.44	3.96 ± 1.21*	2.44 ± 0.56 <sup>†</sup>	1.42 ± 0.34 <sup>†</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>†</sup>
Creatinine clearance (mL/Min)	0.98 ± 0.05	0.06 ± 0.06*	0.33 ± 0.14 <sup>†</sup>	0.61 ± 0.64 <sup>†</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>†</sup>
Urea clearance (mL/min)	0.66 ± 0.21	0.04 ± 0.09*	0.21 ± 1.14 <sup>†</sup>	0.42 ± 0.36 <sup>†</sup>	0.57 ± 0.11 <sup>†</sup>

**Tableau 12 : Effets de l'EEAFa sur la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez le rat**

CHIGNON (Blood Urea Nitrogen) => azote uréique du sang

EEAFa signifiant extrait éthanolique d'AFA

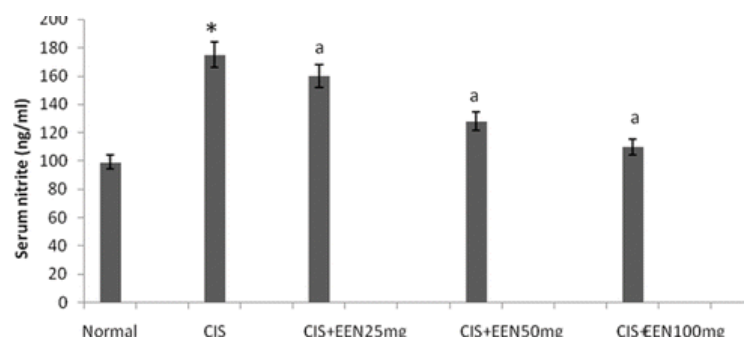
CIS signifiant Cisplatine

<sup>†</sup>  $p < 0,01$  par rapport au groupe CIS

Selon les données du tableau 12 (145), on constate qu'une seule administration de cisplatine entraîne une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) de la créatinine sérique et de l'azote uréique par rapport aux rats du groupe contrôle n'ayant reçu ni cisplatine ni supplémentation en EEAFa.

A l'inverse, pour les groupes ayant reçu une supplémentation en EEAFa, on note une diminution significative et proportionnelle à la dose de ces deux paramètres, et même à un retour aux valeurs contrôles à partir de 50 mg d'EEAFa. De plus, la clairance de créatinine et de l'urée, qui ont été considérablement diminuées par l'administration de cisplatine, ont été significativement améliorées en fonction de la dose par le traitement par l'EEAFa.

## Taux sériques de nitrites



\*  $p < 0,01$  par rapport au groupe 1 / <sup>a</sup>  $p < 0,01$  par rapport au groupe 2

**Figure 29 : Graphique représentant les effets de différentes doses d'EEAFa sur le taux de nitrites sériques chez des rats traités au cisplatine**

Sur ce graphique (figure 29), on remarque que les taux sériques de nitrites sont significativement augmentés ( $p < 0,01$ ) suite à l'administration du cisplatine par rapport au groupe contrôle.

De ce fait, une dose unique de cisplatine est capable d'engendrer un stress nitrosatif. A l'inverse, la prise d'EEAFA diminue de manière significative et proportionnelle à la dose ces taux sériques ( $p < 0,01$ ).

Ici, la diminution des taux sériques de nitrites par EEAFA peut être mise en relation avec l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible, enzyme impliquée dans la formation de ces nitrites. En effet, dans l'étude de Shih *et al.*, il a été démontré qu'AFA permettait de diminuer l'expression de cette enzyme. De ce fait, il serait intéressant de reproduire cette expérience en mesurant l'évolution de l'expression de l'iNOS pour faire un lien entre ces deux études.

D'autre part, en sachant que les nitrites sont des substances vasodilatatrices, si leurs taux diminuent, on s'attendra à observer une vasoconstriction. Par conséquent, cet effet sera responsable d'une augmentation du débit cardiaque et donc *in fine* du débit rénal.

### **Effet de l'EEAFA sur la peroxydation des lipides induit par le cisplatine**

Groupes	TBARS (mM / 100 g de tissu)	CD (mM / 100 g de tissu)
Normal	1,23 ± 0,99	15,76 ± 0,41
CIS	1,96 ± 1,19	24,68 ± 0,74
CIS + EEAFA, 25 mg	1,7 ± 0,87 <sup>†</sup>	20,35 ± 1,02 <sup>†</sup>
CIS + EEAFA, 50 mg	1,48 ± 0,29 <sup>†</sup>	17,22 ± 0,59 <sup>†</sup>
CIS + EEAFA, 100 mg	1,30 ± 0,69 <sup>†</sup>	16,06 ± 0,57 <sup>†</sup>

**Tableau 13 :** Effet de l'EEAFA sur la peroxydation lipidique chez les rats traités par la cisplatine en fonction des concentrations en acide thiobarbiturique (TBARS) et en diènes conjugués (CD)

<sup>†</sup>  $p < 0,01$  par rapport au groupe 2

La mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) ainsi que les diènes conjugués (CD) a été utilisée comme indicateur de la peroxydation lipidique ici. La génération de ces deux produits témoigne de la présence de lésions rénales.

Selon ces résultats (tableau 13), on s'aperçoit que les niveaux de TBARS et de CD ont augmenté de manière significative suite à l'administration du cisplatine par rapport au groupe contrôle. Par contre, l'administration d'EEAFA a permis de réduire de manière significative ( $p < 0,01$ ) et proportionnelle à la dose ces deux taux par rapport au groupe 2.

### **Conclusion de l'étude des chercheurs Kuriakose GC. et Kurup MG**

Tout d'abord, les chercheurs ont voulu montrer l'impact d'une seule administration de cisplatine sur les reins des rats. Effectivement, une unique dose suffit à provoquer une dysfonction rénale marquée, comme en témoigne la diminution nette de la clairance de la créatinine et de l'urée.

Mais, l'EEAFA a réussi à améliorer considérablement et rapidement le débit rénal des rats après administration de cisplatine. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence de phycocyanine, aux propriétés antioxydantes, qui permet *in fine* d'améliorer les fonctions rénales en atténuant le déclin généré par le stress oxydatif. Cependant, cette protéine ne peut gagner le rein puisqu'elle est détruite au niveau digestif. Il existe donc sûrement d'autres molécules responsables de cette action protectrice.

Le corps humain dispose d'un système efficace pour prévenir et neutraliser les dommages induits par les radicaux libres. Lorsque l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et le système de défense antioxydant est perdu, il en résulte un stress oxydatif qui dérégule les fonctions cellulaires menant à l'apparition de pathologies. Dans cette étude, il a aussi été mesuré les activités des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et la glutathion S-transférase (GST) suite à une exposition au cisplatine.

Les résultats montrèrent que l'activité de ces enzymes avait considérablement diminué ( $p < 0,01$ ) dans le groupe traité par le cisplatine par rapport au groupe contrôle. Par contre, pour les rats traités par EEFA, les activités de ces enzymes avaient atteint des niveaux proches de la normale. Ainsi, il existe probablement une interaction entre la phycocyanine et ces enzymes antioxydantes *in vitro*.

Enfin, il est possible qu'*Aphanizomenon* exerce une action vasoconstrictrice sur les anneaux aortiques des rats, préservant ainsi, le profil hémodynamique du rein. Ici, les molécules responsables de cet effet n'ont pas été mises en évidence mais il semble être lié aux propriétés anti-inflammatoires de la phycocyanine, comme par exemple la diminution de l'expression de la iNOS. Cette étude nous laisse donc là encore perplexe puisque des effets propres à la phycocyanine sont constatés alors que cette protéine est dégradée et digérée dès son absorption.

Par ces résultats, la cyanobactérie AFA semblerait présenter des propriétés rénoprotectrices très intéressantes. Sachant que cette expérience fut réalisée sur des rats, l'évaluation sur l'Homme reste à être vérifiée ainsi que la dose pouvant reproduire ces effets positifs en toute sécurité.

## 2) Potentialisation des effets anti-oxydants

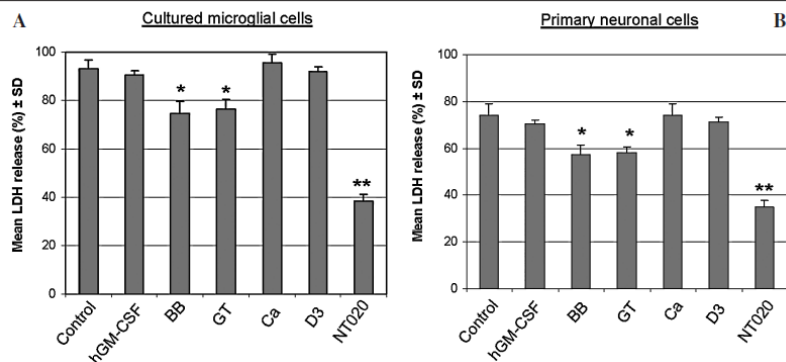
Pour mieux comprendre la synergie d'action des antioxydants naturels, une étude a été réalisée en 2006 par le chercheur R. Douglas Shytle et son équipe sur le complément alimentaires NT 020 (voir annexe 1 : composition des compléments alimentaires) renfermant des extraits de myrtilles, de carnosine, de vitamine D3, d'extraits de thé vert. Ils étudièrent la capacité du complément alimentaire à améliorer la résistance au stress oxydatif, *in vivo* sur des cellules souches humaines de la moelle osseuse (CD34<sup>+</sup>) et *in vitro* sur des progéniteurs du sang périphérique (CD133<sup>+</sup>) (146).

Les extraits de myrtilles préservent la santé au niveau du cerveau, du cœur et des yeux. Ces baies jouent aussi un rôle dans la régulation du taux de sucre dans le sang et sur la fonction urinaire. Ensuite, on retrouve la carnosine, acide aminé antioxydant, qui a un rôle de protection des tissus et des cellules neuronales contre les radicaux libres. La vitamine D3 permet de renforcer le système immunitaire et a une action sur le cœur et les os. Et enfin, l'extrait de thé vert, puissant antioxydant, optimise la santé du système respiratoire et digestif.

### **In vitro : synergie des composants**

Pour cette première expérience, les chercheurs mirent en culture des cellules microgliales murines et des cellules neuronales primaires murines. Ces deux types cellulaires furent traités soit avec le complément alimentaire NT 020 soit avec chacun des composants isolément.

Après 6 heures, afin d'induire un stress oxydatif dans les cellules, un agent oxydant : le peroxyde d'hydrogène (15  $\mu$ M), fut ajouté. Puis, 24 heures après une analyse du pourcentage de mort cellulaire fut faite. Pour mesurer ce pourcentage, les chercheurs choisirent comme indicateur la libération de lactate déshydrogénase (LDH).



**Figure 30** : Image représentant les effets des extraits de myrtilles (BB), de thé vert (GT), de vitamine D3 (D3), de carnosine (Ca) et du complément alimentaire NT 020 sur la libération de LDH

Pour les deux types cellulaires étudiés (figure 30), on constate que les résultats obtenus sont similaires avec une diminution significative de la libération de LDH en présence des extraits de myrtilles et de thé vert, séparés, par rapport au groupe contrôle ( $p < 0,01$ ). Par contre, ni la carnosine, ni la vitamine D3 n'a montré de rôle dans la réduction de la mort de ces cellules.

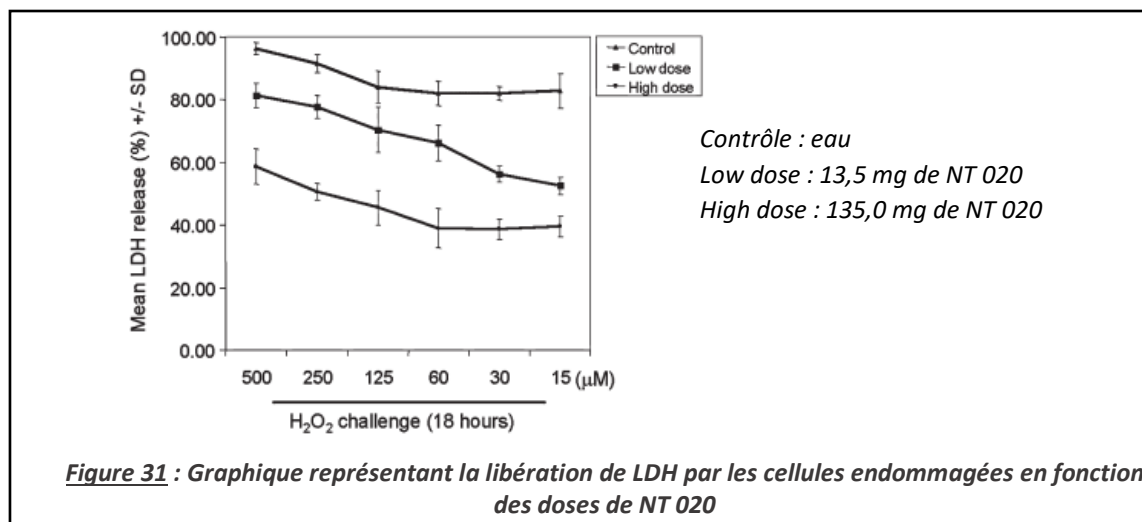
Lorsque nos cellules sont exposées au complément alimentaire NT 020, on constate une plus grande diminution de la libération de LDH par rapport au groupe contrôle ( $p < 0,005$ ). Il semble donc exister une synergie d'action entre ces divers composants.

### **In vivo : réduction du stress oxydatif**

Dans cette 2<sup>ème</sup> expérience, il fut étudié si le complémentaire NT 020 permettait de réduire les effets du stress oxydatif sur les cellules murines lorsqu'il était pris par voie orale. Au cours de l'essai, les souris ont reçu leur alimentation habituelle et étaient dans des conditions normales d'habitat.

Pour vérifier les effets du complément, les animaux reçurent deux dosages différents. Le premier dosage était de 13,5 mg/kg. Cette dose correspondait à la dose quotidienne que les humains doivent consommer. Comme les souris ont une activité métabolique plus importante que celle des humains, les chercheurs administrèrent donc une dose 10 fois plus élevée aux souris.

Les animaux reçurent par voie orale, soit 13,5 mg NT 020/kg (dose faible), soit 135,0 mg NT 020/kg (dose élevée), soit de l'eau (contrôle) pendant 14 jours. Au 15<sup>ème</sup> jour, les cellules de moelle osseuse des souris furent prélevées et cultivées avec des doses décroissantes de peroxyde d'hydrogène allant de 500 à 15  $\mu$ M.



Le groupe ayant reçu la dose la plus élevée d'NT 020 a montré une diminution significative, de 50 % du taux de LDH, par rapport au groupe contrôle tandis que le groupe ayant reçu la plus faible dose a montré une diminution de 25 %, soit deux fois moins. On a donc un effet dose dépendant ( $p < 0,05$ ) (figure 31).

### **Conclusion de l'étude du chercheur R. Douglas Shytle**

Cette équipe de recherche a montré que le complément alimentaire NT 020 permettait de lutter contre le stress oxydatif : stress qui accélère le vieillissement prématuré des cellules. De plus, le complément alimentaire NT 020 a permis de diminuer la mort des cellules *in vitro* mais également *in vivo*. La prise au préalable du complément sur 14 jours a permis d'augmenter la résistance et la viabilité des cellules face au stress oxydatif.

Autre point essentiel, NT 020 n'a pas été ré-rajouté aux cellules souches des souris une fois que ces dernières ont été prélevées. Cela sous-entend une certaine rémanence des effets du complément. De plus, ingéré par voie orale, ces effets furent retrouvés dans la moelle osseuse signifiant alors que certains composés ont la capacité de migrer à ce niveau.

Enfin, cette étude montra qu'un composé ne peut posséder aucun effet antioxydant seul mais en posséder un lorsqu'il est combiné à d'autres substances. C'est pourquoi, si l'on se réfère à cette étude, il est primordial pour connaître les effets de la cyanobactérie sur le corps humain de l'étudier en prenant en compte la totalité de ses composants.

### **3) Développement de biofilms bucco-adhésifs anti-oxydants**

Début 2019, l'équipe de recherche de De Caro V. voulut exploiter les propriétés antioxydantes d'AFA. Les scientifiques se penchèrent sur le développement de films bucco-adhésifs imprégnés de la cyanobactérie AFA pour traiter les maladies buccodentaires liées au stress oxydatif comme les maladies parodontales, le lichen plan buccal ou encore le cancer de la bouche (147).

La formulation fut conçue d'une part pour optimiser les propriétés biomécaniques et adhésives du biofilm et en outre pour promouvoir la biodisponibilité d'AFA. Les premiers biofilms obtenus furent homogènes dans le poids, la taille, l'épaisseur et l'uniformité du complément. Cette nouvelle approche offre donc une possibilité future d'administration par voie sublinguale de compléments alimentaires. Malheureusement, ces nouveaux biofilms ne sont toujours pas commercialisés.

## F. Effet sur le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale, incontrôlée et massive des cellules au sein d'un tissu. La prolifération est telle que la survie de l'organisme vient à en être menacée.

Ayant une origine multifactorielle, des chercheurs se demandèrent si les mitochondries de nos cellules n'avaient pas un lien direct avec le développement des cancers. Les mitochondries sont des organites localisés à l'intérieur de nos cellules qui contribuent à la production d'énergie, à la régulation de la prolifération et à la programmation de la mort cellulaire. Sensible au stress oxydatif, un excédent de radicaux libres peut entraîner la peroxydation des lipides présents dans leur membrane ainsi qu'à un épuisement de leur glutathion (148) (149).

Par conséquent, cela entraîne l'apoptose de la cellule et accélère ainsi le vieillissement tissulaire. Tabac, alcool, mauvaise hygiène de vie et autres produits cancérigènes, quant à eux, provoquent une inflammation chronique responsable aussi d'un vieillissement prématuré de notre organisme. Ce vieillissement cellulaire sera ensuite la cause majeure de l'apparition de mutations ainsi qu'une diminution de l'efficacité de notre système immunitaire, favorisant par conséquent l'apparition de cancers.

Récemment, des propriétés anticancéreuses de certains composés dérivés des cyanobactéries furent découverts. Ces composés moduleraient l'activité cytotoxique, limiteraient la propagation des cellules tumorales ou encore déclencheraient l'apoptose des cellules cancéreuses (150).

### 1) Pouvoir des antioxydants : caroténoïdes et $\omega$ -3

#### a. Caroténoïdes

En 1985, l'institut national du cancer commença à s'intéresser aux algues bleu-vert comme source potentielle d'agent antinéoplasique. En 1988, le docteur Charles Simone parla dans son livre « *Cancer et nutrition* » de l'effet du  $\beta$ -carotène. Il déclara que s'il devait recommander un nutriment pour accompagner une diète faible en lipides et élevée en fibres, il choisirait celui-ci. Il parla de « *neutralisant libre le plus puissant capable de bloquer le processus par lequel une cellule normale peut devenir maligne* ». Effectivement, des études épidémiologiques montrèrent une corrélation positive entre un apport alimentaire élevé en caroténoïdes et une diminution du risque de survenue de cancer : du sein, du col utérin, de l'ovaire, colorectal et des maladies cardiovasculaires et oculaires. Les antioxydants alimentaires sont donc considérés comme des molécules stratégiques dans la prévention des processus de cancérisation (151) (152) (153) (154) (155).

Les antioxydants ont aussi un rôle important dans le traitement du cancer. Pour illustrer ces propos, une étude randomisée en double aveugle fut faite sur des patients atteints de cancer de la prostate chez lesquels un caroténoïde, le lycopène, fut administré. Une partie des patients de l'étude reçurent 30 mg de lycopène par jour pendant trois semaines avant de subir une prostatectomie. Résultat, 80 % des patients supplémentés en lycopène présentaient des tumeurs plus petites par rapport aux patients du groupe témoin. De plus, il fut constaté que les taux plasmatiques de l'antigène prostatique spécifique avaient diminué de 18 % chez les patients ayant reçu cette supplémentation, alors qu'ils ont augmenté de 14 % dans le groupe témoin (156).

Ces résultats indiquent donc que par ses propriétés antioxydantes, le lycopène contribue d'une part, à prévenir l'apparition du cancer, et en outre à le freiner lorsqu'il est installé. D'autres études *in vivo* ont aussi montré les mêmes résultats, suite à l'administration du lycopène, notamment dans les cancers du foie, des poumons, de la prostate, du sein et du côlon.

### b. Oméga 3

Une supplémentation en acide gras polyinsaturés de la famille des  $\omega$ -3, tels que l'EPA et le DHA, est souvent utilisée dans la thérapie nutritionnelle des patients cancéreux, souvent dénutris à cause du cancer. Comme vu précédemment dans l'étude du docteur Sperling, les  $\omega$ -3 ont tendance à diminuer l'inflammation mais ils possèdent également des propriétés antitumorales (156) (136).

Lorsqu'elles sont soumises au stress oxydatif, les mitochondries subissent des modifications structurales et fonctionnelles avec induction ultérieure de l'apoptose des cellules les renfermant. Par le même mécanisme que pour les cellules inflammatoires, les  $\omega$ -3 modifient les composants phospholipidiques de leurs membranes permettant ainsi de les protéger contre les dégâts causés par les radicaux libres. Cela ralentit, par conséquent, le vieillissement cellulaire.

### c. Conclusion

En tenant compte de ces différentes études, des preuves des effets anti-inflammatoires et anti-oxydants d'AFA et en connaissant sa teneur en caroténoïdes et en  $\omega$ -3, on comprend que cette cyanobactérie aura un rôle à jouer face au cancer. Toutefois, des études complémentaires chez l'Homme restent à être réalisées pour étudier plus précisément les mécanismes et les composants utilisés par la cyanobactérie AFA pour s'opposer au processus de cancérisation. De plus, la dose à ingérer par jour en tant que prévention ou d'accompagnement dans la prise en charge du cancer devra être déterminée avec le plus d'exactitude possible.

## 2) Pouvoir de la substance polymérique extracellulaire

La substance polymérique extracellulaire (EPS) est une substance sécrétée lors de la croissance des cyanobactéries. Dans une étude *in vitro*, menée en 2015 par le chercheur Xue X., des cellules de carcinome épidermoïde humain A431 furent sélectionnées comme cellules cibles pour étudier un potentiel effet anticancéreux des EPS. Tout au long de l'étude, des cellules A431 traitées uniquement avec de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) furent analysées pour servir de témoin (157).

### **Observation morphologique : microscope optique**

Les chercheurs examinèrent les changements morphologiques qui apparaissaient sur les cellules suite à la prise d'EPS provenant d'AFA à 1, 2, 3 ou 4 mg (EPS-A). L'analyse morphologique des cellules fut réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Pour le groupe témoin, le noyau et le cytoplasme des cellules A431 étaient inchangées tandis que pour les cellules traitées avec les extraits d'AFA aux quatre concentrations différentes, il fut observé une fragmentation nucléaire, ainsi qu'une condensation de la chromatine.

Les EPS sont des molécules trop grosses pour pénétrer directement dans le noyau. D'ailleurs il est possible que les EPS, contenues dans la cyanobactérie AFA, aient la capacité de déclencher un signal intracellulaire dans le noyau d'une cellule cancéreuse ayant pour conséquence d'y provoquer des effets délétères. Les molécules impliquées dans cette cascade cellulaire restent néanmoins à étudier.

Toutefois, l'AFA sélectionnée pour cette étude provenant Chine, on peut s'interroger si cette dernière n'a pas la capacité de produire des toxines responsables des effets observés. En effet, seule la variété isolée



du lac Klamath est sûre en termes d'utilisation et est proposée comme complément alimentaire puisqu'elle est génétiquement incapable de produire des toxines.

Il faudrait donc tester les cellules saines en présence d'AFA pour voir si effectivement les EPS contenus dans la cyanobactérie ont la capacité d'affecter préférentiellement les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.

### **Observation morphologique : TEM**

Les changements morphologiques des cellules A431, traitées par AFA, furent analysés plus précisément en utilisant la microscopie électronique à transmission (TEM).

Les résultats sont les suivants :

<b>Témoin</b>	Aucune anomalie
<b>1 mg d'EPS-A*</b>	Fragmentation nucléaire Condensation chromosomique Rétrécissement cellulaire Perte de l'intégrité de la membrane nucléaire
<b>2 mg d'EPS-A*</b>	Résultat identique à la concentration 1 mg/mL + Expansion du réticulum endoplasmique
<b>3 mg d'EPS-A*</b>	Résultat identique à la concentration 2 mg/mL + Corps apoptotiques

***Tableau 14 : Changements morphologiques des cellules A431 traitées par AFA (TEM)***

\*EPS-A signifiant substance polymérique extracellulaire provenant d'AFA

D'après ces deux observations au microscope optique et au TEM ([tableau 14](#)), on remarque que l'intégrité du noyau est un bon indicateur de l'entrée en apoptose des cellules A431. Ces changements morphologiques observés sont la conséquence de la destruction programmée de ces cellules.

### **Augmentation de l'apoptose**

Pour évaluer la capacité de l'EPS-A à induire l'apoptose, les cellules A431 furent traitées avec 3 mg d'extrait d'AFA pendant 48 ou 72 heures.

Après 48 heures, le taux d'apoptose du groupe témoin était de 4,25 % tandis qu'il était de 11,32 % pour les cellules A431 traitées par l'extrait. Après 72 heures, le taux d'apoptose avait encore nettement augmenté pour atteindre 26,59 %, un taux cinq fois plus élevé par rapport au groupe témoin (5,29 %). Donc un traitement par un extrait d'AFA entraîne une augmentation de la proportion des cellules apoptotiques et ce d'autant plus que le contact avec les cellules était prolongé.

Ce phénomène peut tout simplement s'expliquer par la première expérience : les EPS sont capables, de manière indirecte, d'entraîner des effets délétères au niveau du noyau. De ce fait, le fonctionnement de la cellule s'altère et peut se traduire par un arrêt du cycle cellulaire de ces cellules en phase S, G2 ou M. Si la division cellulaire n'a plus lieu alors il est possible, dans certains cas, que la cellule rentre en apoptose.

### **Double coloration Rhodamine 123 / Iodure de propidium (Rh123/ PI)**

Pour mieux comprendre l'élément déclencheur de l'apoptose des cellules cancéreuses, l'intégrité membranaire des cellules A431 ainsi que le potentiel membranaire mitochondrial furent analysés par double coloration PI et Rh123. Ici, les cellules A431 furent incubées avec 3 mg/mL d'extrait d'AFA.

PI est un colorant fluorescent qui a la capacité de se lier à l'ADN cellulaire, c'est un agent intercalent des acides nucléiques. Lorsque l'intégrité de la membrane cellulaire est intacte, PI n'est pas capable d'entrer dans la cellule pour colorer l'ADN. A l'inverse, Rh123 est un colorant lipophile qui est absorbé par les mitochondries permettant ainsi d'étudier le potentiel de leur membrane. La diminution du potentiel membranaire mitochondrial, reflétant une perte de la fonction de cet organite, empêche la fixation du colorant Rh123 dans la matrice mitochondriale.

*Selon la coloration obtenue, 4 configurations ont pu être établies :*

	<b>Intégrité membranaire (Liaison à l'ADN cellulaire)</b>	<b>Potentiel membranaire mitochondrial</b>	<b>Conséquence</b>	<b>Groupe</b>
<b>Rh123<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup></b>	Normale	Etat d'équilibre	Fonction mitochondriale normale	Témoin
<b>Rh123<sup>-</sup> / PI<sup>-</sup></b>	<b>Normale</b>	<b>Diminué</b>	<b>Perte de la fonction mitochondriale</b>	<b>AFA</b>
<b>Rh123<sup>-</sup> / PI<sup>+</sup></b>	<b>Diminuée</b>	<b>Diminué</b>	<b>Perte de la fonction mitochondriale</b>	
<b>Rh123<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup></b>	Diminuée	Etat d'équilibre	Fonction mitochondriale normale	

***Tableau 15 : Effet d'un extrait d'AFA (3 mg/mL) sur l'intégrité et le potentiel membranaire mitochondrial des cellules A431***

Les résultats obtenus dans le tableau 15 montre que les cellules A431 du groupe témoin présentaient une configuration Rh123<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup> : aucune des cellules n'est entrée en apoptose.

Au contraire, pour les cellules A431 traitées avec un extrait d'AFA, on observe soit une configuration Rh123<sup>-</sup> / PI<sup>-</sup>, soit une configuration Rh123<sup>-</sup> / PI<sup>+</sup>, soit une configuration Rh123<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>. Dans ces trois cas, les cellules sont entrées en apoptose.

D'après ces résultats, on remarque que, même lorsque l'intégrité cellulaire est intacte soit sans changement morphologique détectable, la cellule peut déjà être engagée dans un processus de destruction programmée.

Il a également été rapporté que pour la configuration Rh123<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>, l'entrée en apoptose s'était faite mais plus tardivement que pour la configuration Rh123<sup>-</sup> / PI<sup>-</sup>. Ce résultat montre donc que même lorsque la mitochondrie n'est pas impactée directement, le changement morphologique des cellules va générer un stress et donc provoquer l'apoptose de celles-ci.

### Conclusion du chercheur Xue X.

En conclusion, les résultats montrèrent que l'utilisation *in vitro* d'un EPS-A permettait d'induire l'apoptose principalement par la voie mitochondriale. En effet, l'origine de la destruction programmée des cellules A431 pouvait s'expliquer soit directement par l'effondrement du potentiel membranaire mitochondriale soit indirectement par une perte de l'intégrité membranaire de la cellule et également de sa fonction.

Par contre, l'explication exacte de ces mécanismes nécessite des recherches supplémentaires. D'autre part, cet effet anti-apoptotique a été attribué aux EPS sans que cette étude n'étudie leur rôle isolément.

### 3) Cytotoxicité des extraits d'algues sur les cellules normales et malignes

Dans une étude menée en 2011, le chercheur Bechelli J. et son équipe ont examiné les effets de différents extraits de cyanobactéries et d'algues sur les cellules hématopoïétiques saines et les cellules leucémiques de patients atteints de LMA (leucémie myéloïde aigue) ou LLC (leucémie lymphoïde chronique).

Des extraits éthanoliques furent préparés :

- à partir d'un gramme de la cyanobactérie *Spirulina platensis* (SPIR)
- à partir d'un gramme de la cyanobactérie *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA)
- à partir d'un gramme du caroténoïdes l'Astaxanthine (AST) issu de l'algue *Haematococcus pluvialis*
- à partir d'un gramme d'une algue *Dunaliella salina* (DUN)

La concentration d'extraits ajoutés aux cellules est représentée en mesures volume/volume ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) (158).

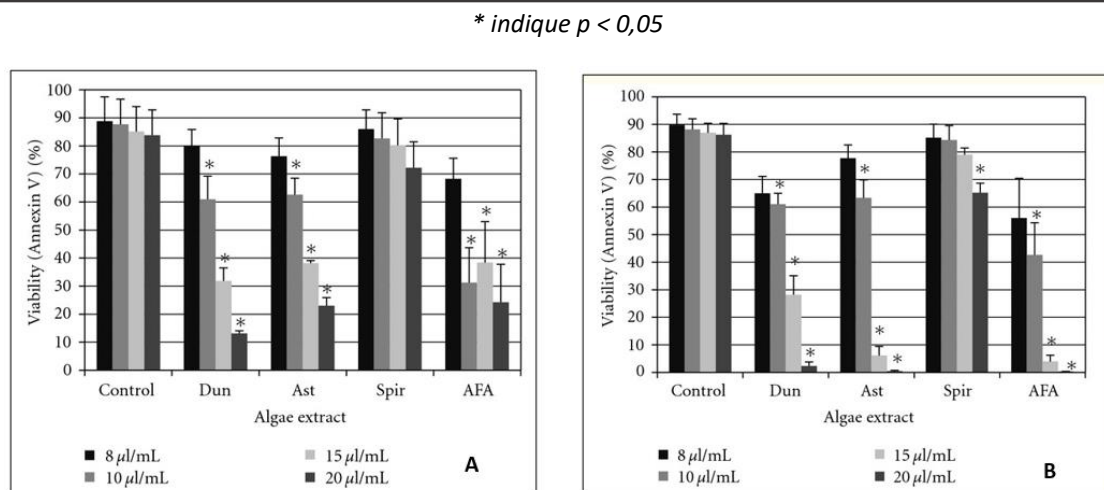
Ici, contrairement à l'étude du chercheur Xue X., l'*Aphanizomenon* testé provenait bien du lac Klamath situé aux Etats-Unis (157).

Pendant toute la durée de l'étude, la viabilité cellulaire, soit la survie des cellules, a été évaluée par une coloration à l'annexine/IP.

L'annexine est une protéine qui a la faculté de se lier à un phospholipide : la phosphatidylsérine. En temps normal, ce phospholipide est présent dans la membrane plasmique des cellules et est exposé du côté intracellulaire. Or, lors de l'entrée en apoptose d'une cellule, cette localisation change et la phosphatidylsérine se retrouve exposée du côté extracellulaire. Ici, plus la phosphatidylsérine est exposée du côté extracellulaire et plus la coloration à l'annexine sera importante. Donc la viabilité cellulaire est inversement proportionnelle à cette coloration.

Cette coloration fut également complétée par l'addition d'un agent intercalant, l'iodure de propidium (IP), qui ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane plasmique est altérée, soit en phase tardive d'apoptose.

### ❖ Viabilité des lignées cellulaires cancéreuses dans le sang



**Figure 32 : Mesure du pourcentage de viabilité des lignées cellulaires cancéreuses : cellules HL-60 (A) et cellules MV-4-11 (B), traitées avec les quatre extraits éthanoliques pendant 24 heures (coloration annexine/IP)**

*SPIR : Spirulina platensis*

*AFA : Aphanizomenon flos-aquae*

*AST: Astaxanthine*

*DUN : Dunaliella salina*

Graphique de la figure 32-A (LMA) : On remarque, pour les extraits DUN, AST et AFA, une diminution significative, par rapport au groupe contrôle, de la croissance des cellules HL-60 à partir d'une concentration en cyanobactérie de 10 µL/mL ( $p < 0,05$ ). D'ailleurs, malgré une légère diminution, les cellules HL-60 exposées à des extraits de SPIR n'ont pas démontré de différence significative par rapport au contrôle.

Ainsi, ici, seule la spiruline ne semble pas démontrer d'effet antitumoral sur les cellules leucémiques provenant de patients atteints de LMA. D'après le profil de l'histogramme, il est possible qu'en utilisant des concentrations plus élevées d'extrait de spiruline, on obtienne une diminution significative par rapport au contrôle.

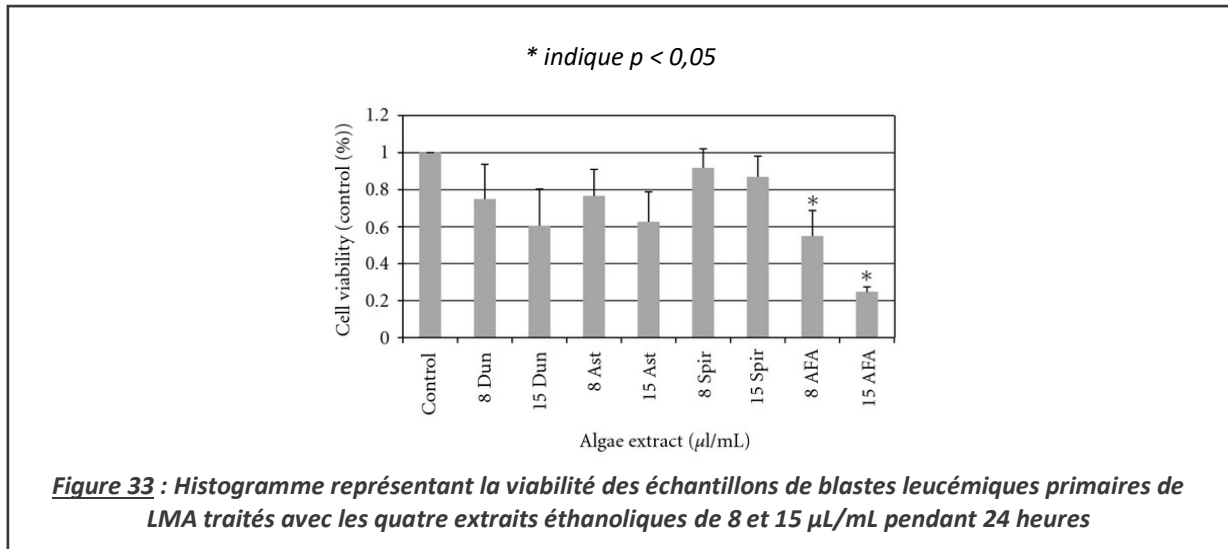
Graphique de la figure 32- B (LLC) : On observe une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la viabilité des cellules MV-4-11 à partir d'une concentration en extrait de 8  $\mu\text{L/mL}$  pour DUN et 10  $\mu\text{L/mL}$  pour AST et AFA. Ici, contrairement aux cellules HL-60, les cellules MV-4-11 exposées aux extraits de SPIR ont montré une diminution significative de la viabilité par rapport au groupe contrôle à partir d'une concentration de 20  $\mu\text{L/mL}$  ( $p < 0,05$ ).

En conclusion, les histogrammes 32-A et 32-B montrent une diminution dose-dépendante sur 24 heures du pourcentage de viabilité des cellules pour tous les extraits étudiés. Donc, plus les cellules sont exposées à des concentrations élevées d'extraits plus les cellules leucémiques sont soumises à une apoptose, ce qui est un point de départ encourageant pour montrer un potentiel effet antitumoral des extraits d'algues et des extraits de cyanobactéries étudiés.

## ❖ Viabilité des blastes dans la moelle osseuse

### • LMA

Pour examiner les effets antileucémiques potentiels des extraits, des cellules blastiques de trois patients atteints de LMA ont été cultivées pendant 24 heures avec des concentrations croissantes d'extraits. Puis, leur viabilité a été analysée par cytométrie en flux avec une coloration à l'annexine/IP.

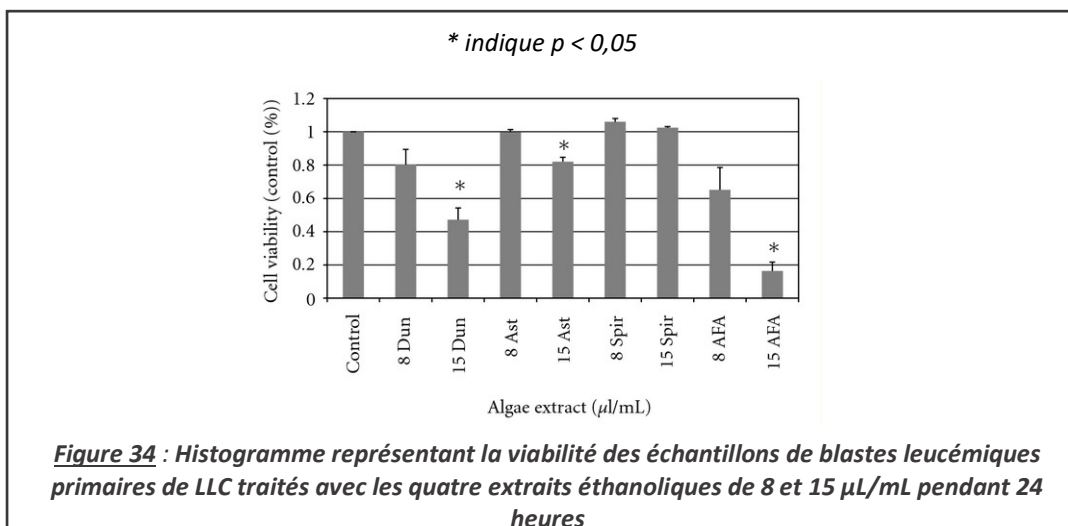


Tout d'abord on constate que les blastes des patients atteints de LMA sont sensibles à l'AFA : à partir d'une concentration de 8  $\mu\text{L/mL}$ , on observe une diminution significative de leur viabilité et ce de manière dose dépendante. A l'opposé, l'exposition aux autres extraits (SPIR, DUN, AST) n'a pas induit l'apoptose des blastes, même à des concentrations élevées allant jusqu'à 15  $\mu\text{L/mL}$  (figure 33).

Ainsi, seule AFA aurait la capacité d'entraîner une destruction programmée des cellules blastiques, présentes dans la moelle osseuse, des patients atteints de LMA.

### • LLC

Les cellules blastiques des quatre patients atteints de LLC ont ensuite été testées de la même manière que celles des patients atteints de LMA.



La viabilité cellulaire a été significativement diminuée lors de l'exposition à 15  $\mu\text{L/mL}$ , soit la plus forte concentration, pour les extraits DUN, AST et AFA (figure 34). A noter que pour les deux histogrammes (figure 33 et 34), la spiruline n'a eu aucun effet sur la viabilité des cellules blastiques des patients atteints de LMA et LLC.

#### ❖ **Arrêt du cycle cellulaire chez les patients atteint de LMA**

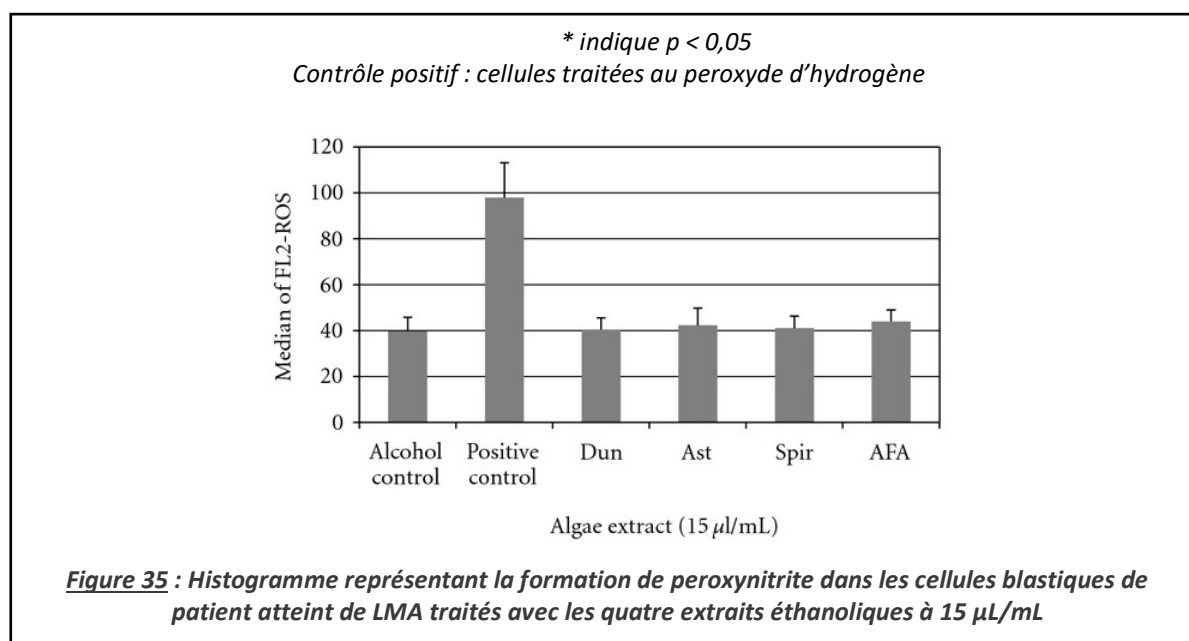
Les chercheurs ont voulu déterminer si les extraits étudiés pouvaient altérer ou interrompre le cycle cellulaire des cellules malignes. Le cycle cellulaire a été évalué par analyse de l'ADN des cellules leucémiques HL-60, une fois traitées avec AFA, AST, SPIR ou DUN.

En l'absence d'AFA, il a été montré que 40 % des cellules étaient en phase S ou G2. Cependant, lors d'un traitement par cette cyanobactérie (8 et 15  $\mu\text{L/mL}$ ), on observe une augmentation significative et dose dépendante du pourcentage de cellules en phase G1 ainsi qu'une diminution significative des phases S, G2 et M. D'autre part, une augmentation similaire des cellules en phase G1, et une diminution de S, G2 et M ont été observées avec DUN (8 et 15  $\mu\text{L/mL}$ ) et 15  $\mu\text{L/mL}$  AST. Par contre, la spiruline n'a pas eu cet effet.

Ainsi, tous les extraits, hormis la spiruline, semblent impacter négativement le cycle cellulaire des cellules et plus précisément le bloquer en phase G1.

Concernant AFA, si l'on compare cette expérience avec l'étude du chercheur *Xue X.*, on s'aperçoit que ce résultat est en adéquation avec ses résultats. AFA peut, indirectement, induire des modifications délétères dans le noyau des cellules HL-60. Cela vient perturber la progression dans le cycle cellulaire et induit une apoptose possible des cellules (157).

#### ❖ **Induction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) chez les patients atteints de LMA**



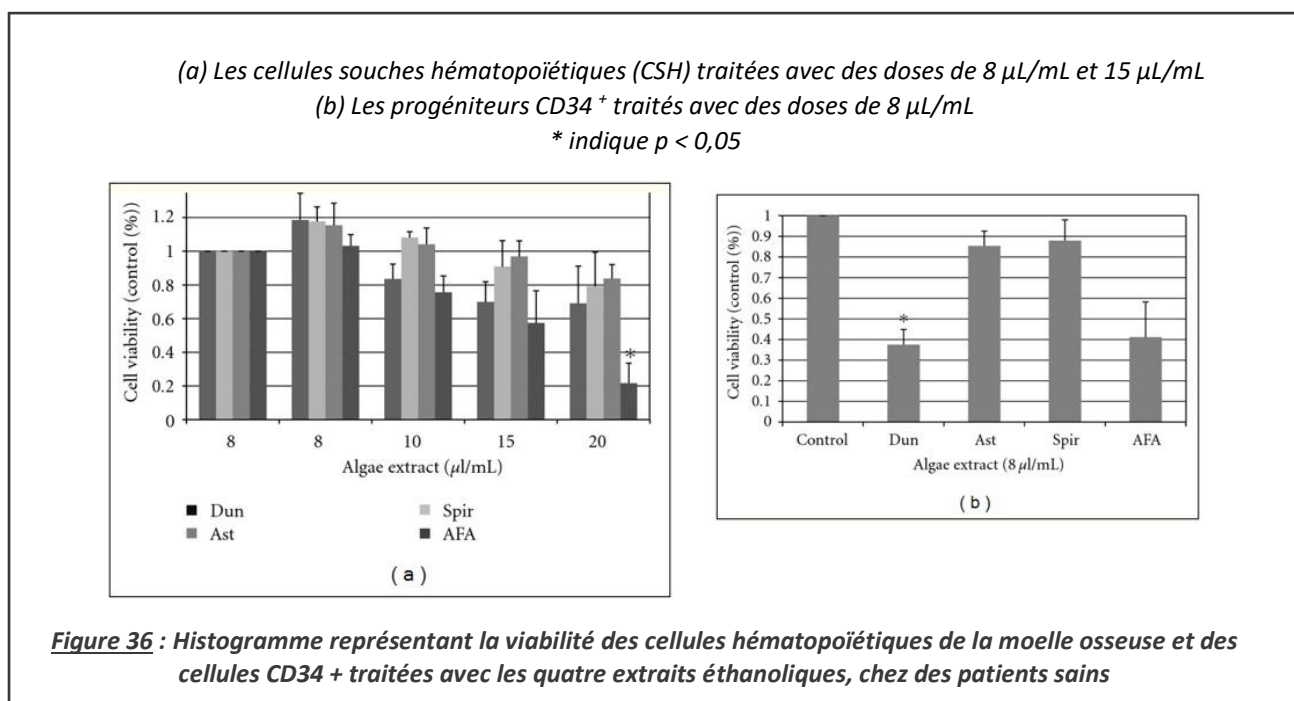
Selon le graphique de la figure 35, on constate à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle positif exposé au peroxyde d'hydrogène. Par contre, pour les quatre autres extraits, on n'observe aucune augmentation significative par rapport au contrôle négatif.

Par conséquent, ces résultats montrent que les extraits étudiés ne sont pas responsables de la formation d'espèces réactives de l'oxygène. L'apoptose observée n'est pas en lien avec l'apparition d'un stress oxydatif. Résultat cohérent du fait qu'AFA renferme de nombreux composants antioxydants assimilables par notre organisme (vitamines, acides aminés, oligoéléments...).

## Cellules saines

### ❖ Viabilité des CSH et progéniteurs hématopoïétiques provenant de moelle osseuse de patient sains

Pour vérifier l'innocuité des quatre extraits sur la moelle osseuse, des CSH ainsi que des progéniteurs, marqués CD34<sup>+</sup> de trois individus en bonne santé ont été cultivées en présence de ces derniers pendant 24 heures. Puis, ces deux types cellulaires ont été analysés à l'aide de la coloration à l'annexine/IP.



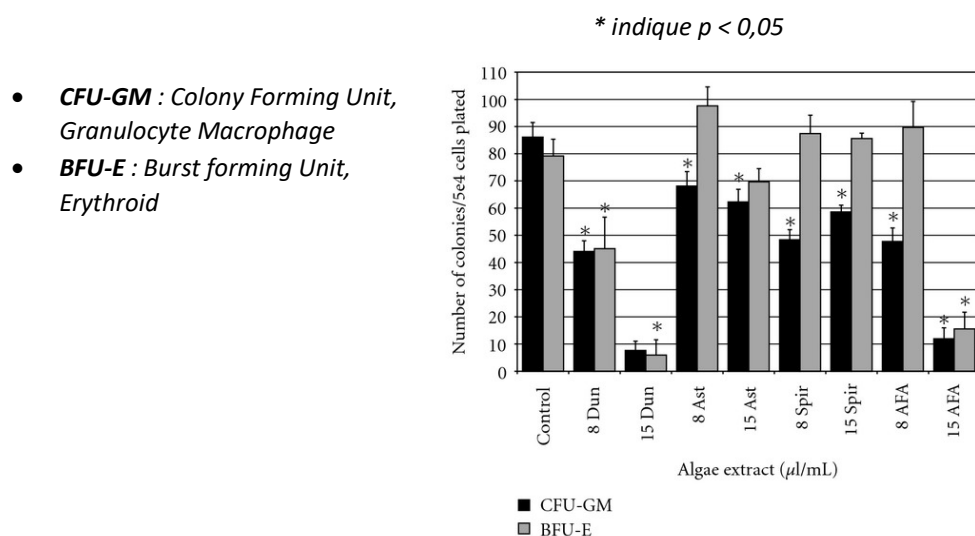
Sur la figure 36 (a), on remarque qu'AFA a considérablement diminué la viabilité des CSH à une concentration de 20  $\mu\text{L/mL}$  par rapport au groupe contrôle. Bien qu'elle ne soit pas significative, on note néanmoins une légère diminution de la viabilité pour les autres extraits.

Sur la figure 36 (b), on observe uniquement une diminution significative de la viabilité des progéniteurs, marqués CD34<sup>+</sup>, pour une concentration en DUN de 8  $\mu\text{L/mL}$  par rapport au contrôle. Néanmoins, on devine qu'à des concentrations supérieures, AFA aurait également entraîné une apoptose de ces derniers.

Cette expérience souligne donc un aspect négatif de DUN et d'AFA puisque d'après ces résultats, elles semblent autant toxiques pour les cellules saines que pour les cellules cancéreuses.

### ❖ Capacité de formation de précurseurs à partir de moelle osseuse de patients sains

Des tests clonogéniques sur les marqueurs de cellules progénitrices granulocytaires-macrophagiques (CFU-GM) et de cellules progénitrices érythrocytaires (BFU-E), provenant de moelle osseuse de sujets sains, ont été utilisés pour poursuivre l'évaluation de la toxicité des extraits des cyanobactéries sur les cellules saines.



**Figure 37 : Effets des quatre extraits éthanoliques sur les marqueurs CFU-GM et BFU-E à partir d'une moelle osseuse de patient sain**

	DUN	AST	SPIR	AFA
<b><u>CFU-GM</u> : Diminution significative par rapport au contrôle</b>				
<b>8 μL/mL</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>15 μL/mL</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b><u>BFU-E</u> : Diminution significative par rapport au contrôle</b>				
<b>8 μL/mL</b>	Oui	Non	Non	Non
<b>15 μL/mL</b>	Oui	Non	Non	Oui

Concernant la formation de colonies de la lignée granulocyte-macrophage, on remarque, sur la [figure 37](#), une diminution significative pour tous les extraits par rapport au contrôle, sauf pour DUN à une concentration de 15 μL/mL ( $p < 0,05$ ).

Ensuite, concernant la formation de colonies de la lignée érythrocytaire, seul DUN aux deux concentrations 8 et 15 μL/mL et AFA à 15 μL/mL a montré une différence significative par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ ). Ainsi, les effets délétères sur les colonies semblent être plus dirigés vers la lignée granulocytes-macrophages que la lignée érythrocytaire.

Pour AFA, nous aurions pu aussi émettre comme hypothèse que lorsqu'elle se développe dans un milieu, elle laisse peu de place aux progéniteurs pour se développer, gênant également la formation du fuseau mitotique nécessaire à la formation des colonies. Cependant étant en présence d'extrait éthanolique, nous sommes donc en présence de cellules mortes.



## **Conclusion de l'étude du chercheur Bechelli J.**

Dans cette étude, bien que certains extraits éthanoliques aient entraîné l'apoptose des cellules leucémiques, il a également été observé des effets cytotoxiques sur les cellules saines.

Si l'on revient sur l'étude du professeur Xue X. vue précédemment, AFA avait elle aussi la capacité d'entraîner une cascade de signalisation intracellulaire ayant pour conséquence d'entraîner des effets délétères dans l'ADN des cellules. Mais, ces effets négatifs n'étaient pas clairement imputables à AFA puisque celle-ci n'avait pas été prélevée au sein du lac Klamath, seule source reconnue comme exempte de toxicité. Ainsi, la toxicité d'AFA du lac Klamath révélée dans cette étude est d'une part surprenante et d'autre part contradictoire avec toutes les autres études menées sur la cyanobactérie AFA : aucune toxicité ni aucune létalité n'ont été détectées pour aucune d'entre elle, même *in vivo* chez l'Homme (157).

Il est possible de douter de ces résultats, des questions se posant concernant la robustesse de la méthode utilisée : la coloration annexine/IP. Effectivement, elle peut donner un pourcentage de faux positifs allant jusqu'à 40 %, ce qui signifie la détection de cellules vivantes comme cellules non viables. L'iodure de propidium ne peut pénétrer dans une cellule que lorsque l'intégrité membranaire de celle-ci est rompue, ce qui arrive en phase d'apoptose tardive ou en nécrose (159).

Toutefois, il est aussi possible que, lors de la préparation des cellules (LMA, LLC) et/ou des extraits pour les expériences, les solvants utilisés aient détérioré les membranes de ces derniers, comme cela peut être le cas pour l'éthanol. De ce fait, l'IP aurait pu traverser la membrane plasmique des cellules sans pour autant que celles-ci ne soient entrées en apoptose. De plus, l'IP est un agent fluorescent intercalant de l'ADN qui se lie aussi bien à l'ADN qu'à l'ARN présent dans le cytoplasme des cellules. Par conséquent, il est possible d'observer une coloration à l'annexine/IP sans pour autant que la cellule ne soit pas viable, ce qui fausse les résultats de l'étude.

En conclusion, nous ne pouvons ni affirmer par cette étude un effet anti-leucémique, ni un effet pro-apoptotique sur les cellules saines pour la cyanobactérie AFA. Néanmoins, des études en parallèle ont montré qu'AFA était un puissant activateur des cellules NK *in vitro*, qui sont capables de tuer certaines cellules tumorales sans sensibilisation préalable en épargnant les cellules saines. Cet effet semble aussi dépendre des autres cellules immunitaires car aucune activation n'a été observée sur les cellules NK isolées. L'effet protecteur d'AFA contre les cancers serait donc le résultat de plusieurs mécanismes concomitants.

Par ailleurs, il a été constaté que les résultats des différentes expériences variaient d'un extrait à l'autre. Cette différence peut s'expliquer tout simplement par une variation de la composition de chaque extrait, dont nous ignorons malheureusement la composition exacte. Il existe donc plusieurs composés et mécanismes à l'origine des différences étudiés.

### **4) La phycocyanine**

Une étude *in vitro* a été menée en 2016 par Scoglio S. *et al.* dans le but d'étudier les effets inhibiteurs d'AFA, provenant du lac Klamath, sur l'enzyme UDP- $\alpha$ -D-glucose-6-déshydrogénase humaine (UGDH). Au cours des expériences, un extrait aqueux d'AFA obtenu à partir d'eau distillée à 100 mg/mL a été utilisé, ainsi qu'un extrait éthanolique obtenu à partir d'éthanol à 100 mg/mL. De plus, à partir de la préparation hydrophile, il a été extrait les composants suivants ont été extraits : la phycocyanine (PC), la phycocyanobiline (PCB) et les mycosporine-like amino-acides (MAA), pour étudier leurs effets séparément (160) (161).

## UGDH : rôle dans le cancer

L'UGDH est une enzyme cytosolique qui catalyse la conversion de l'UDP-glucose (UDP-Glc) en acide UDP-glucuronique (UDP-GlcA) grâce à l'utilisation du  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur. Précurseur de la synthèse des protéoglycanes et glycosaminoglycanes, l'acide glucuronique entre ensuite dans la composition de l'acide hyaluronique (AH).



L'acide hyaluronique est le composant principal du tissu conjonctif et de la matrice extracellulaire dans laquelle baignent les cellules. Aujourd'hui, il a été montré que des taux élevés d'acide hyaluronique étaient impliqués dans la progression de nombreux cancers : épithélial, prostatique, ovarien, mammaire et colique (162). Les cellules cancéreuses ont la particularité de sécréter de la hyaluronidase responsable du découpage de cet acide hyaluronique en des fragments de bas poids moléculaires. Ces fragments ont plusieurs rôles : un rôle pro-angiogénique, un rôle inflammatoire et un rôle dans la migration des cellules cancéreuses vers les tissus.

## Test d'activité UGDH

L'activité de l'UGDH a été mesurée en présence de concentrations croissantes d'extraits aqueux et éthanoliques d'AFA (jusqu'à 160  $\mu\text{L/mL}$ ), ainsi qu'en présence isolément de phycocyanine (jusqu'à 7  $\mu\text{M}$ ), de phycocyanobiline (jusqu'à 16 nM) et des mycosporine-like amino-acides (jusqu'à 5  $\mu\text{M}$ ). Dans cette recherche, le mécanisme de l'inhibition d'UGDH par AFA a été considéré comme double : antagonisme d'une part d'UDP-Glc et d'autre part du cofacteur  $\text{NAD}^+$ .

### ❖ Effets des MAA seuls

Les MAA n'ont pas eu d'effet significatif sur l'UGDH aux concentrations testées. L'activité enzymatique est restée inchangée et par conséquent ces composés ne sont pas impliqués ici.

### ❖ Effets de la phycocyanine seule

La phycocyanine a montré une inhibition dose-dépendante de l'activité de l'UGDH et ce en agissant comme un inhibiteur mixte par rapport à UDP-Glc et au cofacteur  $\text{NAD}^+$ . La phycocyanine étant une protéine photosynthétique de 37 kDa, l'antagonisation pourrait être due à son volume stérique (163).

### ❖ Effets de la phycocyanobiline seule

Concernant la phycocyanobiline, possédant un poids moléculaire plus faible, il a été observé une inhibition compétitive par rapport à UDP-Glc et une inhibition non compétitive par rapport à  $\text{NAD}^+$ . Ici, le mécanisme de ces deux d'inhibitions reste encore à définir par les chercheurs.

### ❖ Extraits hydrophile et éthanolique

Enfin, pour les deux types extraits d'AFA, aqueux et éthanolique, il a été observé une diminution significative et dose-dépendante de l'activité de l'UGDH.

Pour l'extrait hydrophile, on comprend ce résultat car il se compose de phycocyanine et phycocynobiline qui ont, précédemment, démontré un rôle dans la diminution de l'activité de l'UGDH. Par contre, il existe peut-être aussi au sein de cet extrait d'autres composés renforçant cette action.

Concernant l'extrait éthanolique, où l'on retrouve principalement de la chlorophylle et des caroténoïdes, il est surprenant que l'on observe les mêmes effets que pour l'extrait hydrophile puisqu'il est dépourvu de phycocyanine et phycocynobiline.

Cela implique donc qu'il y a des composants dans les deux extraits responsables de la diminution de l'activité de l'UGDH.

### Inhibition de la formation de colonies par la phycocyanine

Dans cette expérience, les chercheurs montrèrent que la phycocyanine contenue dans AFA avait permis de réduire de manière dose-dépendante la formation de colonies de cellules cancéreuses de la prostate PC-3 et de la thyroïde FTC-133. La concentration maximale de phycocyanine utilisée dans leurs essais était de 100 nM.

Par ces résultats, la phycocyanine aurait donc la capacité de moduler la prolifération des cellules cancéreuses. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés par la réalisation d'autres expériences futures plus approfondies pour évaluer les mécanismes biochimiques impliqués dans les propriétés antiprolifératives de la phycocyanine, par l'inhibition de l'UGDH et/ou d'autres voies.

### Réduction de la glucuronidation phytochimique

L'UDP-GlcA est un composé ayant un rôle dans la glucuronidation des xénobiotiques, réaction indispensable pour rendre des composés, comme les médicaments, plus hydrosolubles pour faciliter leur élimination. De nombreux composés antioxydants comme les polyphénols ou encore des médicaments subissent cette glucuronidation, ce qui réduit leur biodisponibilité et donc leurs effets cliniques.

<b>Medicaments/Polyphenols + Acide UDP glucuronique</b> $\xrightarrow{\text{glucuronidation}}$ <b>Composés hydrosolubles</b>
--

De ce point de vue, il serait intéressant d'étudier *in vivo* si la co-administration orale de médicaments ou composés antioxydants avec AFA, pourrait améliorer leurs biodisponibilités.

### Conclusion de l'étude

Ici, il a été démontré que la phycocyanine et la phycocyanobiline contenues dans AFA diminuaient efficacement et de manière dose-dépendante l'activité de l'UGDH humaine. Ainsi, AFA réduit la croissance des cellules tumorales en limitant l'angiogenèse et l'invasion tissulaire des cellules cancéreuses *in vitro*.

Ces pigments chlorophylliens ont un possible rôle dans la biodisponibilité et peuvent augmenter l'effet clinique des substances, ou des médicaments, en diminuant leur élimination. Utilisés en pratique, ils pourraient renforcer l'efficacité des anticancéreux pour vaincre le cancer.

Par ailleurs, d'autres composants, comme la chlorophylle et/ou les caroténoïdes, contenus dans AFA ont également réduit l'activité de cette enzyme. Ainsi, certains composants d'AFA possèdent une forte activité biologique, activité déjà observée dans des études antérieures sur des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Cependant, il faut rester critique face à ses résultats observés dans cette étude *in vitro*. Si l'on tient compte de la digestion chez l'Homme toute protéine ingérée est digérée avant que celle-ci ne passe dans le sang. Les pigments photosynthétiques comme la chlorophylle, la phycocyanine ou la phycocyanobiline ne pourront donc pas se retrouver dans le sang pour exercer leurs effets antioxydants.

#### 5) Etude du complément alimentaire « Alpha sun »

En 1994, l'équipe de recherche du professeur N. Lahitová, s'est intéressée au complément alimentaire "Alpha Sun" pour déterminer s'il possédait des propriétés antimutagènes. Ce complément se compose à 95 % d'AFA, mais on y retrouve également de la Spiruline et de la Chlorelle en partie minoritaire. Pour déterminer l'effet antimutagène, un test d'Ames a été effectué. Ce test consistait à administrer un mutagène, le Nitrovin, pour induire des mutations dans différentes souches de *Salmonella typhimurium*.

Les résultats ont montré que l'ajout simultané d'Alpha sun avec le Nitrovin dans le milieu de culture de l'étude n'a pas réduit l'activité du mutagène et ceci pour toutes les souches de *Salmonella typhimurium*. Par contre, lorsqu'Alpha Sun a été ajouté au milieu 2 à 24 heures avant l'introduction du Nitrovin, l'activité mutagène de ce dernier a été réduite. Cette diminution n'a pas été constatée pour toutes les souches de *Salmonella typhimurium*.

Ici, étant face à un mélange de cyanobactéries et même si AFA est majoritaire, pour affirmer que cette cyanobactérie est bien responsable d'une activité antimutagène, les chercheurs doivent travailler uniquement sur cette dernière. A ce jour, nous ne pouvons pas conclure que l'effet antimutagène observé dans cette étude est bien un effet d'AFA (164).

#### 6) Conclusion

Perte de cheveux, nausées, vomissements, diminution des globules blancs sanguins, douleurs articulaires, fatigue... nombreux sont les effets indésirables rencontrés par les patients sous chimiothérapie. Soigner un organe sans pour autant en rendre un autre pathologique voilà toute la complexité de la médecine d'aujourd'hui. Par ses nombreuses propriétés, AFA pourrait donc devenir le complément alimentaire de référence pour soutenir les patients atteints de cancer. Néanmoins, la recherche doit se poursuivre pour la cyanobactérie AFA car les études sont encore trop fragiles mais les premiers résultats sont encourageants.

## G. Effet sur le système cardiovasculaire

Les maladies cardiovasculaires, dont la principale étiologie est l'athérosclérose, représentent la première cause de décès dans le monde et la deuxième cause de décès en France.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui a pour conséquence un dépôt de plaque sur la paroi des artères, principalement composée de lipides dont des LDL-cholestérol oxydés. Ce dépôt entraîne une réduction et/ou une obstruction complète du calibre des vaisseaux et donc provoquer des infarctus du myocarde, des artérites, des thromboses... Un des principaux facteurs connus de l'athérosclérose est la consommation excessive de cholestérol et d'acides gras saturés, graisses de plus en plus retrouvées dans notre alimentation actuelle.

Grâce à sa composition riche en anti-oxydants (vitamines, acides aminés, oligoéléments, caroténoïdes), AFA possède d'incroyables atouts pour combattre l'oxydation des lipides, comme les LDL-cholestérol. Bien qu'AFA contienne des pigments photosynthétiques anti-oxydants, comme la chlorophylle ou la phycocyanine, ces derniers ne pourront pas exercer leurs effets sur les cellules puisqu'ils seront dégradés par des enzymes au niveau du tube digestif.

AFA aussi présente une teneur importante en acides gras polyinsaturés, notamment de l'acide linoléique ayant un effet hypocholestérolémiant scientifiquement démontré.

En 2000, une étude menée par le neurophysiologiste Christian Drapeau montra les bienfaits d'AFA sur le taux de lipides sanguins sur 32 rats. Au cours de cette expérience, les rats furent nourris selon quatre régimes différents (165)

- 1<sup>er</sup> groupe (Témoin) : alimentation habituelle + 5 % d'huile de graine de soja (SBO)
- 2<sup>ème</sup> groupe : alimentation sans AGPI + 5 % d'huile de noix de coco (PUFA-D)
- 3<sup>ème</sup> groupe : alimentation sans AGPI + 4,50 % d'huile de noix de coco + **10 % d'AFA** (Alg10)
- 4<sup>ème</sup> groupe : alimentation sans AGPI + 4,25 % d'huile de noix de coco + **15 % d'AFA** (Alg15)

Dans cette étude, il n'a pas été communiqué la quantité d'alimentation habituelle ingérée par les rats. Mais, on peut estimer que cet animal a une capacité d'ingestion quotidienne entre 6 à 10 % de son poids, soit environ 20-25 grammes de nourriture par jour pour un rat adulte.

Ici, pour les groupes 3 et 4, l'huile de coco a été volontairement laissée pour démontrer qu'AFA permettait de corriger la déficience en polyinsaturés retrouvée dans le groupe PUFA-D. L'apport de cette cyanobactérie permettrait de rétablir un profil similaire au groupe SBO comportant une forte teneur en AGPI.

L'huile de soja utilisée dans le groupe SBO a été utilisée comme témoin, d'une part en raison de sa forte teneur en AGPI (50 g d'AGPI pour 100 g d'huile) ; et d'autre part en raison de son effet régulateur connu sur les lipides sanguins.

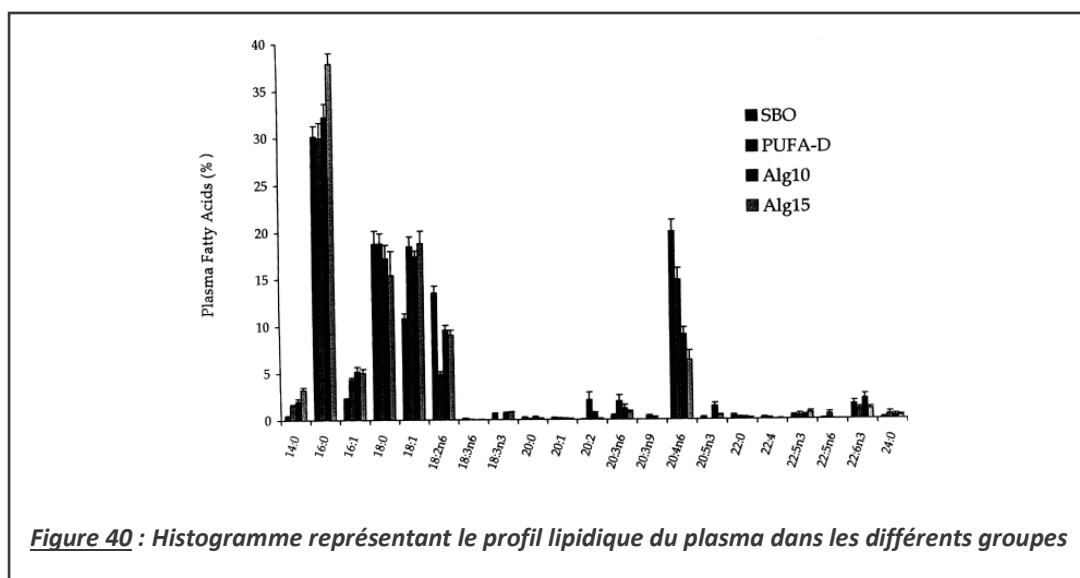
Après 32 jours, les chercheurs ont étudié le taux d'acides gras, de triglycérides et de cholestérol total dans le plasma de ces rats.

	SBO	PUFA-D	Alg10	Alg15
<b>Oil Source</b>				
Soybean oil	5.00	0.00	0.00	0.00
Coconut oil	0.00	5.00	4.50	4.250
Algae	0.00	0.00	10.00	15.00
<b>Total fat</b>	5.00	5.00	5.13	5.20
<b>Fatty Acid Content</b>				
Linoleic acid	2.22	0.00	0.05	0.07
(18:2n-6)				
Linolenic acid	0.40	0.00	0.14	0.21
(18:3n-3)				
Total polyunsaturated (PUFA)	2.62	0.00	0.19	0.28
Lauric acid (12:0)	0.00	2.11	1.89	1.79
Myristic acid (14:0)	0.00	1.12	1.07	1.04
Palmitic acid (16:0)	0.73	0.91	1.05	1.12
Stearic acid (18:0)	0.27	0.00	0.02	0.03
Oleic acid (18:1)	1.34	0.00	0.04	0.06
Total saturated (SFA)	1.00	4.14	4.03	3.95
PUFA/SFA	2.62	0.00	0.05	0.07
n-6/n-3	5.55	-	0.36	0.36

**Figure 38 : Composition en acides gras des quatre régimes administrés aux rats**

	Soybean oil	Coconut oil	Algae
Caprylic (8:0)	-	9.70	-
Capryc (10:0)	-	7.50	-
Lauric (12:0)	-	42.10	-
Myristic (14:0)	-	22.40	9.10
Palmitic (16:0)	14.69	18.20	36.60
Palmitoleic (16:1)	-	-	11.90
Margaric (17:0)	-	-	0.89
Stearic (18:0)	5.40	-	2.70
Oleic (18:1)	26.80	-	6.70
Linoleic (18:2n-6)	44.40	-	7.40
Linolenic (18:3n-3)	8.00	-	22.30
Arachidic (20:0)	0.35	0.14	-
Arachidonic (20:4n-6)	-	-	0.65
Eicosapentaenoic (20:5n-3)	-	-	0.08
Behenic (22:0)	0.33	-	-
Total polyunsaturated	52.40	-	30.43
Total saturated	20.77	100.04	49.29

**Figure 39 : Composition en acides gras de l'huile de soja, l'huile de coco et AFA**



### Groupe SBO

On observe sur la [figure 40](#), une concentration plus importante d'acide linoléique pour le groupe SBO, ce qui est cohérent puisque, d'après les données du tableau, on en retrouve plus dans l'huile de soja. Par conséquent, on observe une augmentation de la concentration en acide arachidonique dont il est le précurseur.

### Groupe PUFA-D

La concentration en acide linoléique est de 36 % de la valeur de la concentration du groupe SBO. L'huile de coco en étant dépourvue, ce taux semble représenter la concentration basale d'acide linoléique présent dans le plasma de tous les rats. Il en est de même pour l'acide arachidonique.

### Groupe Alg10 / Alg15

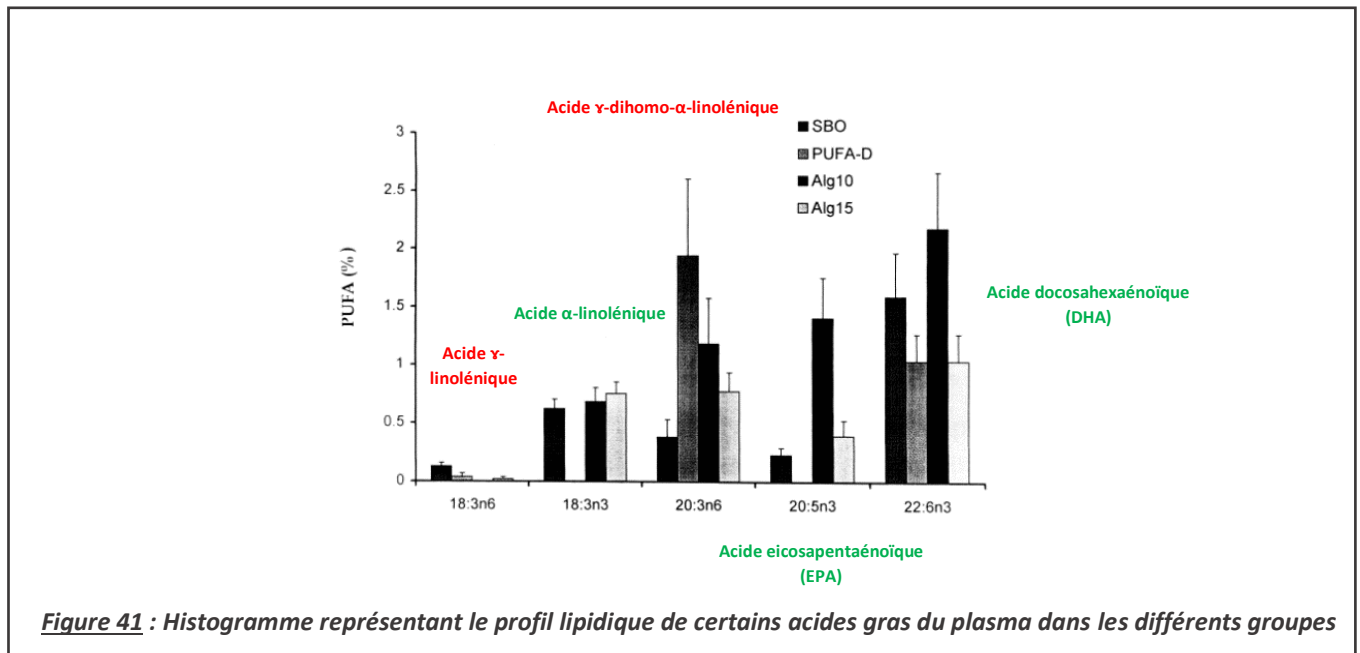
Dans ces deux groupes, la concentration en acide linoléique est restaurée à 71 % (Alg10) et 67 % (Alg15) de la valeur de la concentration du groupe SBO et ce, malgré le fait que les régimes supplémentés en cyanobactérie contiennent moins de 3 % de la quantité d'acide linoléique présent dans l'huile de soja. La restauration étant plus importante pour le groupe Alg10, cela suggère un effet non-dose-dépendant.

Ensuite, on remarque que seuls les groupes supplémentés en AFA reçoivent un apport en acide arachidonique, et pourtant ce niveau est diminué dans le plasma, de manière dose-dépendante, ce qui est contre-intuitif. En effet, on devrait observer une accumulation de ce dernier, augmentant la présence d'AGPI de la famille des  $\omega$ -6 dans le plasma. Ici, cette différence peut s'expliquer par la présence de phycocyanine. Possédant des propriétés anti-inflammatoires, elle semble impliquée dans l'inhibition de la synthèse de l'acide arachidonique dont les précurseurs sont soit déjà présents dans le plasma soit apportés par AFA. Bien qu'effectivement cette cyanobactérie apporte des AGPI de la famille des  $\omega$ -6, dont de l'acide arachidonique, cela ne suffirait pas à contrebalancer ce potentiel blocage de la conversion de l'acide linoléique.

Les mécanismes de l'inhibition de la formation de l'acide arachidonique restent aujourd'hui encore à démontrer mais si tel était le cas, l'utilisation d'AFA serait une thérapeutique très prometteuse car elle agirait à la fois en amont et en aval de l'inflammation.

### Comparaison groupe SBO / PUFA-D

On remarque que lorsqu'on a une consommation plus riche en acide linoléique, on a une augmentation de la concentration plasmatique d'acide arachidonique, ce qui est logique car l'acide linoléique est son précurseur. Etant donné qu'il y a plus d'acide linoléique dans l'huile de soja que dans l'huile de coco (nul), il est logique de retrouver plus d'acide arachidonique dans le groupe 1 que dans le groupe 2.



**Figure 41 :** Histogramme représentant le profil lipidique de certains acides gras du plasma dans les différents groupes

Sur la [figure 41](#), pour tous les groupes de l'étude, aucun apport en DHA n'était présent dans les régimes : l'apparition de cet ω-3 s'explique, ici, par une conversion dans le plasma de l'EPA en DHA.

### Groupe PUFA-D

On n'observe aucune trace d'acide α-linolénique et d'EPA dans le plasma. Cette observation est cohérente avec l'absence de ces acides gras dans l'huile de coco. On observe également une augmentation de l'acide γ-dihomo-α-linolénique cinq fois au-dessus de la valeur du groupe SBO.

### Groupe Alg10 / Alg15

Premièrement, dans ces deux groupes, la concentration en acide α-linolénique est restaurée au niveau de la valeur de la concentration du groupe SBO. Malgré le fait que les régimes supplémentés en algue ne contiennent seulement 35 % (Alg10) et 52 % (Alg15) de la quantité d'acide α-linolénique présent dans l'huile de soja. Ce qui suggère un effet non dose-dépendant.

Deuxièmement, on constate qu'une supplémentation en AFA permet de diminuer la concentration plasmatique d'acide γ-dihomo-α-linolénique de manière dose-dépendante par rapport à la concentration du groupe PUFA-D mais pas assez pour être au même niveau que celle du groupe SBO.

Troisièmement, on remarque que pour une supplémentation avec 10 % d'AFA, on observe une multiplication par 6 de la concentration plasmatique d'EPA ( $p < 0,005$ ) ainsi qu'une augmentation de la concentration plasmatique de DHA multipliée par 2 par rapport au groupe SBO.



De plus, pour une supplémentation avec 15 % d'AFA, on observe un niveau similaire de la concentration plasmatique d'EPA par rapport au groupe SBO. Par contre, cette supplémentation n'a pas suffi à remonter le niveau de DHA dans le plasma par rapport à ce groupe.

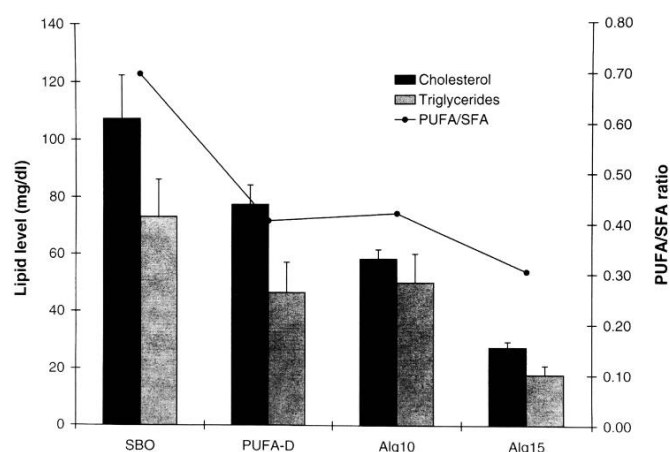
### **Conclusion sur les AGPI**

On a observé qu'une supplémentation du groupe PUFA-D avec AFA permettait de normaliser les taux d'acide gras dans le plasma d'animaux déficients en AGPI les rendant ainsi similaire au groupe SBO.

Ensuite, la différence observée entre les groupes Alg10 et Alg15 sur la concentration en EPA et DHA peut s'expliquer par une meilleure biodisponibilité d'AFA par rapport à l'huile de soja. Même si elle présente une concentration d'AGPI plus faible au départ que la concentration du groupe SBO, au final une quantité plus importante arrivera à la circulation sanguine. Un autre point important que souligne cette étude est que cette biodisponibilité n'est pas un phénomène dose-dépendant. Pour une supplémentation de 15 % d'AFA, on observe plutôt une tendance à la diminution des acides gras EPA ou DHA. Par conséquent, il est possible que la biodisponibilité des acides gras d'AFA ne dépende pas que de la dose ingérée.

Selon les données des tableaux, on constate qu'une supplémentation avec 10 % d'AFA apporte une concentration plus importante d'acides gras saturés par rapport au groupe SBO. On peut donc se demander s'il existe un lien direct entre cette augmentation d'apport et l'augmentation de la concentration d'EPA / DHA retrouvée dans le plasma des groupes Alg10 et Alg15. D'après une étude menée en parallèle en 1988, ce phénomène s'expliquerait par une augmentation de la conversion de l'acide  $\alpha$ -linoléique en EPA en présence d'une forte consommation en acide gras saturés. A l'inverse, une alimentation riche en acide gras polyinsaturés de la famille des  $\omega$ -6 entraînerait une diminution de cette conversion de 40 à 50 %. D'après ces données, cela pourrait effectivement expliquer le fait que les rats nourris avec 10 % d'AFA (équivalent à 2 g d'AFA) ont des taux sanguins plus élevés d'EPA que les rats alimentés avec 15 % d'AFA (équivalent à 3 g d'AFA) (166).

### **Triglycérides et cholestérol total**



**Figure 42 : Histogramme représentant les concentrations sanguines de cholestérol et de triglycérides dans les 4 groupes**

Sur la [figure 42](#), on observe que le taux cholestérol total et le taux de triglycérides sont positivement corrélés : quand le taux de cholestérol diminue, le taux de triglycérides diminue également et inversement.

### **Groupe PUFA-D**

On n'observe aucune différence significative des triglycérides par rapport au groupe SBO. A l'inverse, la diminution du taux de cholestérol total est bien significative par rapport à ce groupe.

### **Groupe Alg10 / Alg15**

La supplémentation alimentaire avec AFA a respectivement réduit le cholestérol total plasmatique jusqu'à 54 % (Alg10) et 25 % (Alg15) par rapport à la valeur groupe SBO. Dans le groupe Alg15, la concentration en triglycérides a diminué significativement jusqu'à 24 % de la valeur de la concentration du groupe SBO ( $p < 0,005$ ). Par contre, aucune réduction significative n'a été observée pour le groupe Alg10.

On note également que la diminution du cholestérol total et des triglycérides est positivement corrélée à la diminution du rapport PUFA/SFA et à la diminution de la concentration d'acide stéarique. A l'inverse, la concentration plasmatique d'acide myristique et la quantité d'acide palmitique ingérées sont négativement corrélées au taux de cholestérol.

### **Conclusion sur le cholestérol total et les triglycérides**

Les principaux acides gras saturés présents dans le régime des groupes traités par AFA sont des acides laurique, myristique et palmitique, ce dernier étant retrouvé en forte concentration dans le plasma du groupe Alg15. Pour ces acides gras, il a été démontré que tous favorisaient l'hypercholestérolémie.

Ceci suggère que l'effet hypocholestérolémiant d'AFA est susceptible d'être médié par d'autres facteurs que la teneur en acides gras saturés et polyinsaturés. Cet effet pourrait provenir d'un de ses composants : la chlorophylle, pigment possédant un fort pouvoir antioxydant. Représentant 1 % du poids sec d'AFA, il a été démontré que la chlorophylle permettait de stimuler la fonction hépatique, d'augmenter la sécrétion biliaire et de réguler les taux sanguins de cholestérol. Mais étant une protéine, nous sommes obligés d'exclure cette hypothèse car cette dernière ne peut se retrouver au niveau sanguin puisqu'elle est digérée au niveau du tube digestif.

En conclusion, on peut dire qu'une supplémentation avec de l'AFA a permis de réduire significativement les taux de cholestérol total et de triglycérides dans le plasma des animaux déficients en acides gras polyinsaturés. La prise d'AFA apparaît donc plus bénéfique que la prise d'huile de soja. Par contre, dans cet essai, seul le cholestérol total a été étudié. Il faudrait donc réitérer cette expérience en séparant les LDL, dits mauvais cholestérol, du HDL, bon cholestérol.

### **Conclusion de l'étude**

Du fait qu'AFA possède un effet hypolipidémiant et hypotriglycéridémiant, cette cyanobactérie présente un véritable intérêt dans la prévention du développement de l'athérosclérose, d'une part grâce à sa richesse en  $\omega$ -3; et d'autre part grâce à sa richesse en vitamines, acides aminés et oligoéléments. De plus, la capacité d'AFA à augmenter les taux dans le plasma d'acide linoléique, d'EPA et de DHA, en fait un bon complément pour la recherche nutritionnelle future chez l'Homme.

Cependant, l'athérosclérose ne se manifeste pas uniquement par l'accumulation passive de lipides dans les parois des artères : il s'agit également d'une maladie inflammatoire. Au début de son développement, les fonctions normales de l'endothélium sont altérées et donc une réponse inflammatoire va être générée entraînant un recrutement de cellules inflammatoires circulantes comme les monocytes. Ceci, à son tour, prédispose la paroi vasculaire à l'accumulation de lipides.

Ayant une forte teneur en phycocyanine, AFA pourrait aussi contrer les effets de l'inflammation en diminuant les taux d'acide arachidonique dans le plasma, en agissant sur les enzymes et les molécules pro-inflammatoires et en agissant également sur le système immunitaire en modulant la réponse des divers acteurs comme les monocytes. Comme la chlorophylle, cette protéine est digérée par les enzymes intestinales, mais des effets de la phycocyanine sur l'inflammation ont néanmoins été démontrés dans l'étude du professeur Shih *et al.* (129).

## H. Effet sur le poids des organes et la digestion

L'apport des cyanobactéries dans l'alimentation humaine constitue une source incroyable de protéines, de minéraux, de vitamines, ainsi que d'autres substances biologiquement actives.

En 2001, une étude fut menée, par RI Kushak et son équipe, chez des rats pour mesurer l'effet de la consommation d'AFA sur le poids des organes et la digestion des animaux. Le but était de tester l'efficacité d'AFA, à des concentrations variables, sur la nutrition animale et d'en évaluer le rôle dans l'assimilation des nutriments (167).

Les rats sélectionnés pour l'étude sont des mâles pesants entre 150 g et 170 g. Les animaux furent divisés au hasard en cinq groupes de huit individus. Tout au long de l'étude, l'alimentation et l'approvisionnement en eau fut à volonté.

	<b>% d'AFA mélangé à la nourriture des rats</b>	<b>Concentration d'AFA en mg/jour (Rats de 200 g consommant 15 g/jour de Purina Chow)</b>	<b>Equivalence en apport chez l'homme en g</b>
<b>Groupe n°1 (contrôle)</b>	0	0	0
<b>Groupe n°2</b>	0,05	7,5	2,62
<b>Groupe n°3</b>	0,10	15	5,24
<b>Groupe n°4</b>	0,20	30	10,48
<b>Groupe n°5</b>	0,40	60	20,96

La croissance des animaux fut contrôlée chaque semaine pendant une période de 28 jours. A la fin de l'expérience, les rats avaient jeuné la dernière nuit et avaient été sacrifiés le lendemain par inhalation de dioxyde de carbone. Leur sang avait été recueilli par ponction cardiaque et centrifugé pour obtenir le plasma. Ensuite, le foie, le rein, la rate, le caecum ainsi que le petit et gros intestin avaient été prélevés et congelés dans de l'azote liquide à - 80°C.

## Effet sur la prise de poids et la prise alimentaire des rats

Contrôle :  $n = 7$  et Groupe :  $n = 8$   
Avec  $*p < 0,05$  versus contrôle

<u>Group</u>	<u>Initial weight</u>	<u>Final weight</u>	<u>Weight gain</u>
Control	211.12±2.55	405.14±13.56	192.57±12.36
0.05% AFA	209.25±4.27	431.88±10.52	*222.62± 9.48
0.10% AFA	211.50±1.96	412.12±11.72	200.69±11.23
0.20% AFA	204.00±4.78	407.62± 9.47	203.62±11.26
0.40% AFA	208.00±2.38	422.88± 6.67	218.88± 5.17

**Figure 43: Effets d'AFA sur le poids des rats**

Contrôle :  $n = 7$  et Groupe :  $n=8$   
Avec  $*p < 0,05$  versus contrôle

<u>Group</u>	<u>Feed consumption</u>	<u>Feed efficiency ratio</u>
Control	795.86±28.33	4.20±0.20
0.05% AFA	*867.25±23.17	3.91±0.08
0.10% AFA	817.88±27.61	4.02±0.21
0.20% AFA	808.38±21.70	4.01±0.12
0.40% AFA	834.88±14.40	3.89±0.06

**Figure 44 : Effet d'AFA sur la consommation totale d'aliments et le ratio d'efficacité**

Selon les résultats du tableau de la [figure 43](#), on remarque que le poids initial moyen des rats dans tous les groupes était similaire et que, pour tous, à la fin de l'étude, ce poids avait augmenté. Cependant, la prise de poids du groupe recevant une supplémentation en AFA de 0,05 % était significativement supérieure de 16 % par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ ).

En comparant cette donnée aux valeurs du tableau de la [figure 44](#), on s'aperçoit que la quantité totale de nourriture consommée au cours de l'expérience était significativement plus élevée dans ce groupe. Par conséquent, le gain de poids du groupe ayant consommé 0,05 % d'AFA semble être lié uniquement à la quantité de nourriture consommée.

Ce résultat peut d'ailleurs être confirmé en vérifiant le ratio d'efficacité alimentaire : ce ratio correspond au gain de poids observé en fonction de la quantité d'aliment ingérée : plus il est augmenté est plus la prise de poids est importante pour la même quantité ingérée. On observe qu'une supplémentation de 0,05 % d'AFA, n'entraîne aucune différence significative de ce ratio par rapport au contrôle.

Ainsi, une faible consommation d'AFA n'a pas d'impact direct sur la prise de poids des rats, en effet, elle semble augmenter uniquement, de manière non-dose dépendante, l'appétit de ces derniers, d'où une augmentation de leur consommation alimentaire.

## Effet sur le poids des viscères

Contrôle :  $n = 7$  et Groupe :  $n = 8$   
Avec  $ap < 0,05$  /  $bp < 0,025$  /  $cp < 0,005$  versus contrôle

Group	Liver	Kidney	Pancreas	SI	LI	Cecum	Spleen
Control	3.00 $\pm 0.13$	0.79 $\pm 0.03$	0.06 $\pm 0.01$	2.05 $\pm 0.04$	0.40 $\pm 0.02$	1.32 $\pm 0.10$	0.19 $\pm 0.01$
0.05% AFA	a3.31 $\pm 0.08$	0.77 $\pm 0.03$	0.09 $\pm 0.02$	1.95 $\pm 0.04$	0.38 $\pm 0.02$	1.35 $\pm 0.07$	b0.16 $\pm 0.01$
0.10% AFA	3.08 $\pm 0.08$	0.71 $\pm 0.03$	b0.09 $\pm 0.01$	2.13 $\pm 0.08$	0.38 $\pm 0.01$	1.43 $\pm 0.09$	0.18 $\pm 0.01$
0.20% AFA	2.98 $\pm 0.08$	0.79 $\pm 0.03$	b0.09 $\pm 0.01$	b1.92 $\pm 0.04$	0.34 $\pm 0.02$	1.36 $\pm 0.05$	0.16 $\pm 0.02$
0.40% AFA	3.05 $\pm 0.07$	b0.71 $\pm 0.02$	a0.08 $\pm 0.01$	2.13 $\pm 0.03$	c0.31 $\pm 0.01$	1.33 $\pm 0.04$	b0.15 $\pm 0.01$

**Figure 45 : Effet d'AFA sur le poids des viscères (g/100 g de poids corporel)**

Selon ces résultats (figure 45), on note une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du poids du foie chez les rats du groupe n°2 ainsi qu'une augmentation significative du poids du pancréas chez le groupe n°3 et n°4 ( $p < 0,025$ ) et n°5 ( $p < 0,05$ ) par rapport au groupe contrôle.

Par contre, sont significativement plus faibles : le poids de l'intestin grêle des rats nourris avec 0,20 % d'AFA ( $p < 0,025$ ), le poids du gros intestin des rats nourris avec 0,4 % d'AFA ( $p < 0,005$ ) et le poids de la rate des rats nourris avec 0,05 % et 0,40 % d'AFA ( $p < 0,025$ ).

## Études biochimiques

Pour évaluer l'effet d'AFA sur l'absorption des nutriments, il a ensuite été étudié l'activité des enzymes intestinales responsables de la digestion des glucides complexes et des protéines : plus leurs activités augmentent et plus l'absorption des nutriments sera importante.

Contrôle :  $n = 7$  et Groupe :  $n = 8$   
Avec  $ap < 0,05$  /  $bp < 0,025$  versus contrôle

Enzymes	Control	0.05% AFA	0.1% AFA	0.2% AFA	0.4% AFA
$\alpha$ -Amylase	457.48 $\pm 70.57$	518.99 $\pm 80.16$	633.51 $\pm 91.02$	a1013.95 $\pm 236.06$	500.00 $\pm 87.00$
Trypsin	110.76 $\pm 17.19$	135.05 $\pm 12.40$	201.72 $\pm 11.68$	167.82 $\pm 31.00$	154.52 $\pm 19.00$
Sucrase	204.41 $\pm 30.72$	191.09 $\pm 47.28$	145.09 $\pm 17.36$	177.04 $\pm 16.58$	153.20 $\pm 33.87$
Maltase	839.39 $\pm 104.66$	976.59 $\pm 221.38$	787.58 $\pm 80.41$	965.63 $\pm 122.17$	708.58 $\pm 150.33$
ApN	188.17 $\pm 33.84$	b92.33 $\pm 25.24$	b93.04 $\pm 18.25$	182.79 $\pm 24.47$	142.46 $\pm 22.64$

**Figure 46 : Effets d'AFA sur l'activité des enzymes pancréatiques et intestinales**

Selon ces résultats (figure 46), une supplémentation de 0,20 % d'AFA (groupe n°4) augmente de manière significative l'activité de l'alpha-amylase pancréatique jusqu'à la doubler ( $p < 0,05$ ). Cette enzyme est responsable du catabolisme des glucides à longue chaîne tel que l'amidon.

A l'inverse, l'activité de l'aminopeptidase N, responsable de l'hydrolyse des protéines, a diminué dans les groupes n°2 et n°3 ( $p < 0,025$ ) par rapport au groupe contrôle.

Par contre, pour tous, on ne constate aucune différence significative sur l'activité des disaccharidases intestinales (sucrase et maltase) et sur l'activité de la trypsine par rapport au groupe contrôle.

Contrôle : n = 7 et Groupe : n=8 Avec ap < 0,05 / bp < 0,025 versus contrôle			
Groups	Intestinal mucosa	Liver	Pancreas
Control	32.45±8.83	171.08±14.44	29.48±5.40
0.05% AFA	<sup>b</sup> 64.11±11.18	203.97±11.95	25.06±5.44
0.10% AFA	48.96±5.56	<sup>a</sup> 207.36±10.90	<sup>b</sup> 18.38±1.41
0.20% AFA	49.28±5.11	193.75±8.94	24.61±3.33
0.40% AFA	<sup>b</sup> 55.02±5.74	186.78±8.15	28.38±4.43

**Figure 47 : Effets d'AFA sur les niveaux de protéines dans les viscères**

Concernant la quantité de protéines présentes dans la muqueuse intestinale (figure 47), on constate une différence significative, soit une augmentation ( $p < 0,0025$ ), chez les rats recevant une supplémentation de 0,05 % et 0,40 % d'algues par rapport au groupe contrôle. De même, on constate une différence significative, soit une augmentation ( $p < 0,05$ ), chez les rats recevant une supplémentation de 0,10 % d'algues par rapport au groupe contrôle pour les protéines hépatiques.

On note également que la quantité de protéines dans le pancréas du groupe n°3 est significativement plus faible ( $p < 0,025$ ) par rapport au groupe contrôle.

Contrôle : n = 7 et Groupe : n = 8					
Index	Control	0.05% AFA	0.1% AFA	0.2% AFA	0.4% AFA
Protein	9.33 ±0.62	9.45 ±0.23	10.03 ±0.57	9.60 ±0.30	9.78 ±0.57
Glucose	91.72 ±7.30	119.48 ±22.68	95.95 ±10.77	95.78 ±6.38	96.84 ±6.01

**Figure 48 : Effets d'AFA sur les taux de protéines et de glucose dans le sang du rat**

Dans le sérum, de manière générale, les taux de protéines et de glucose chez les rats supplémentés en AFA ne sont pas significativement différents du groupe contrôle (figure 48).

## **Synthèse des résultats**

- **Groupe n°2 : régime alimentaire complété par 0,05 % d'AFA**
  - Augmentation de la prise alimentaire
  - Augmentation du poids du foie et de l'intestin grêle
  - Augmentation de l'activité de l'alpha-amylase pancréatique
  - Augmentation du taux de protéines dans la muqueuse de l'intestin grêle
  - Diminution du poids de la rate
  - Diminution de l'activité de l'aminopeptidase-N
- **Groupe n°3 : régime alimentaire complété par 0,10 % d'AFA**
  - Augmentation du poids du pancréas
  - Augmentation du taux de protéines dans le foie
  - Diminution de l'activité de l'aminopeptidase-N
  - Diminution du taux de protéines dans le pancréas
- **Groupe n°4 : régime alimentaire complété par 0,20 % d'AFA**
  - Augmentation du poids du pancréas
- **Groupe n°5 : régime alimentaire complété par 0,40 % d'AFA**
  - Augmentation du poids du pancréas et de l'intestin grêle
  - Augmentation du taux de protéines dans la muqueuse de l'intestin grêle
  - Diminution du poids de la rate

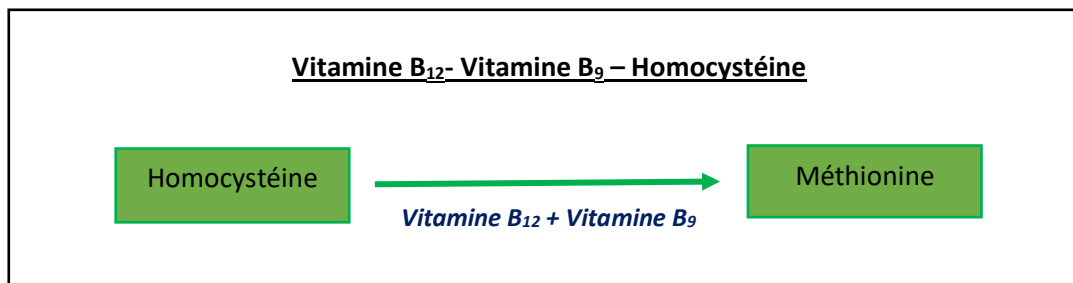
Les résultats sont différents pour chaque groupe de l'étude, ainsi, l'effet d'AFA semble être difficilement identifiable et non-dose-dépendant.

## **Conclusion**

En conclusion, les rats supplémentés en AFA semblent, chacun, présenter des modifications au niveau du poids de certains viscères, ainsi que les taux de protéines et d'enzymes présentes dans le foie et l'intestin grêle. L'échantillon n'était probablement pas suffisant pour montrer un effet statistiquement robuste. Même si AFA est bien tolérée par l'organisme, l'étude n'a pas permis d'affirmer qu'AFA jouait un rôle dans la digestion et l'augmentation du poids des organes des rats.

## I. Effet sur les taux de vitamines B<sub>12</sub>, d'homocystéine et d'acide folique dans le sang

La vitamine B<sub>12</sub> est un nutriment fondamental souvent retrouvé en concentration insuffisante chez les personnes végétaliennes. Il est donc conseillé à cette population d'enrichir leur régime alimentaire en cette vitamine. Un déficit en vitamine B<sub>12</sub> peut induire une hyperhomocystéinémie responsable de l'apparition de maladies cardiovasculaires, neuronales, oculaires ou encore osseuses. D'autres facteurs ont aussi tendance à faire diminuer l'absorption de cette vitamine tel un défaut de facteur intrinsèque ou encore une diminution du pH gastrique.



En 2009, un essai ouvert non randomisé fut mené par Luciana Baronie et son équipe pour déterminer si une supplémentation d'AFA pouvait affecter favorablement le statut en vitamine B<sub>12</sub>, en homocystéine et en vitamine B<sub>9</sub> chez un groupe de quinze sujets végétaliens pendant une période de trois mois. L'AFA provenait du lac Klamath en Oregon. Les sujets sélectionnés pour l'étude étaient végétaliens depuis plus de deux ans et tous avaient eu une supplémentation en vitamine B<sub>12</sub>, par voie orale, entre 3 à 10 mg/jour ou 2000 mg/semaine (168).

Dans 1 g d'AFA, on retrouve en moyenne 8 µg de vitamine B<sub>12</sub>. Or il fut démontré que de nombreuses sources naturelles en vitamine B<sub>12</sub>, telles que les cyanobactéries, en contiennent des analogues biologiquement inactifs. De ce fait, les chercheurs ont estimé une concentration en cette vitamine dans AFA variant entre 0,320 à 1,088 mg/g.

Pendant toute la durée de l'expérience, les sujets avaient pris six capsules par jour, soit 3 g d'AFA, mélangées avec des enzymes digestives (Enzy-B) pour améliorer l'absorption de la vitamine. Les enzymes utilisées étaient d'origine fongique, soit tout à fait compatibles avec un régime végétalien et ne contenant pas elles-mêmes de vitamines.

### **Normes : Référence nutritionnelle pour la population (France)**

***Vitamine B<sub>12</sub>*** : 4 µg/jour

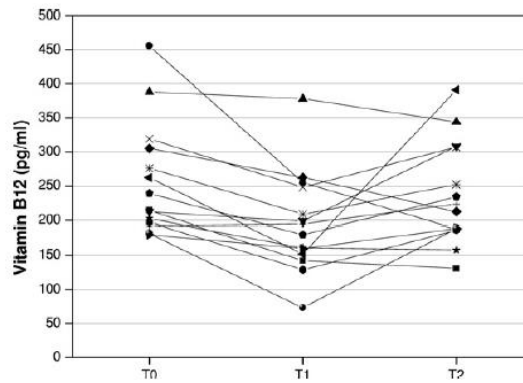
***Vitamine B<sub>9</sub>*** : 330 µg/jour

***Homocystéine*** : 8-10 µmol/L

Ces expériences se déroulèrent en trois temps pour vérifier l'efficacité de la vitamine B<sub>12</sub> contenue dans la cyanobactérie AFA.

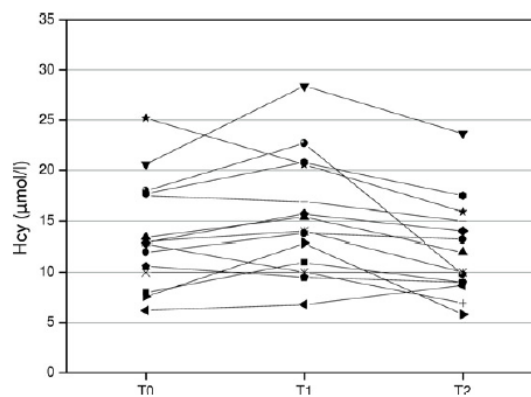
- ***(T<sub>0</sub>) 3 mois avant le début de l'expérience*** : supplémentation en vitamine B<sub>12</sub> individuelle
- ***(T<sub>1</sub>) début de la période d'essai*** : arrêt de la supplémentation de vitamine B<sub>12</sub> individuelle et introduction d'AFA
- ***(T<sub>2</sub>) 3 mois après la consommation d'AFA***





(Problème rencontré pour un sujet non évoqué)

**Figure 49 : Concentrations individuelles de vitamines B<sub>12</sub> aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> pour 14 sujets**



**Figure 50 : Concentrations individuelles en homocystéine aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> pour 15 sujets**

**A T<sub>0</sub>**, on observe que:

- 4 sujets avaient une concentration en vitamine B<sub>12</sub> sanguine inférieure à 200 pg/mL
- 4 sujets avaient une concentration en homocystéine élevée (> 15 mmol/L)
  - Dont 2 sujets qui avaient une concentration en vitamine B<sub>12</sub> > 300 pg/mL

Avant de débiter l'étude, on observe que la supplémentation en vitamine B<sub>12</sub> n'était pas optimale pour chaque sujet.

**A T<sub>1</sub>**, on remarque que lorsque la concentration en vitamine B<sub>12</sub> diminue, on observe une augmentation de la concentration en homocystéine. Ce qui est cohérent car elle ne peut alors pas être convertie en méthionine. Mais on s'aperçoit que cette tendance se réinverse au temps **T<sub>2</sub>** : l'augmentation de la concentration en vitamine B<sub>12</sub> permet de diminuer la concentration en homocystéine.

**Tableau n°1 représentant la concentration sanguine moyenne en vitamine B<sub>12</sub>, en homocystéine et en acide folique de tous les sujets en fonction des trois temps**

\* T1 vs. T0 avec p = 0,001      \*\* T2 vs. T1 avec p = 0,003

	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>
<b>Vitamine B<sub>12</sub> (pg/mL)</b> <i>pour 14 sujets</i>	<b>259 ± 83*</b>	<b>196 ± 74*</b>	237 ± 75
<b>Homocystéine (μmol/L)</b> <i>pour 15 sujets</i>	13,7 ± 5,2	<b>15,25 ± 5,8 **</b>	<b>12,0 ± 4,7**</b>
<b>Vitamine B<sub>9</sub> (ng/mL)</b>	11,0 ± 4,1	10,9 ± 4,7	12,5 ± 7,7

**Tableau n°2 représentant l'évolution de la concentration sanguine en vitamine B<sub>12</sub> des 14 sujets**

	<b>Concentration vitamine B<sub>12</sub> : de T<sub>1</sub> à T<sub>2</sub></b>
<b>Pour 64 % (9 individus)</b>	<b>Augmentation significative entre 15 et 159 %</b>
<b>Pour 14 % (2 individus)</b>	Aucune différence significative
<b>Pour 21 % (3 individus)</b>	Diminution significative entre 8 à 27 %

### **Lien entre la vitamine B<sub>12</sub> et d'homocystéine**

#### **❖ Concentration sanguine moyenne en vitamine B<sub>12</sub> (tableau n°1)**

Suite à l'arrêt de l'apport personnel de vitamine B<sub>12</sub> pendant 3 mois, on observe une diminution significative de sa concentration moyenne dans le sang au temps T<sub>1</sub>. Par contre, au temps T<sub>2</sub>, on observe une remontée de cette concentration moyenne qui revient pratiquement à celle du temps T<sub>0</sub>.

Toutefois, tous les sujets n'avaient pas la même concentration en vitamine B<sub>12</sub> trois mois avant le début de l'étude. Si la vitamine B<sub>12</sub> contenue dans AFA n'avait pas été assimilée, on aurait donc continué d'observer une diminution de sa concentration moyenne au temps T<sub>2</sub>, ce qui n'était pas le cas ici. La vitamine B<sub>12</sub> en provenance d'AFA semble donc être bien absorbée par les sujets.

#### **❖ Concentration sanguine moyenne en homocystéine (tableau n°1)**

On observe une diminution significative de la concentration sanguine moyenne d'homocystéine au temps T<sub>2</sub> par rapport au temps T<sub>1</sub>. Lorsque l'on observe cette concentration au temps T<sub>0</sub>, on constate une légère diminution de cette dernière au temps T<sub>2</sub>. Cela sous-entendrait, qu'une supplémentation de vitamine B<sub>12</sub> en provenance d'AFA serait plus efficace pour réduire la concentration sanguine moyenne d'homocystéine par rapport à la supplémentation initiale et individuelle prise par les sujets végétaliens. Cette tendance serait à confirmer sur un échantillonnage plus important de sujets.

### ❖ Conclusion (tableau n°1 et 2)

Pour démontrer l'absorption et l'utilisation de la vitamine B<sub>12</sub>, seule la concentration en homocystéine peut être utilisée comme marqueur chez les végétariens. Cette conversion de l'homocystéine en méthionine permet de passer d'un composé toxique à un acide aminé essentiel nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme.

La constatation que la concentration en homocystéine ait diminué au temps T<sub>3</sub> montre que la vitamine B<sub>12</sub> a bien été absorbée mais surtout qu'elle est active (*tableau n°1*). De ce fait, la raison pour laquelle la concentration sanguine en vitamine B<sub>12</sub>, chez 35 % des sujets, n'a pas bougé ou même a diminué peut s'expliquer par la consommation de cette vitamine, nécessaire à la conversion de l'homocystéine (*tableau n°2*).

### Point sur la vitamine B<sub>9</sub>

La vitamine B<sub>9</sub> fut étudiée car sa carence peut aussi induire une hyperhomocystéinémie.

Selon le tableau n°1, aucun changement significatif de la concentration sanguine moyenne en vitamine B<sub>9</sub> n'a été observé pour les trois temps de l'expérience. Ce résultat montre donc que la chute de l'homocystéine est essentiellement due à une carence en vitamine B<sub>12</sub> ce qui est cohérent si l'on tient compte de la source principale de cette vitamine : les légumes verts. Les individus végétariens en consommant régulièrement n'en sont donc pas carencés.

AFA étant une source importante en folate, si l'on renouvelle cette expérience sur un nombre de sujets plus important, il serait possible qu'une augmentation significative de la concentration de cette vitamine soit observée.

### Conclusion

En conclusion, AFA est une source naturelle en vitamine B<sub>12</sub> et B<sub>9</sub> et possède donc tous les atouts pour éviter l'hyperhomocystéinémie, fréquente chez les végétariens et associée au développement de nombreuses maladies.

Cependant dans cette étude, une enzyme augmentant l'absorption de la vitamine B<sub>12</sub> a été utilisée pour palier à d'éventuelles carences d'enzymes nécessaires à l'absorption de cette vitamine, les chercheurs ont voulu donner la même chance à tous les sujets. Cette déficience reste une supposition et donc il est possible que les enzymes apportées majorent l'effet observé dans cette étude.

## J. Effet sur la mobilisation des CSH

En 2007, les professeurs Gitte S. Jensen et Christian Drapeau, ont à nouveau poursuivi leur recherche sur l'AFA par l'étude de la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques.

L'idée de cette nouvelle étude leur est venue suite à la découverte d'un nouveau composé au sein de la cyanobactérie AFA : un ligand de la L-sélectine. Afin de caractériser ce ligand, une électrophorèse fut réalisée. Les chercheurs ont alors estimé que ce ligand représentait 0,2 µg/g de biomasse d'AFA séchée (169).

Les sélectines sont des glycoprotéines qui jouent un rôle précieux dans l'immunosurveillance et dans les réactions inflammatoires en orientant notamment les leucocytes vers les tissus infectés, inflammés.

Pour mieux comprendre le rôle de ce nouveau ligand, un enrichissement d'AFA a été réalisé avec (AFA-W).

Concernant les cellules utilisées, les chercheurs ont utilisé des cellules polymorphonucléaires (PMN) neutrophiles du sang périphérique, aussi appelées polynucléaires neutrophiles, des CSH dérivées de la moelle osseuse humaine (CD34<sup>+</sup>) et des progéniteurs KG1a (CD34<sup>+</sup>) et K562 (CD34<sup>-</sup>). Les progéniteurs ont été étudiés ici, afin de mieux comprendre la mobilisation des cellules souches. Ces cellules sont les intermédiaires entre ces cellules de la moelle osseuse et les cellules matures du sang périphérique.

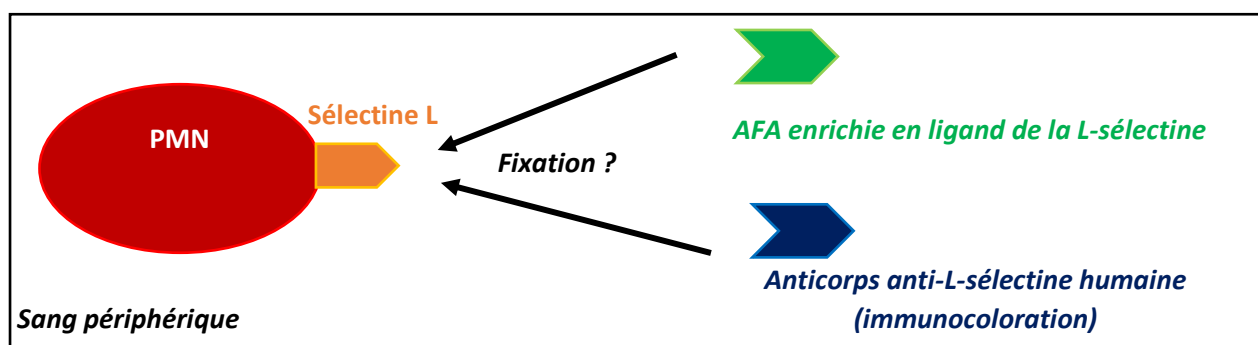
Notons qu'une cellule marquée CD34<sup>+</sup> est moins différenciée qu'une cellule marquée CD34<sup>-</sup>.

### *In vitro*

#### ❖ Réduction de l'immunocoloration TQ1 de la L-sélectine sur les cellules PMN humaines

Pour cette expérience, des polynucléaires neutrophiles ont été purifiés et lavés dans du PBS avant d'être distribués dans une plaque de 96 puits. Des dilutions en série d'AFA-W ont ensuite été ajoutées à une partie des cellules nucléées en présence d'azoture de sodium. L'azoture de sodium a été utilisé dans le but d'inhiber le mouvement du cytosquelette et bloquer la perte, de L-sélectine à la surface des PMN.

Puis, une immunocoloration fut réalisée avec l'anticorps monoclonal anti-L-sélectine humaine. Cet anticorps est spécifique de la zone de liaison au ligand de la L-sélectine. Les résultats ont été relevés dans les 24 heures qui ont suivi cette fixation. Le but de l'expérience était de confirmer la fixation du ligand d'AFA à la L-sélectine, en le mettant en compétition avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la zone de liaison au ligand de la L-sélectine.



Les résultats de cette expérience ont montré qu'en présence d'AFA-W, on observe une diminution significative et dose-dépendante de l'immunocoloration provoquée par la fixation de l'anticorps par rapport au PMN non traités. Ce résultat montre donc que le ligand à la L-sélectine contenu dans AFA a bien la capacité de se lier à la L-sélectine des PMN.

En temps normal, les polynucléaires neutrophiles interagissent avec les cellules endothéliales par leur L-sélectine. Cette interaction permet à ces cellules immunitaires d'entrer dans les tissus infectés ou inflammés. Si l'interaction d'AFA-W avec cette sélectine est élevée *in vivo*, cela pourrait bloquer la migration tissulaire des PMN et donc augmenterait leur concentration dans le sang.

### ❖ Rôle d'AFA-W sur le récepteur de CXCR4

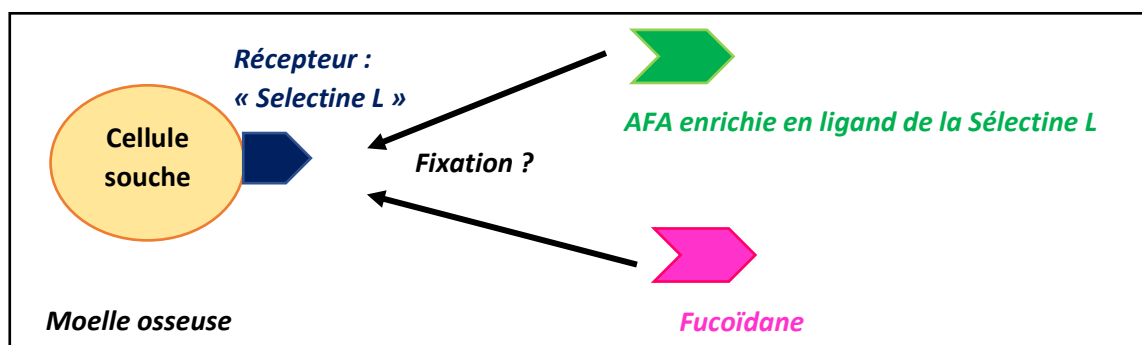
Dans cette expérience, un ligand spécifique de la L-sélectine, le fucoïdane (*contrôle positif*), a été utilisé pour étudier l'action du nouveau ligand dérivé d'AFA dans la mobilisation des CSH. Ce fucoïdane agit d'une part, en augmentant l'expression du récepteur CXCR4 à la membrane, lorsqu'il agit comme un ligand de la L-sélectine et d'autre part, en se liant au récepteur CD11b, récepteur impliqué dans l'adhérence des cellules souches dans la moelle osseuse.

Les chimiokines sont des molécules à l'origine de la mobilité des cellules. Lorsqu'une cellule exprime un récepteur à une chimiokine, elle sera capable de migrer à l'endroit où le gradient de cette dernière est le plus élevé. Les chimiokines jouent donc un rôle clé dans la résidence cellulaire, plus communément appelé le « Homing ».

Le récepteur CXCR4 est connu pour être impliqué dans le homing des cellules souches dans la moelle osseuse. La chimiokine responsable de cette résidence est SDF-1 (Facteur 1 dérivé du stroma). Une fois que les cellules souches sont attirées, grâce à SDF-1, elles se fixent à des molécules d'adhésion, comme CD11b, présentes au niveau des cellules souches de la moelle osseuse.

Or, le SDF-1 exprimé dans la moelle est également distribué dans d'autres tissus de l'organisme. Lorsqu'un tissu est infecté ou inflammé, il sécrète davantage cette chimiokine. La cellule exprimant CXCR4 migrera alors à l'endroit où cette chimiokine est sécrétée en plus grande quantité. Cette chimio-attraction permet donc de favoriser l'arrivée des cellules souches dans un tissu lésé.

Si une molécule bloque l'interaction CXCR4/SDF-1, il y aura donc une délocalisation de ces dernières vers la circulation sanguine.



Pour réaliser l'expérience, les cellules mononucléaires de la moelle osseuse CD34+, ainsi que des cellules progénitrices KG1a et K562 ont été utilisées. Puis pour ces trois types cellulaires, la répartition dans les puits s'est effectuée de la façon suivante :

<b>1<sup>ère</sup> série de puits</b>	Fucoïdane seul
<b>2<sup>ème</sup> série de puits</b>	AFA-W seul
<b>3<sup>ème</sup> série de puits</b>	Fucoïdane et AFA-W

A différents temps (1, 10, 20, 30, 40, 60 min), du PBS contenant de l'azoture de sodium a été ajouté aux puits afin d'arrêter les mouvements du cytosquelette. Cela a permis d'arrêter le recyclage du récepteur CXCR4 et alors de quantifier son niveau d'expression à la membrane. Cette étape a permis au chercheur de colorer par immunomarquage ces récepteurs exprimés à la surface cellulaire à chaque point dans le temps.

Les résultats ont montré qu'AFA-W inhibe l'externalisation de CXCR4 provoquée par le Fucoïdane, sur les cellules de la moelle osseuse et sur les cellules progénitrices KG1a ( $p < 0,02$ ).

Par contre pour la lignée progénitrice K62, AFA-W n'a pas entraîné de diminution de l'externalisation du récepteur CXCR4.

### **Conclusion de l'étude *in vitro***

La mobilisation des CSH est un processus complexe régi principalement par deux mécanismes : l'adhésion des cellules souches à la moelle osseuse par la L-sélectine et la réduction de la réponse chimiotactique au SDF-1 par le récepteur CXCR4.

Il a été montré que le ligand à la L-sélectine contenu dans AFA avait la capacité de se fixer à la L-sélectine des polynucléaires neutrophiles. Cette première expérience a donc permis de vérifier que ce nouveau ligand interagissait bien avec la L-sélectine.

Il a également été montré que l'extrait permettait de réguler négativement les taux de CXCR4 lorsque les cellules souches CD34<sup>+</sup> étaient exposées au fucoïdane. S'il y a moins de CXCR4 en surface cela signifie moins d'interaction avec SDF-1 et donc moins d'adhérence des cellules souches au stroma de la moelle osseuse. Ce qui favorise ainsi leur délocalisation et leur migration vers la circulation générale.

AFA-W entraîne aussi une diminution de l'externalisation du récepteur CXCR4 uniquement chez les cellules marquées CD34<sup>+</sup>, soit les cellules souches de la moelle osseuse et les progéniteurs KG1a. Le stade de différenciation semble être bien un facteur important dans la mobilisation des cellules souches. Etant pluripotente, une CSH marquée CD34<sup>+</sup> aura la capacité de se différencier en tout type cellulaire.

Lorsqu'elle parvient par exemple dans un tissu lésé, elle pourra se différencier en une cellule de ce tissu pour permettre la reconstitution de ce dernier. Mais si une cellule est déjà engagée dans un type cellulaire, ne pouvant se redifférencier, elle ne sera pas utile pour régénérer le tissu.

### **In vivo**

Afin de vérifier les premiers résultats obtenus *in vitro*, les chercheurs ont voulu déterminer si le complément alimentaire StemEnhance® (voir [annexe 1](#) : composition des compléments alimentaires) pouvait augmenter le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes dans le sang. Ce complément contient 1 gramme d'AFA enrichi en ligand de la L-sélectine, environ cinq fois plus que la quantité retrouvée dans l'AFA brute. Le taux de cellules souches CD34<sup>+</sup> circulantes a été comparé avant et après l'ingestion de l'extrait d'AFA enrichi ou avant et après l'ingestion d'un placebo.

Dans cette étude randomisée en double aveugle, des critères d'exclusion ont été définis : moins de 20 ans ou plus de 65 ans, grossesse, asthme sévère et allergies nécessitant une prise en charge, toute maladie chronique connue ou maladie vénérienne ancienne ou actuelle, usage fréquent de drogues récréatives et fonction digestive affaiblie.

Douze volontaires ont ensuite été sélectionnés et programmés sur deux jours d'étude à une semaine d'intervalle. Les tests ont toujours été effectués le matin, à la même heure (8 heures – 11 heures), afin de minimiser l'influence du rythme circadien. En raison de l'interférence du stress physique et mental avec le homing des lymphocytes, des questionnaires ont été distribués afin d'évaluer l'état de stress de chaque individu. Une abstinence de pratique physique de 3 heures avant l'expérience leur a été demandée.

Le recueil des échantillons de sang s'est ensuite effectué de la façon suivante : avant l'administration par voie orale du complément alimentaire ou du placebo, un premier recueil de sang a été effectué. Celui-ci a servi de contrôle pendant l'expérience. D'autres recueils ont été effectués à 30, 60 et 120 minutes.

#### ❖ Pourcentage de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes

##### **Groupe StemEnhance® :**

- Pour les 12 volontaires

Pour tous les patients de l'étude, l'ingestion de StemEnhance® a entraîné une augmentation de  $18 \pm 3 \%$  du nombre de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes au bout d'une heure par rapport au temps T0 ( $p < 0,003$ ). Par ailleurs, trois des volontaires ayant montré des signes de stress, relevé grâce au questionnaire, ont été exclus de l'essai en accord avec les critères d'exclusion définis au début de l'étude. Au final, on obtient une augmentation de  $25 \pm 1 \%$  du nombre de cellules souches circulantes à 60 min ( $p < 0,0001$ ).

- Pour un volontaire

	Placebo	StemEnhance®
<b>T0</b>	<b>0,062 %</b>	<b>0,082 %</b>
<b>T 60 min</b>	0,085 %	0,088 %

On remarque une augmentation des cellules CD34<sup>+</sup> circulantes lorsque le patient a reçu le complément StemEnhance® par rapport au placebo.

Afin de tester la reproductibilité de l'effet de StemEnhance® sur le pourcentage de CD34<sup>+</sup>, l'expérience a été répétée 16 fois sur un même volontaire, sur 16 jours différents. L'augmentation moyenne du nombre de cellules souches en circulation était alors de  $53 \pm 16 \%$  avec une médiane de 36 %. Le pourcentage le plus élevée était de 233 % et le plus faible était de 4 %.

##### **Groupe Placebo :**

Les volontaires ayant reçu le placebo ont eu une légère augmentation non significative du pourcentage de CD34<sup>+</sup> dans la circulation mais uniquement au bout de 2 heures.

#### ❖ Nombre total de leucocytes et lymphocytes circulants

Au bout de deux heures, aucune différence significative n'a été observée dans la population de leucocytes et de lymphocytes entre les deux protocoles.

	StemEnhance				Placebo			
Temps (min)	0	30	60	120	0	30	60	120
WBC	100	104 ± 1	104 ± 1	109 ± 5	100	107 ± 3	104 ± 3	111 ± 4
Lymphocytes	100	107 ± 2	108 ± 2	118 ± 5	100	109 ± 3	109 ± 3	124 ± 5

WBC, globules blancs.

**Figure 51 : Nombre de leucocytes et de lymphocytes circulants en fonction du temps chez les deux groupes de patients**

Les leucocytes sont des cellules qui présentent également le récepteur CXCR4. Constaté précédemment, la résidence de ces cellules immunitaires dans le sang se fait donc grâce à la chimiokine SDF-1, sécrétée par les cellules endothéliales. N'étant pas marqués CD34<sup>+</sup>, AFA-W n'a donc pas entraîné une diminution de leur expression du récepteur CXCR4 à la membrane, et donc une délocalisation de ces dernières ([figure 51](#)).

### **Conclusion de l'étude *in vivo***

Dans cette étude *in vivo*, les chercheurs ont montré que la consommation d'un gramme de StemEnhance® avait entraîné une augmentation significative du pourcentage de cellules CD34<sup>+</sup> en circulation après une heure. Cette augmentation était d'ailleurs identique pour les CSH de la moelle osseuse et les cellules KG1a. Si l'on se base sur les tests *in vitro* déjà évoqués précédemment, ces résultats sont cohérents puisque StemEnhance® a la capacité d'entraîner une régulation négative de l'externalisation du récepteur CXCR4. Cela entraîne bien une augmentation de leur passage dans le sang.

En conclusion, cette étude chez l'Homme a permis de mieux comprendre le lien entre la cyanobactérie AFA et la mobilisation des cellules souches. Ces mécanismes restent incertains et il est fort possible que d'autres processus, encore inconnus aujourd'hui, soient impliqués.

Si les chercheurs continuent leurs recherches, il est fort possible qu'AFA soit impliquée dans le futur dans le domaine de la recherche sur les cellules souches.



## K. Effet sur le diabète

Le diabète est une maladie multifactorielle qui se caractérise par une augmentation chronique de la glycémie. Cette hyperglycémie peut être due soit à un défaut de sécrétion de l'insuline (diabète de type 2) soit à une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (diabète de type 1).

On estime qu'en 2030, les dépenses mondiales en matière de santé pour le diabète seront de 30 % supérieures à celles estimées en 2010 en raison d'une augmentation du nombre de personnes diabétiques. Il existe un réel besoin de trouver un traitement ou un composant nutritionnel efficace pour lutter contre ce fléau.

### 1) Etude chez l'animal : impact sur le diabète de type 1

En 2013, une étude a été menée, par Zeinab Mohamed Kamel Ismail et son équipe, sur vingt rats mâles adultes chez lesquels on a induit un diabète grâce à la streptozotocine, antibiotique cytotoxique spécifique des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques. La dose administrée fut de 60 mg/kg. La finalité de ce test fut d'évaluer le rôle de l'extrait soluble d'AFA, provenant du complément alimentaire StemEnhance® (SE) (voir [annexe 1](#) : composition des compléments alimentaires), dans la mobilisation des CSH de la moelle osseuse vers le pancréas (170).

StemEnhance® a été administré quotidiennement par voie orale, à raison de 270 mg/kg (Poids : 160 – 200 g), pendant deux ou quatre semaines après que le test de glycémie, au 3<sup>ème</sup> jour, ait bien confirmé que les animaux étaient devenus diabétiques. Les animaux étaient considérés comme diabétiques lorsque la glycémie était supérieure à 200 mg/dL.

	Nombre de rats (Poids entre 160 - 200 g)	Induction du diabète par la streptozotocine	Traitement par StemEnhance (Débuté à J3 -> fin)
<b>Groupe n°1 : Témoin</b>	4	Non	Non
<b>Groupe n°2 : Diabétique</b>	4	Oui	Non
<b>Groupe n°3 : Contrôle positif</b>	4	Non	Oui
<b>Groupe n°4 : Diabétique- StemEnhance®</b>	8	Oui	Oui

Aucun décès ni comportement anormal n'a été observé chez les rats pendant toute la durée de l'expérience. Cela est donc conforme aux études précédentes du neurochirurgien Christian Drapeau qui n'avait signalé ni décès ni toxicité chez des animaux recevant 300 mg/kg de StemEnhance® (SE), soit environ 10 fois la dose administrée à l'homme.

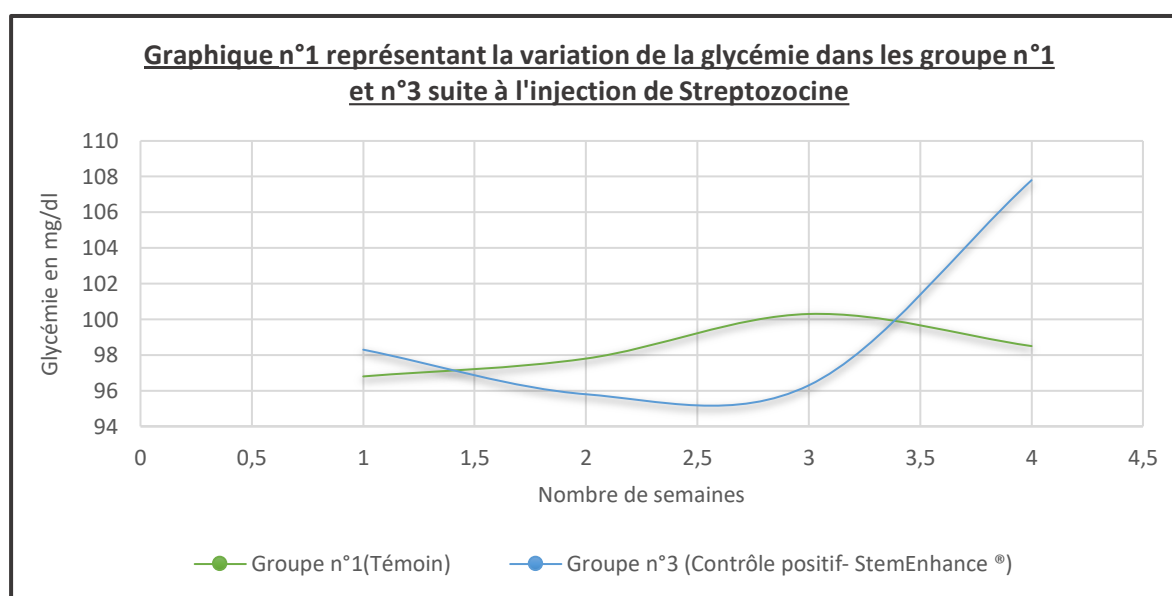
Pour mesurer le niveau de glucose et analyser la mobilisation des CSH à des différents temps, une moitié des rats de chaque groupe a été sacrifiée au bout de 2 et 4 semaines.

## Niveau du glucose dans le sang

Groupe	Valeurs de la glycémie (moyenne $\pm$ SD)			
	1ère semaine	2ème semaine	3ème semaine	4ème semaine
Contrôle (GI)	96,8 $\pm$ 8,1	97,8 $\pm$ 6,6	100,3 $\pm$ 8,3	98,5 $\pm$ 9,1
Diabétique (GII)	464,5 $\pm$ 45,9 <sup>a</sup>	645,8 $\pm$ 21,4 <sup>a</sup>	650 $\pm$ 34,3 <sup>a</sup>	648 $\pm$ 41,9 <sup>a</sup>
Contrôle positif-StemEnhance (GIII)	98,3 $\pm$ 10,9	95,8 $\pm$ 16,1	96,3 $\pm$ 12,3	107,8 $\pm$ 8,5
Diabetic-StemEnhance (GIV)	446,1 $\pm$ 36,8 <sup>a</sup>	632,4 $\pm$ 34,7 <sup>a</sup>	532,4 $\pm$ 35,4 <sup>a, b</sup>	354,6 $\pm$ 41,4 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> p <0,05 par rapport à GI, <sup>b</sup> p <0,05 par rapport à GII.

**Figure 52 : Valeurs des glycémies moyennes sur 4 semaines dans les 4 groupes**

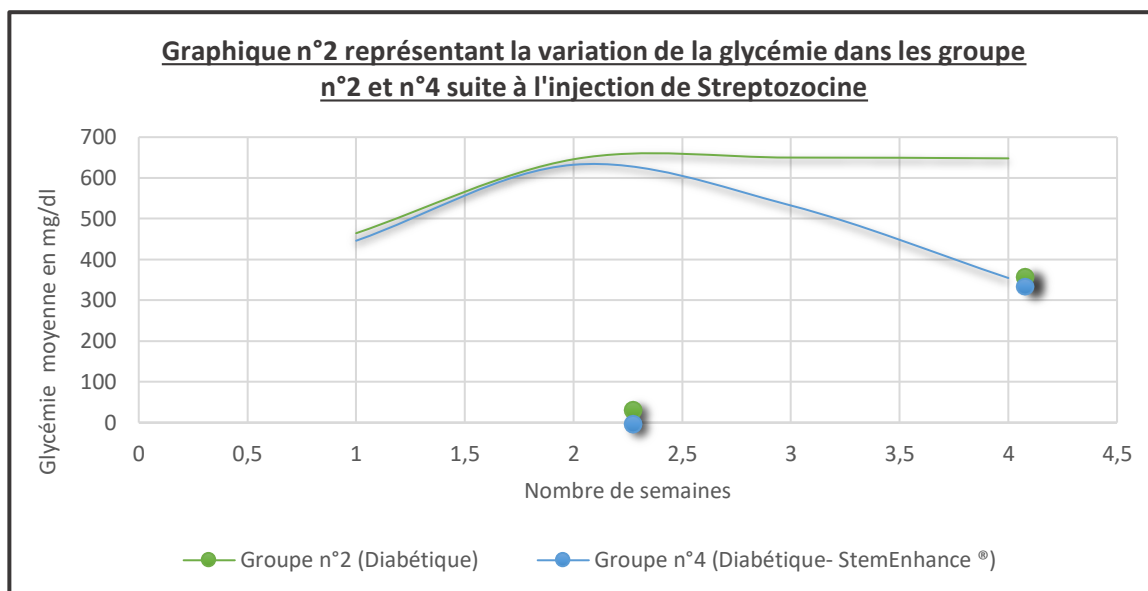


### **Graphique n°1 : Rôle d'une supplémentation d'AFA par rapport au témoin, dans un contexte « Hors diabète »**

- A 2 et 4 semaines : aucune différence significative entre les groupes n°1 et n°3

D'après ces résultats, on observe qu'AFA n'est pas en mesure d'abaisser les taux de glycémie lorsque les cellules  $\beta$  de Langerhans fonctionnent.

Par conséquent, l'extrait d'AFA n'a pas d'impact direct sur la régulation de la production d'insuline, ce qui est rassurant car il n'y a donc aucun risque d'hypoglycémie pour ses consommateurs.



### **Graphique n°2 : Diabète induit par Streptozocine, rats +/- traités par AFA**

- A 2 semaines : aucune différence significative entre le groupe n°2 et n°4
- A 4 semaines : diminution significative dans le groupe 4 ( $p < 0,05$ ) par rapport au groupe n°2

A 2 et 4 semaines, il a aussi été observé une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la glycémie des groupes n°2 et n°4 par rapport au groupe n°1. Le fait que la moyenne glycémique augmente pour les groupes n°2 et n°4 par rapport au témoin permet de montrer l'efficacité de la Streptozocine. Effectivement, l'augmentation des glycémies témoigne d'une destruction des cellules  $\beta$  de Langerhans qui ne peuvent donc plus fournir d'insuline, hormone responsable de l'abaissement de la glycémie.

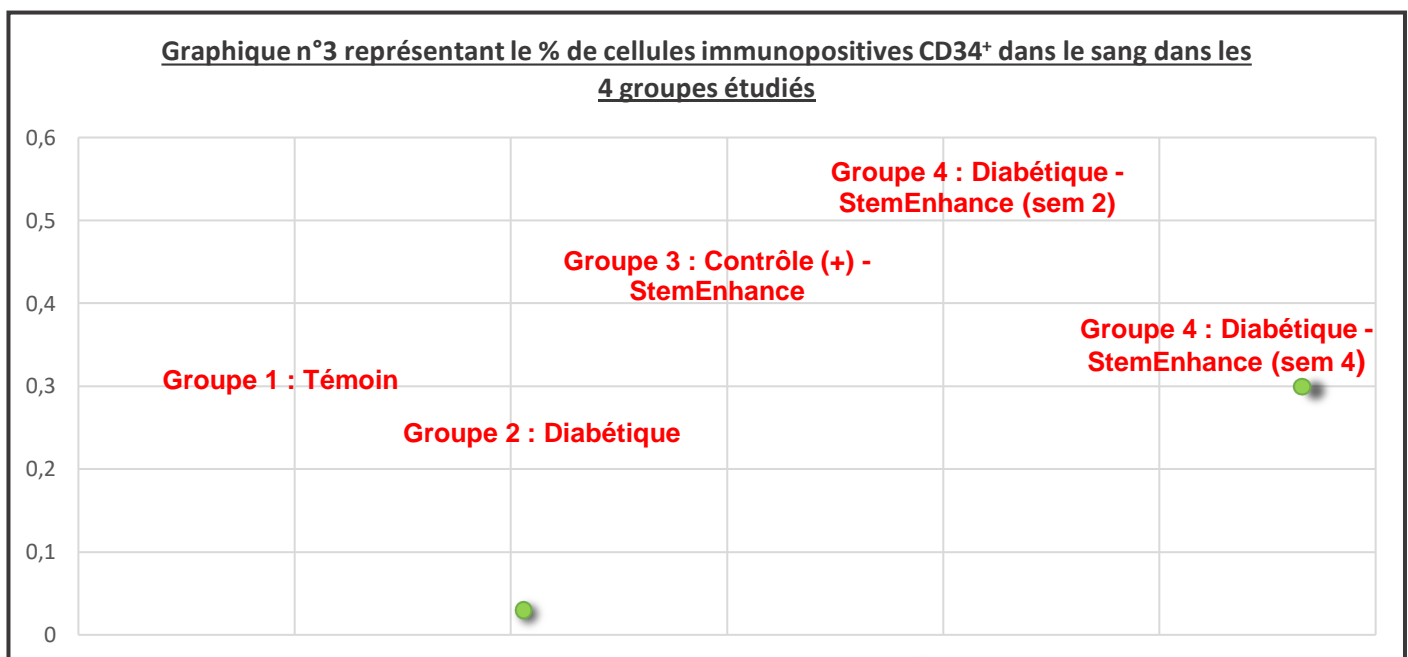
Les résultats ont ensuite montré qu'une supplémentation en AFA permettait, au bout de 4 semaines, de réduire la glycémie. L'explication la plus vraisemblable serait que le pancréas, par les cellules  $\beta$  de Langerhans, recommenceraient à sécréter de l'insuline. Mais détruites au préalable par la Streptozocine, cela signifierait donc qu'AFA ait réussi à régénérer ces cellules. Pour qu'une telle régénération se produise, cela implique que l'extrait d'AFA a eu un impact sur la mobilisation des CSH de la moelle osseuse.

### ❖ Pourcentage des cellules CD34<sup>+</sup> dans le sang

Groupe	Moyenne $\pm$ écart type
Contrôle	0,35% $\pm$ 0,00013
Diabétique	0,31% $\pm$ 0,00008
Contrôle positif-StemEnhance	0,50% $\pm$ 0,00018 <sup>a, b</sup>
Diabetic-StemEnhance (2 semaines)	0,46% $\pm$ 0,00058 <sup>a, b</sup>
Diabetic-StemEnhance (4 semaines)	0,45% $\pm$ 0,00046 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> p < 0,05 par rapport à GI, <sup>b</sup> p < 0,05 par rapport à GII.

**Figure 53 : Valeur moyenne (+/- écart-type) des cellules immunopositives pour CD34 dans le sang par cytométrie en flux dans les 4 groupes**



### Graphique n°3 : Pourcentage des cellules CD34<sup>+</sup> dans le sang

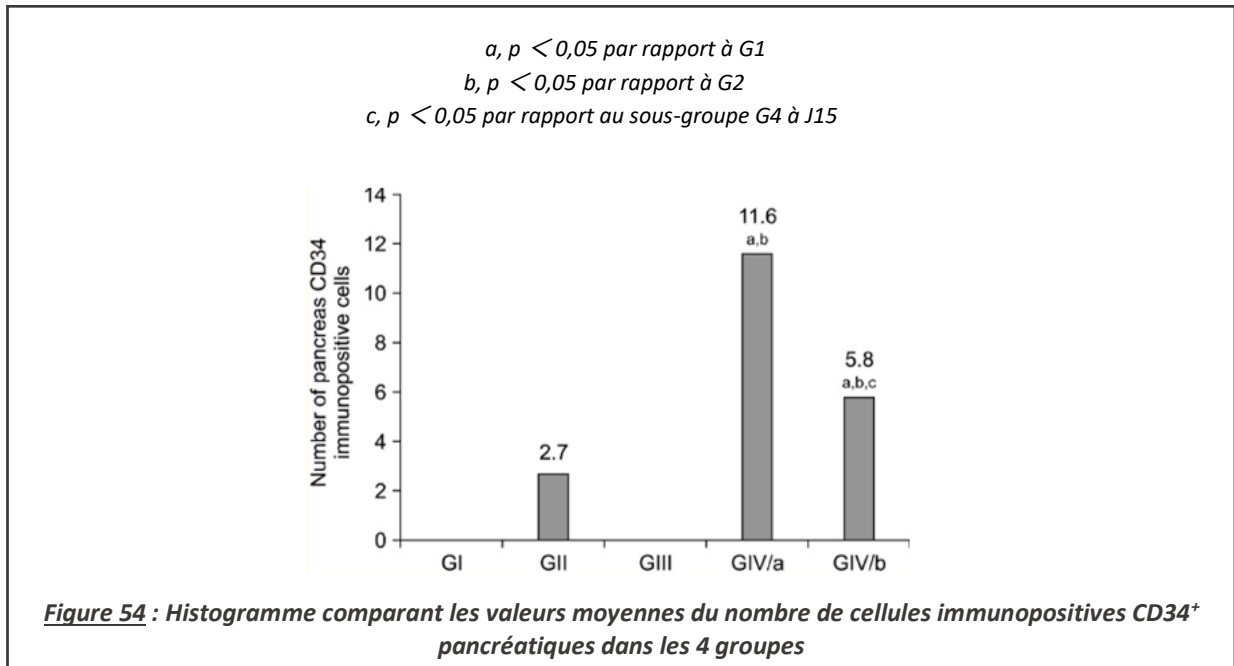
- A 2 et 4 semaines : augmentation significative dans les groupes n°3 et n°4 par rapport au groupe témoin ( $p < 0,05$ )

Pour ces deux groupes, les rats ont tous reçu une supplémentation en AFA. Il existerait donc un lien entre la prise d'AFA et l'augmentation du pourcentage sanguin de CD34<sup>+</sup>, marqueur présent sur les CSH de la moelle osseuse.

Ces résultats sont donc bien conformes à l'étude du professeur Jensen qui a aussi montré qu'une prise unique d'un extrait d'AFA (StemEnhance®) entraînait une augmentation significative du pourcentage de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes, une heure après consommation de l'extrait. De ce fait, cette étude permet également de montrer que l'effet est prolongé lorsqu'AFA est prise sur plusieurs semaines.

### ❖ Nombre moyen des cellules CD34<sup>+</sup> dans le pancréas

Une fois que les CSH passent de la moelle osseuse vers le sang, leur chemin se poursuit en direction des sites lésés afin de les réparer. Ce qui a incité les chercheurs à comptabiliser ensuite le nombre de cellules marquées CD34<sup>+</sup> dans le pancréas.



On remarque qu'aucune cellule CD34<sup>+</sup> n'a été détectée dans le pancréas du groupe contrôle ainsi que dans le groupe n°3. Ces résultats sont donc cohérents car les rats n'étant pas diabétiques et ayant leurs cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans intactes, il n'y pas eu de mobilisation des CSH dans ce tissu.

Par contre, on observe :

- **Groupe 2** : augmentation non significative par rapport au groupe contrôle

Les résultats obtenus montrent que, même en l'absence d'extrait d'AFA, nos propres cellules souches ont la capacité de migrer vers les organes lésés pour les réparer. Il existe dans tous les organes des CSA déjà présentes et qui peuvent commencer à régénérer le tissu en attendant l'arrivée des CSH présentes dans la moelle osseuse.

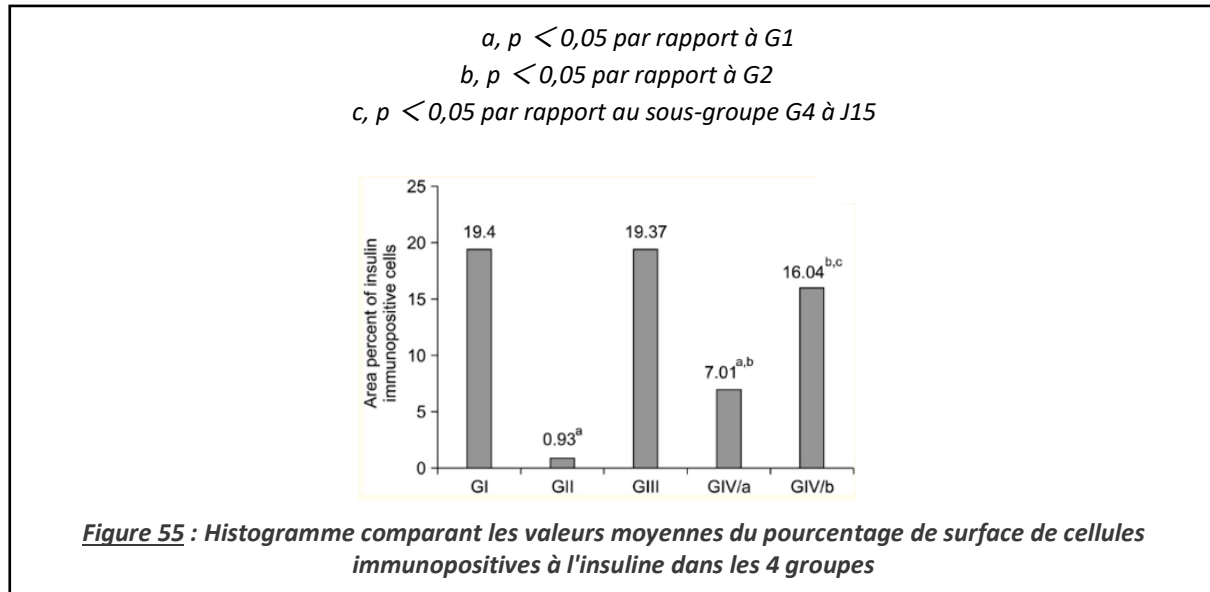
- **Groupe 4**
  - **À 2 semaines** : augmentation significative par rapport au groupe contrôle et au groupe n°2
  - **À 4 semaines** : augmentation significative par rapport au groupe contrôle et au groupe n°2, et diminution significative par rapport au groupe n°4 à 2 semaines

On remarque qu'une supplémentation d'extrait d'AFA, à 2 semaines, permet d'augmenter le nombre de cellules souches dans le pancréas. Ce nombre diminue significativement à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine. Ce changement entre la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine peut être expliqué par le fait que les cellules souches se soient différenciées pour donner naissance à des cellules  $\beta$  permettant de reconstituer des îlots de Langerhans.

En reprenant les résultats précédents, c'est effectivement à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine que la glycémie a commencé à diminuer significativement par rapport à la 2<sup>ème</sup> semaine. Pour vérifier cette hypothèse les chercheurs ont tenté de quantifier le nombre de cellules  $\beta$  différenciées en se basant sur la production d'insuline, afin de montrer leur fonctionnalité.

### ❖ Pourcentage moyen de cellules immunopositives à l'insuline

La détection des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans différenciées a été obtenue par l'utilisation d'anticorps anti-insuline.



- **Groupes n°1 et n°3** : aucune différence significative entre ces deux groupes

Dans les groupes n°1 et n°3 non diabétiques, on remarque que le pourcentage de sécrétion de l'insuline est sensiblement le même malgré la supplémentation en AFA dans le groupe n°3. Une supplémentation de 270 mg/kg n'entraîne donc pas d'augmentation significative de la sécrétion de cette hormone. Ce qui est, d'ailleurs, cohérent avec les résultats vus précédemment sur les taux de glycémie de ces deux groupes qui étaient aussi pratiquement identiques.

- **Groupe n°2** : diminution importante et significative par rapport au groupe contrôle

Ce résultat permet d'apprécier l'efficacité de la Streptozocine : puisque les cellules  $\beta$  ont été détruites, il est logique d'assister à un effondrement de la sécrétion d'insuline. La diminution de production de l'insuline est la plus importante dans ce groupe où aucune supplémentation en extrait d'AFA n'a été faite.

- **Groupe n°4**
  - **À 2 semaines** : diminution significative par rapport au groupe contrôle mais augmentation significative par rapport au groupe n°2
  - **À 4 semaines** : augmentation significative par rapport au groupe n°2 et au groupe n°4 à 2 semaine

Par ces résultats, on s'aperçoit que le nombre de cellules immunopositives à l'insuline est plus important pour le groupe n°4 à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine. Ce résultat confirme donc les hypothèses posées par les chercheurs. La destruction des cellules  $\beta$  de Langerhans par la Streptozocine a entraîné un effondrement de la production d'insuline qui s'est ensuite traduit par une augmentation de la glycémie. La prise de l'extrait d'AFA a permis d'entraîner une mobilisation et une migration plus importante des CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique.

Lorsque les CSH de la moelle osseuse sont arrivées sur le site lésé par la molécule, soit le pancréas, elles se sont différenciées pour reformer des îlots de Langerhans qui ont pu alors à nouveau synthétiser de l'insuline et donc rediminuer la glycémie des rats.

## **Conclusion de l'étude**

Cette étude a tout d'abord permis de rappeler le rôle naturel de nos cellules souches. Lorsqu'un tissu est lésé, notre organisme se mobilise pour sa réparation. Il utilise les CSA déjà présentes dans l'organe endommagé, mais aussi les CSH présentes dans la moelle osseuse. La coopération de ce double système permet de faciliter la régénération de notre organisme.

La dose de StemEnhance® a été définie comme équivalente à la dose humaine par les chercheurs : soit 3 g/jour par voie orale (6 gélules), dose recommandée par le fabricant StemTech. Mais les Hommes ne possèdent pas le même métabolisme que les rats et de ce fait, il est nécessaire de réaliser des études *in vivo* chez les êtres humains pour pouvoir déterminer une dose efficace physiologiquement.

N'ayant pas d'impact direct sur la sécrétion d'insuline, l'extrait d'AFA ne semble pas avoir démontré d'effets positifs pour les patients atteints d'un diabète de type 2. N'ayant qu'un rôle sur la régénération des cellules  $\beta$ , seul le diabète de type 1, où ces cellules sont détruites par le propre système immunitaire de l'individu, semble y trouver un bénéfice. Toutefois, il est important de nuancer ces résultats puisque chez les patients ayant un diabète de type 1, les cellules  $\beta$  sont détruites en permanence par le système immunitaire, ainsi il est possible d'observer une diminution de l'efficacité d'AFA.

### **2) Etude chez l'Homme : impact sur le diabète de type 2**

L'objectif principal, ici, était d'étudier le rôle d'un extrait d'AFA chez des patients atteints de diabète de type 2 afin d'évaluer si la cyanobactérie AFA influencée : l'HbA1C, le profil lipidique, la glycémie et les marqueurs immunitaires et antioxydants. Une étude randomisée en double aveugle fut menée chez 49 patients iraniens âgés de 20 à 60 ans présentant un taux d'HbA1C  $\geq 7,5$  % (171).

Les patients furent divisés en deux groupes au hasard : l'un reçut le placebo et l'autre reçut des compléments alimentaires de l'entreprise Stemtech. Les patients du groupe *Stemtech* prirent une gélule de StemFlo® (voir [annexe 1](#) : composition des compléments alimentaires) avant le petit-déjeuner et deux gélules de StemEnhance® (voir [annexe 1](#) : composition des compléments alimentaires), contenant 500 mg d'extrait soluble d'AFA, après chaque repas pendant 12 semaines. Le protocole pour le groupe prenant le placebo fut le même.

Durant toute la durée de l'étude, il a été demandé aux patients de conserver leur régime alimentaire habituel et de ne prendre aucun autre complément alimentaire. Une seule personne du groupe placebo s'est plainte de nausée mais aucun autre effet indésirable significatif n'a été rapporté.

## Marqueurs biochimiques

	Placebo		P-value	StemTech <sup>TM</sup>		P-value
	Avant	Après		Avant	Après	
FBG (mg / dl)	179,9 ± 63,3	157,4 ± 39,9	0,217	187,9 ± 54,9	167,2 ± 66,2	0,079
HbA1c (%)	8,5 ± 1,8	8,2 ± 1,6	0,393	9,1 ± 1,8	8,3 ± 1,6	0,006
Triglycéride (mg / dl)	214,1 ± 106,9	155,7 ± 59,8	0,300	173,9 ± 74,8	176,5 ± 74,3	0,810
Cholestérol total (mg / dl)	174,9 ± 62,7	170,1 ± 42,9	0,657	174,9 ± 25,5	172,1 ± 27,0	0,646
C-LDL (mg / dl)	81,8 ± 40,7	94,9 ± 35,9	0,127	90,0 ± 20,9	89,5 ± 21,0	0,913
C-HDL (mg / dl)	40,5 ± 8,8	41,0 ± 9,6	0,780	43,6 ± 7,8	43,9 ± 9,2	0,840
CRP (mg / L)	2,7 ± 2,4	2,5 ± 3,0	0,621	2,9 ± 2,7	3,0 ± 2,5	0,347
AST (U / L)	22,1 ± 8,6	21,9 ± 8,3	0,927	23,4 ± 15,3	21,5 ± 9,7	0,334
ALT (U / L)	33,3 ± 26,1	29,3 ± 18,8	0,171	29,3 ± 13,7	26,7 ± 10,4	0,200
BUN (mg / dl)	25,9 ± 15,6	25,8 ± 15,2	0,950	22,8 ± 10,4	22,3 ± 8,3	0,807
Créatinine (mg / dl)	0,99 ± 0,19	0,95 ± 0,18	0,053	0,95 ± 0,16	0,93 ± 0,13	0,433

FBG; Glycémie à jeun, HbA1c; Hémoglobine glyquée, LDL-C; Lipoprotéines de basse densité, cholestérol, HDL-C; lipoprotéines de haute densité, cholestérol, CRP; Protéine C réactive, AST; aspartate aminotransférase, ALT; Alanine transaminase BUN; azote uréique sanguin WBC; globule blanc, RBC; des globules rouges

Les données sont la moyenne ± l'écart type et le pourcentage indiqué

**Figure 56 : Comparaison des évaluations biochimiques avant et après étude entre les deux groupes**

Les résultats sont les suivants (figure 56)

- **Pour le placebo** : aucune différence significative pour tous les paramètres entre Sem<sup>-12</sup> et Sem<sup>+12</sup>
- **Pour le groupe StemTech** : diminution significative de l'hémoglobine glyquée entre Sem<sup>-12</sup> et Sem<sup>+12</sup>  
aucune autre différence significative pour le reste des paramètres

L'hémoglobine glyquée est un reflet de la glycémie sur trois mois à l'inverse de la glycémie capillaire ou à jeun qui sont des mesures instantanées de l'état glycémique du patient. Plus la glycémie est élevée et plus la quantité de glucose fixée sur l'hémoglobine est importante. L'HbA1c permet donc d'évaluer l'équilibre glycémique sur une plus longue période.

L'hémoglobine glyquée du groupe StemTech a diminué au bout de 3 mois tandis que la glycémie à jeun n'a pas été modifiée ce qui est donc contre-intuitif.

## Marqueurs immunologiques

	Placebo		Valeur P	StemTech <sup>TM</sup>		Valeur P
	Avant	Après		Avant	Après	
TNF-α (pg / ml) a	118,4 (104,8-226,8)	107,3 (100,1-304,4)	0,481	114,1 (99,2-248,4)	109,0 (101,4-353,8)	0,230
IL-6 (pg / ml) a	43,5 (38,7-72,5)	43,8 (38,3-99,7)	0,313	42,1 (39,6-66,6)	43,4 (36,8-81,5)	0,584
MDA (μmol / l) a	6,0 (5,0-10,5)	6,3 (5,1-12,5)	0,296	6,0 (4,9-11,3)	6,5 (5,4-26,0)	0,289
CD-34 <sup>+</sup> (%)	0,72 ± 0,15	0,88 ± 0,20	0,101	0,77 ± 0,15	0,82 ± 0,21	0,488

TNF- α; Facteur de nécrose tumorale alpha, IL-6; Interleukine-6, MDA; malondialdéhyde

**Figure 57 : Comparaison du marqueur cellulaire, des paramètres immunologiques et du niveau d'antioxydant avant et après intervention entre les deux groupes**

Comme le montre ce tableau (figure 57), aucune différence significative des taux plasmatiques de MDA, de TNF-α, d'IL-6 et du marqueur CD34<sup>+</sup> n'a été observée avant et après les 12 semaines dans les groupes placebo et StemTech.



## **Conclusion de l'étude**

Dans cette étude, les chercheurs ont uniquement réussi à démontrer une diminution du taux d'hémoglobine glyquée à 3 mois suite à la prise de l'extrait d'AFA.

D'autres facteurs que la glycémie peuvent influencer le taux d'hémoglobine glyquée et donc en fausser l'interprétation. L'explication la plus vraisemblable est que, par sa richesse en fer, l'extrait d'AFA aurait augmenté la production d'hémoglobine totale. Cette augmentation a donc contribué à la diminution de l'hémoglobine glyquée puisqu'elle était plus « diluée ». Ce mécanisme est toutefois à confirmer par d'autres études ultérieures.

En conclusion, cette étude n'a pas été concluante et est même contradictoire avec d'autres études. Les résultats concernant la diminution de l'hémoglobine glyquée sont aujourd'hui trop fragiles pour affirmer qu'AFA joue un rôle dans le diabète de type 2.

## **L. Effet sur la régénération musculaire**

### **1) Muscle tibial**

En 2010, Christian Drapeau et son équipe s'intéressèrent à l'extrait soluble d'AFA, provenant du complément alimentaire StemEnhance® (SE) (voir annexe 1 : composition des compléments alimentaires), sur la régénération musculaire chez des souris ayant reçu de la cardiotoxine. Cette molécule, issue d'un venin de serpent, a la capacité d'entraîner une destruction des muscles squelettiques. Dans cette expérience, il fut provoqué une destruction du muscle tibial antérieur droit (172).

Les chercheurs irradièrent la moelle osseuse de soixante souris femelles. Puis le lendemain, pour reconstituer leur moelle osseuse, une transplantation avec de nouvelles cellules souches hématopoïétiques fut effectuée. Ces nouvelles cellules avaient, au préalable, été marquées avec une protéine fluorescente verte : la GFP (Green Fluorescent Protein) issue de la méduse *aequora victoria*.

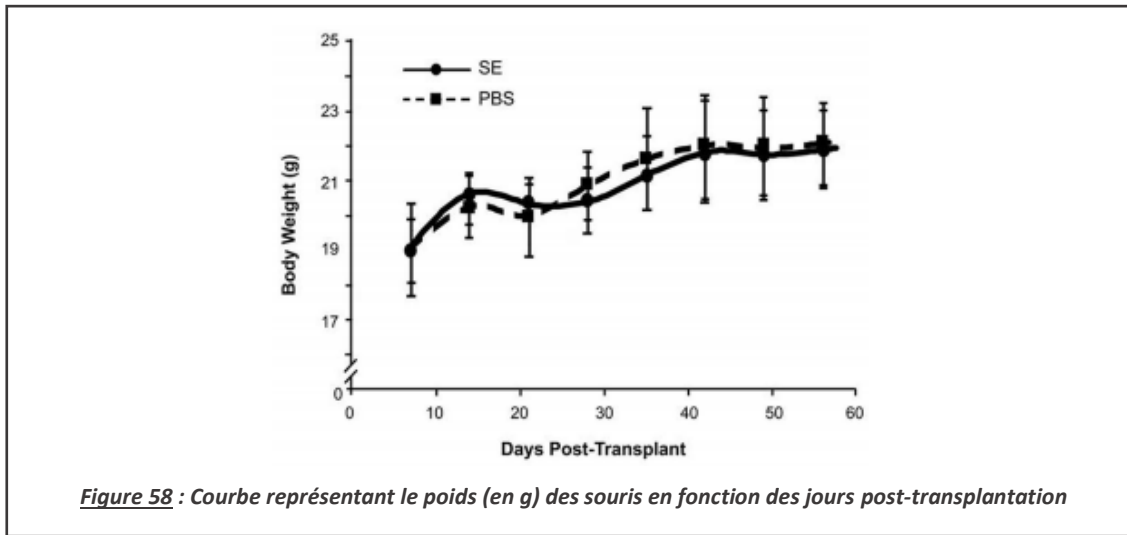
Immédiatement après cette greffe, les souris furent traitées quotidiennement avec soit 300 mg/kg d'extrait soluble d'AFA dissous dans 1 mL de PBS soit uniquement par 1 mL de PBS (contrôle). La répartition dans ces deux groupes était de 50/50.

## **Innocuité de l'extrait soluble d'AFA**

Aucun animal testé n'est décédé au cours de l'expérience suite à l'administration de l'extrait d'AFA soluble.

Aucun signe de toxicité ou d'inconfort n'a été détecté chez les animaux.

Pour évaluer l'impact de l'extrait d'AFA sur la croissance des souris, elles furent pesées chaque semaine, pendant 8 semaines.



Selon cette courbe ([figure 58](#)), les souris traitées au SE ont le même profil de croissance que le groupe contrôle PBS. Aucune différence significative n’a donc été observée.

### Récupération hématopoïétique

Suite à la transplantation, trois souris prises au hasard dans chaque groupe furent sacrifiées afin de visualiser si les nouvelles cellules souches greffées avaient entraîné une récupération hématopoïétique. Cette expérience a été effectuée sur plusieurs jours post-greffe.

	WBC (10 <sup>3</sup> /μl)		RBC (10 <sup>3</sup> /μl)		HGB (10 <sup>3</sup> /μl)		HCT (10 <sup>3</sup> /μl)		Platelet (10 <sup>3</sup> /μl)	
Day	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28
PBS	1.93	5.05	10.10	10.11	14.20	14.13	48.47	45.97	518	976
SE	1.26	6.12	9.16*	9.47*	12.80*	13.00*	44.03*	43.27*	761	759
Reference Values	4.54 ± 1.84		9.89 ± 0.44		15.2 ± 0.6		48.8 ± 1.8		1336 ± 82	
	PMN (10 <sup>3</sup> /μl)		Lymph (10 <sup>3</sup> /μl)		Mono (10 <sup>3</sup> /μl)		Eos (10 <sup>3</sup> /μl)		Baso (10 <sup>3</sup> /μl)	
Day	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28
PBS	0.65	0.85	1.07	3.84	0.05	0.07	0.14	0.26	0.01	0.02
SE	0.50	1.14	0.58*	4.43	0.04	0.10	0.12	0.40	0.01	0.02
Reference Values	0.41 ± 0.26		4.08 ± 1.62		0.05 ± 0.08		0 ± 0		0 ± 0	

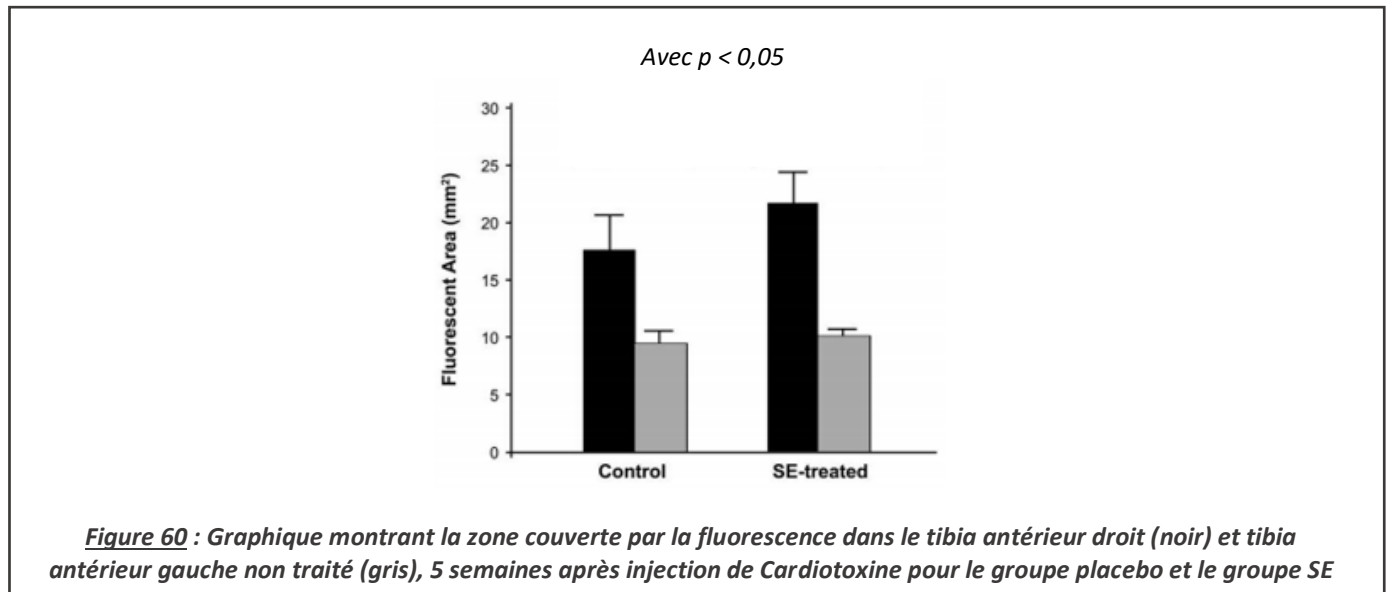
Asterisks (\*) indicate statistically significant differences between the two groups.

**Figure 59 : Numération des globules blancs (WBC), les globules rouges (RBC), l’hémoglobine (HGB), l’hématocrite (HCT), les plaquettes (Platelet) à J<sub>14</sub> et J<sub>28</sub> après l’irradiation et la transplantation dans le groupe traité par SE et dans le groupe contrôle**

Selon les résultats du tableau ci-dessus ([figure 59](#)), on note une légère diminution significative pour la lignée érythrocytaire (RBC, HGB, HCT) et pour la lignée lymphocytaire, uniquement à J<sub>14</sub>, par rapport au contrôle. Néanmoins, globalement tous les paramètres hématopoïétiques étaient proches de la normale au 28<sup>ème</sup> jour ce qui suppose donc que la greffe a bien fonctionné pour les deux groupes. Ainsi, SE n’a pas d’impact négatif sur la production des cellules hématopoïétiques.

## Récupération des dommages causés par la cardiotoxine

Les chercheurs ont analysé l'étendue de la récupération tibiale en mesurant la zone de fluorescence retrouvée dans ce muscle. Pour cette expérience, les six animaux restants de chaque groupe furent traités le 23<sup>ème</sup> jour post-greffe avec de la cardiotoxine, injectée au niveau du tibia droit. Les animaux ont continué à être traités avec le placebo ou SE pendant 5 semaines et furent sacrifiés au 59<sup>ème</sup> jour.



RÉSULTATS				
<i>mm<sup>2</sup> : zone couverte par la fluorescence dans le muscle tibial</i>				
<i>Groupe contrôle</i>		<i>Groupe traité par SE</i>		
<i>Tibia droit</i>	<i>Tibia gauche</i>	<i>Tibia droit</i>	<i>Tibia gauche</i>	
Régénération à 5 semaines	17,5 à 3,0 mm <sup>2</sup>	8 à 0,8 mm <sup>2</sup>	21,7 à 2,8 mm <sup>2</sup> <i>Avec <math>p &lt; 0.05</math> par rapport au tibia droit du groupe contrôle - tibia droit</i>	8,4 à 1,0 mm <sup>2</sup>

L'étendue de fluorescence dans le tibia droit est significativement plus importante dans le groupe traité par SE par rapport au groupe contrôle ( $p < 0,05$ ). Concernant l'étendue de fluorescence dans le tibia gauche, on n'observe aucune différence significative entre les deux groupes (figure 60).

Cela montre que les cellules souches de la moelle osseuse se sont dirigées préférentiellement vers le tibia droit, muscle endommagé par la cardiotoxine.

## **Conclusion de l'étude**

Tout d'abord si l'on se rapporte à la dose administrée aux souris, pesant en moyenne 20 g, on s'aperçoit qu'elle représente dix fois la dose de celle administrée chez l'Homme, définie par les fabricants de StemEnhance®, soit 3 g/jour. Néanmoins, il n'existe pas d'équivalence de dose entre la souris et l'Homme puisque nous ne possédons pas le même métabolisme. Il faudra mener des études *in vivo* chez l'Homme pour déterminer la dose à laquelle on observera une régénération d'un muscle lésé.

Concernant la mobilisation des CSH de la moelle osseuse, bien qu'elle soit plus importante dans le groupe traité par SE, elles sont aussi présentes dans le groupe contrôle. Cela permet d'une part de montrer le rôle naturel des cellules souches dans la régénération d'un tissu lésé et en outre, de montrer que le complément SE renforce cet effet.

Dans cette expérience, les chercheurs ont élégamment observé une fluorescence dans le tibia gauche ainsi que dans la plupart des organes nobles, tel le cœur, le cerveau, les reins, le foie et les poumons. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes. Cela sous-entend que même si les cellules souches de la moelle osseuse migrent préférentiellement dans les tissus lésés, elles ont aussi la capacité d'aller sur d'autres sites sains. Jacques Prunier, chercheur en biologie disait : « Le cœur que nous avons aujourd'hui n'est pas le cœur que nous avions il y a 10 ans : il a complètement été renouvelé mais il y a une mémoire cellulaire qui se transmet ». Cela illustre le fait que les cellules souches sont impliquées dans le renouvellement constant de nos cellules.

En conclusion, les chercheurs ont réussi à démontrer que les cellules souches se répartissent naturellement de manière homogène dans tous les tissus de l'organisme, et que lorsqu'un tissu est endommagé, ces dernières seront attirées sur ce site. Il existe donc des signaux chimiotactiques impliqués dans cette migration préférentielle. Ce fut d'ailleurs, l'objet d'une étude menée par le professeur Jensen.

### **2) Muscle cardiaque**

Lors d'une conférence, le professeur Jacques Prunier mentionna une autre étude ayant démontré les effets d'AFA dans la régénération musculaire. Cette étude fut réalisée sur une centaine de souris sur lesquelles les chercheurs provoquèrent un infarctus du myocarde par ligature temporaire des artères coronaires. Là encore, les cellules de moelle osseuse des souris avaient été préalablement irradiées et remplacées par des cellules marquées à la GFP.

Suite à cet accident cardiaque, seules cinquante souris de l'étude reçurent une supplémentation en AFA. Les résultats constatés furent alors les suivants après 27 jours :

	<b>AFA (-)</b>	<b>AFA (+)</b>
<b>% de survivants</b>	<b>17</b>	<b>73</b>
<b>Reconstruction de la membrane ventriculaire</b>	<b>Légère</b>	<b>Totale</b>

Face à ces résultats, les chercheurs se demandèrent ensuite si la reconstruction ventriculaire était due aux cellules souches déjà présentes dans le cœur ou bien à la migration des cellules souches de la moelle osseuse. Cette question fut résolue par le fait qu'au sein du myocarde 30 % des cellules souches fluoresçaient, ce qui témoigne la migration des cellules souches en provenance de la moelle osseuse. Ainsi, les chercheurs montrèrent qu'AFA permet d'augmenter la récupération musculaire d'un site lésé (173).

## M. Effet sur le cerveau

Contrairement à la plupart des organes, le cerveau est isolé de la circulation générale par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Certaines substances directement disponibles pour d'autres organes ne le sont pas pour le cerveau du fait de cette protection. Les substances lipophiles sont des composés qui peuvent passer la BHE, à l'inverse des composés hydrosolubles qui nécessiteront des mécanismes de transport sélectifs.

Pour assurer son bon fonctionnement, le système nerveux central a besoin d'un certain nombre d'acides aminés présents dans notre alimentation. Les acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine, l'histidine et l'arginine sont utilisés par le cerveau pour la synthèse de divers neurotransmetteurs et neuromodulateurs (174).

Par sa richesse en acides aminés, AFA constitue une véritable nourriture pour notre cerveau, d'où son surnom de « brainfood ». Le docteur Gabriel Cousens, dans un article de Body, Mind Spirit en avril 1995, affirmait : « la plus grande valeur de l'AFA ne vient pas seulement de sa concentration en nutriments ni même de ses précurseurs de neuropeptides mais de son effet positif incroyable sur le système nerveux. [...] Les personnes qui prennent de l'AFA ont systématiquement signalé : une augmentation générale de la vigilance et de la résistance mentale à court et à long terme, une meilleure mémoire, une créativité améliorée, un meilleur sentiment de concentration et de ressourcement. »

De plus, Christian Drapeau, neurochirurgien canadien, rapporte avoir observé, suite à la consommation d'AFA par ses patients atteints d'anomalies neurologiques, des normalisations de l'EEG.

### 1) Inhibition sélective de la monoamine oxydase B

La phényléthylamine (PEA), est un alcaloïde naturellement présent dans AFA. Elle est synthétisée dans l'organisme à partir de la tyrosine et de la phénylalanine, précurseurs contenus également dans la cyanobactérie AFA. Cette molécule est produite par le cerveau lorsqu'une personne est absorbée par une action, une activité. La finalité de la PEA est de contribuer à une amélioration de l'humeur, d'où son surnom de « molécule de l'amour ».

Une fois absorbée oralement, la PEA passe la BHE et se trouve directement disponible pour le cerveau. La PEA a la capacité de stimuler la libération de la noradrénaline et de la dopamine ainsi que d'inhiber leur recapture, augmentant ainsi la concentration de ces deux neurotransmetteurs dans la fente synaptique. L'augmentation de la disponibilité de la dopamine et de noradrénaline est un bénéfice certain pour traiter certains troubles comme la dépression, la schizophrénie ou encore le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (175).

Malheureusement, cette PEA est dégradée rapidement par la monoamine oxydase de type B (MAO-B) de notre organisme. Une étude fut menée en 2014, par le chercheur Scoglio S., pour savoir si la phycocyanine et les acides aminés analogues de la mycosporine (MAA), contenus dans AFA, avaient une activité inhibitrice sur la MAO-B mais aussi sur la MAO-A. Bien que seule la MAO-B soit impliquée dans la dégradation de la PEA, l'inhibition de la MAO-A joue aussi un rôle dans l'amélioration de l'humeur puisque cette dernière inactive les neurotransmetteurs : noradrénaline, dopamine et sérotonine. (176)

AFA contient des quantités variables de PEA, allant de 1 à 3 mg/g, c'est pourquoi un complément alimentaire (Klamin<sup>®</sup>) (voir annexe 1 : composition des compléments alimentaires) a été utilisé dans cette étude afin d'avoir une concentration stable de 15 mg pour 1 g d'extrait.

RESULTATS		
	Sélectivité MAO-B vs MAO-A	Type d'inhibition
<b>Extrait d'AFA hydrosolubles</b> Concentration entre 2,5 et 40 µL/mL	> 6,25	Réversible mixte compétitive
<b>Phycocyanine purifiée provenant d'AFA (µM)</b>	> 3,76	Réversible non compétitive
<b>MAA purifiés provenant d'AFA (µM)</b>	> 2,02	Réversible compétitive

Concernant les MAA, on observe une inhibition compétitive de la MAO-B et une sélectivité 2,02 fois plus élevée pour cette enzyme que pour la MAO-A. Bien que ces composés présentent un faible poids moléculaire, étant hydrosolubles, ils nécessiteront des transporteurs pour franchir la BHE. Cette expérience étant réalisée *in vitro*, il faudra s'assurer que ces transporteurs existent pour permettre le passage des MAA dans le cerveau.

A l'inverse, la phycocyanine est une molécule de grande taille et de ce fait, l'inhibition non compétitive de la MAO-B pourrait être due tout simplement à son important volume. Toutefois, sa sélectivité étant 3,76 fois plus élevée pour la MAO-B que pour la MAO-A, nous sommes bien en présence d'une inhibition fonctionnelle et non tridimensionnelle. Par contre, il est nécessaire de réaliser d'autres études, *in vivo*, pour déterminer comment la phycocyanine agit au niveau cérébral puisque sa taille et sa nature hydrophile ne lui permettent pas de passer la BHE.

En ce qui concerne les résultats obtenus pour l'extrait hydrosoluble, on s'aperçoit que l'inhibition est dite mixte compétitive et que la sélectivité est 6,25 fois plus élevée pour la MAO-B que pour la MAO-A. Ce résultat peut s'expliquer, ici, par la somme des deux types d'inhibition observés pour la phycocyanine et les MAA. Il existe peut-être des composants d'AFA plus ou moins compétitifs, autres que ceux étudiés, qui sont susceptibles de jouer un rôle dans l'inhibition de la MAO-B.

En conclusion, ces résultats montrent que la phycocyanine et les MAA sont de puissants inhibiteurs sélectifs de la MAO-B. Néanmoins, cette étude étant réalisée *in vitro*, on ne peut rien conclure quant à leur effet sur le système nerveux central car nous ignorons si ces deux molécules passeront la BHE. Par contre, si c'est le cas, AFA permettraient effectivement d'inhiber la dégradation de la PEA, augmentant ainsi ses taux.

Point positif de l'étude, l'action inhibitrice est réversible. Cela permettrait donc d'éviter les inconvénients des IMAO-B de synthèse comme les antidépresseurs ou autres médicaments utilisés dans les maladies neurodégénératives qui eux exercent leur inhibition de manière irréversible.

Enfin, la phycocyanine et les MAA étant tous deux des antioxydants, ils pourront donc jouer un rôle neuroprotecteur car les radicaux libres ont la capacité de franchir la BHE. Ainsi, l'activité antioxydante des composants d'AFA peut apporter une vraie valeur supplémentaire au niveau cérébral.

#### a. Application dans la dépression

La dépression est une maladie qui se caractérise par une grande tristesse, une diminution du sentiment de plaisir une perte de motivation et des facultés de décision, un sentiment de désespoir, des pensées morbides, l'impression de ne pas avoir de valeur en tant qu'individu ainsi que des troubles alimentaires et du sommeil.

Pour apprécier d'avantage les effets de la PEA, une étude fut réalisée, en 1996 par le chercheur Sabelli H., sur quatorze patients dépressifs en phase de rémission : des patients atteints d'épisodes dépressifs majeurs et des patients atteints de troubles bipolaires.

Les patients ont arrêté leurs traitements 2 semaines avant s'ils prenaient des IMAO-B et 5 semaines avant s'ils étaient sous fluoxétine. Au cours de cet essai, une supplémentation de 10 à 60 mg de PEA par jour fut initiée en plus d'un traitement initial de 10 mg de sélégiline. Cet inhibiteur sélectif irréversible de la monoamine oxydase B (MAO-B) a été utilisé pour éviter une destruction massive de la PEA administrée.

Résultat : 20 à 50 semaines plus tard, il a été constaté un maintien de la réponse antidépressive pour douze des patients : soit un maintien de la phase de rémission. Le maintien de cette réponse a été évalué grâce à l'échelle de Hamilton (HAM-D) qui permet d'évaluer la sévérité et l'évolution d'un état dépressif en fonction des symptômes des patients. Au cours de toutes ces semaines, les patients avaient toujours reçu la même dose de PEA, sans augmentation. Cela montra que l'efficacité de la dose de départ ne diminuait pas avec le temps. Aucun effet indésirable n'avait été observé comme la prise de poids, très fréquente avec les antidépresseurs. (177)

Une autre étude fut réalisée chez trente femmes ménopausées dépourvues de traitement hormonal pour évaluer le rôle de l'extrait d'AFA (Klamin®) (voir annexe 1 : composition des compléments alimentaires) dans le bien-être général et psychologique de ces femmes. La ménopause se traduit par un changement significatif dans la vie des femmes à cause de la chute des hormones et beaucoup prennent une thérapie hormonale substitutive pour compenser cette carence.

Un premier groupe a reçu de l'extrait d'algue AFA (Klamin®) à raison d'une prise deux fois par jour et l'autre groupe, avec les mêmes prises, a reçu un placebo. Au bout de huit semaines, les profils hormonaux et psychologiques, notamment les symptômes ressentis, ont été évalués. Bien qu'aucun changement hormonal ne se soit produit dans les deux groupes, on constata néanmoins que seules les patientes sous l'extrait d'AFA avaient présenté une amélioration significative de leur qualité de vie, de leur humeur et une diminution de l'anxiété et de leur attitude dépressive.

Bien qu'AFA ne possède pas d'activité hormonale de type stéroïde, on constate que cette cyanobactérie peut s'avérer être une réelle alternative pour toutes les femmes supportant mal les effets de la ménopause notamment au niveau de l'humeur (178) (179).

En conclusion de ces deux études, nous pouvons dire qu'AFA joue un rôle dans l'amélioration de l'humeur des personnes dépressives, amélioration qui semble en partie liée à la présence de PEA. Si l'on ajoute la possibilité qu'AFA inhibe de manière sélective la MAO-B au niveau neuronal, cela renforce l'intérêt de son utilisation dans la prise en charge de la dépression.

#### b. Application dans les troubles déficitaires de l'attention

Le trouble déficitaire de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) est un trouble neurologique qui apparaît durant l'enfance et qui touche environ 4 à 9 % des enfants. Ce trouble est lié à des anomalies de développement et de fonctionnement du cerveau et se caractérise par des troubles de l'attention, de l'impulsivité et/ou de l'hyperactivité motrice.

On retrouve, chez les patients atteints de TDAH, des taux inférieurs d'acide phénylacétique (PAA) dans les urines, produit de dégradation de la PEA, ainsi que des taux de tryptophane et tyrosine diminués. Pour renforcer la prise en charge des patients, la PEA peut être suggérée comme une alternative « sans danger » aux médicaments, tels que les amphétamines ou le méthylphénidate, qui s'accompagnent de nombreux effets indésirables ainsi que des problèmes d'accoutumance.

Plusieurs observations ont été faites, dans un premier temps, sur des enfants sains pour montrer l'impact de la consommation d'*Aphanizomenon flos aquae* sur leur scolarisation.

### ❖ Etude de 1992 : Karl J. Abrams

Le professeur Karl J. Abrams réalisa une étude sur 1482 enfants ayant consommé 1g d'AFA pendant 1 an et constata une amélioration du rendement scolaire de 64 à 81 % avec amélioration de la concentration, plus d'attention en classe, moins d'anxiété, de dépression ou d'agressivité.

### ❖ Etude de 1995 : Nicaragua – Universidad Centro Americana

Deux chercheurs, Sevilla et Aguirre ont étudié, sur 1 567 écoliers de CE<sub>1</sub> et CE<sub>2</sub>, les effets de la consommation d'un gramme d'AFA sur leurs comportements scolaires pendant 6 mois. Il a été constaté :

- Une augmentation de 54 % de participation en classe
- Une augmentation de 21 % de présence en classe
- Une amélioration de l'état physique : cheveux, peau et de la santé générale, les enfants tombaient moins souvent malades
- Une amélioration de 81 % des résultats scolaires des enfants, les enfants étaient plus investis dans les activités scolaires.

Le Nicaragua est un pays où la malnutrition touche près de deux tiers de la population. Les résultats positifs de l'ajout d'AFA au régime alimentaire des enfants montrèrent que par sa richesse, AFA pouvait suppléer les enfants dénutris pour permettre le bon fonctionnement de leur système nerveux.

### ❖ Etude de 1997 : Harvard, Massachusetts – Center for Family Wellness

Claudia Jarratt et son équipe menèrent une étude sur un nombre plus réduit d'enfants : 142 enfants consommant entre 0,5 g et 1 g d'AFA par jour durant dix semaines. Il a été constaté :

- Une amélioration des compétences sociales avec les pairs
- Une diminution de l'anxiété et des syndromes dépressifs
- Une meilleure capacité à suivre les instructions et à se concentrer sur les tâches
- Une amélioration significative de l'attitude des enfants ayant des comportements à problèmes

Cette étude ci a surtout permis de montrer que la consommation d'AFA chez des enfants en difficulté d'apprentissage ou confrontés à des problèmes sociaux et comportementaux permettait de diminuer de manière significative les difficultés qu'ils pouvaient rencontrer.

### ❖ Etude de 1998 : Sierra Vista, AZ – The Stillwell Learning Center

Jeffrey Bruno, Ph.D., Joe-Jo Gittelman et Barry Tuchfeld, menèrent une étude sur 31 enfants engagés dans un programme spécial de lecture. Les enfants consommaient soit 1,5 g, soit 3 g d'AFA par jour durant trois mois. Les résultats montrent :

- Une amélioration comportementale significative sur l'échelle d'évaluation de Connors remplie par les parents et les enseignants
- Une augmentation de 40 % du score moyen des enfants concernant la mémoire
- Une augmentation de 40 % du score moyen des enfants concernant la concentration
- Une augmentation spectaculaire de la fréquentation des cours dirigés
- Une diminution générale des symptômes physiques et des plaintes

Dans cette étude il a aussi été observé une diminution significative des taux d'aluminium, éléments chimiques toxiques au niveau neuronal, pouvant être lié aux difficultés d'apprentissage.



## ❖ Etude de 2017 :

Dans un deuxième temps, les chercheurs s'intéressèrent aux enfants atteints de TDAH. En 2017, le chercheur Maurizio Cremonese évalua l'efficacité du complément alimentaire Klamin® (voir annexe 1 : composition des compléments alimentaires) sur un groupe de trente sujets, âgés de 6 à 15 ans, atteints de TDAH (évalué selon le DMS). (180)

Au cours de cette étude, les enfants reçurent pendant 6 mois le complément alimentaire Klamin® comportant :

- Une concentration moyenne de PEA de 13 mg/g (entre 11 - 15 mg/g)
- Un pourcentage en phycocyanine de 5 % à 7 % de l'extrait d'AFA séché
- Un pourcentage d'acides aminés de type mycosporine de 0,8 % à 1 % de l'extrait d'AFA séché

Poids (kg)	Dosage du complément alimentaire Klamin® le 1 <sup>er</sup> mois de l'expérience (mg/jour)	Dosage du complément alimentaire Klamin® du 2 <sup>ème</sup> au 6 <sup>ème</sup> mois de l'expérience (mg/jour)
< 25	125	250
> 25	300	600
> 40	600	1200

Les résultats, pour les 25 sujets ayant terminé l'étude, sont les suivants :

<b>C-GAS</b> (Child Global Assessment Scale) : évaluation du fonctionnement global du patient	<b>A T0 : début de l'étude</b> <b>T1 : fin de l'étude à 6 mois</b>			
<b>SNAP IV</b> : évaluation des aspects comportementaux liés à l'inattention, l'hyperactivité, l'impulsivité, ou aux troubles oppositionnels avec provocation				
<b>Conners</b> : évaluation par les parents des enfants de la perception de la gravité des symptômes				
<b>London Tower</b> (test de la tour de Londres) : évaluation des fonctions exécutives				
<b>WISC III</b> (Wechsler Intelligence Scale) : évaluation du raisonnement arithmétique, de la mémoire verbale à court terme et de la liberté d'effectuer des distractions				
<b>Bell's test</b> (test des cloches) : évaluation des fonctions d'attention, de rapidité				

<i>Repeated measures analysis</i>		<i>Tests of within-subjects contrasts</i>	
<i>Tests</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>P</i>
C-GAS	65.28	70.68	<.001*
SNAP IV inattention	12.64	16.28	.002*
SNAP IV hyperactivity	11.32	14.36	.005*
SNAP IV tot	24.32	30.64	.002*
SNAP IV Subscale ODD	4.72	4.44	.743
Conners'	1.50	1.64	.188
London Tower	-1.42	-0.4	.002*
Arithmetic (WISC III)	6.96	6.84	.513
Memory (WISC III)	7.36	7.4	.885
Score LD (WISC III)	81.83	80.42	.682
Bell's test Quickness	-1.36	-0.8	<.001*
Bell's test Carefulness	-1.85	-0.9	<.001*

**Figure 61** : Evaluation des enfants à l'aide de test standardisés

**Figure 61 : Evaluation des enfants à l'aide de test standardisés**

Afin de s'assurer de la sécurité du complément alimentaire, des tests réguliers furent effectués tout au long de l'étude au 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> mois (état clinique, fonction urinaire, signes vitaux...) ainsi qu'une prise de sang au 6<sup>ème</sup> mois. A la fin de l'étude, aucune anomalie n'a été détectée.

Les résultats de la figure 61 montrent qu'une prise de Klamin® pendant 6 mois permet d'améliorer significativement l'état des enfants atteints de TDAH, état relevé par les résultats des différents tests. Mais à ce jour, nous n'avons que des observations : aucune analyse scientifique précise n'a été faite sur les

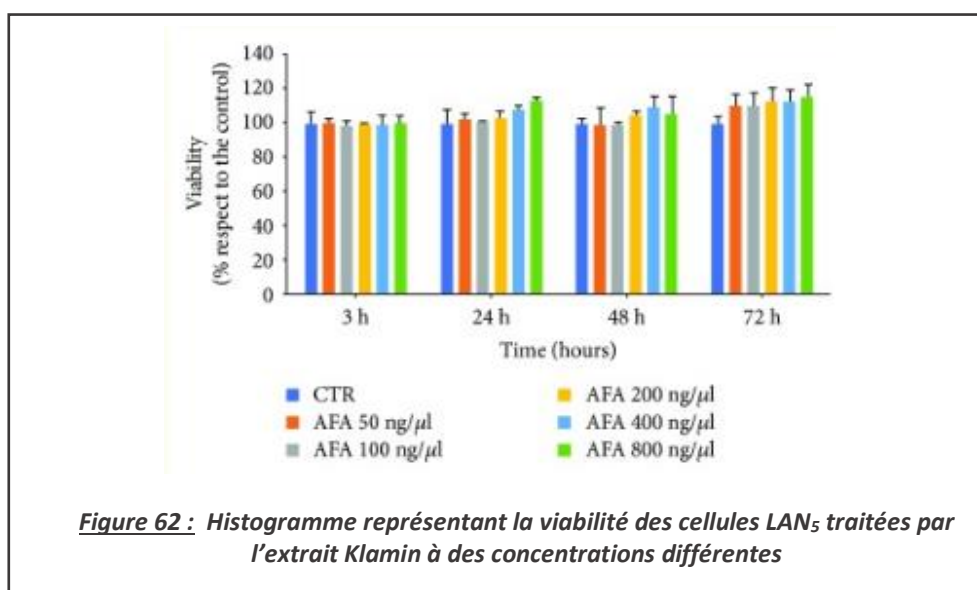
molécules impliquées, autre que la PEA, ainsi que sur les mécanismes impliqués pour observer ces effets. Néanmoins, ces observations sont encourageantes et la recherche doit être poursuivie.

## 2) Propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-fibrillogénèse sur le cerveau

En 2018, une étude réalisée, par le chercheur D. Nuzzo, a été menée sur le complément alimentaire Klamin® (voir annexe 1: composition des compléments alimentaires), afin d'étudier ses potentiels effets antioxydants, anti-inflammatoires et anti-fibrillogénèse au niveau cérébral. Au cours des différents essais *in vitro*, un extrait soluble de Klamin® a été utilisé, extrait dont la composition a été déterminée par analyse spectrométrique (181).

### Evaluation de la cytotoxicité d'AFA

Les chercheurs ont voulu exclure toute toxicité de l'extrait d'AFA étudié. Pour évaluer le profil toxicologique de la cyanobactérie AFA, des cellules issues d'une lignée cellulaire d'un neuroblastome, appelées « LAN<sub>5</sub> » ont été incubées avec différentes concentrations d'extrait. Puis, un test de prolifération cellulaire basé sur une méthode colorimétrique a été réalisé pour quantifier les cellules viables.



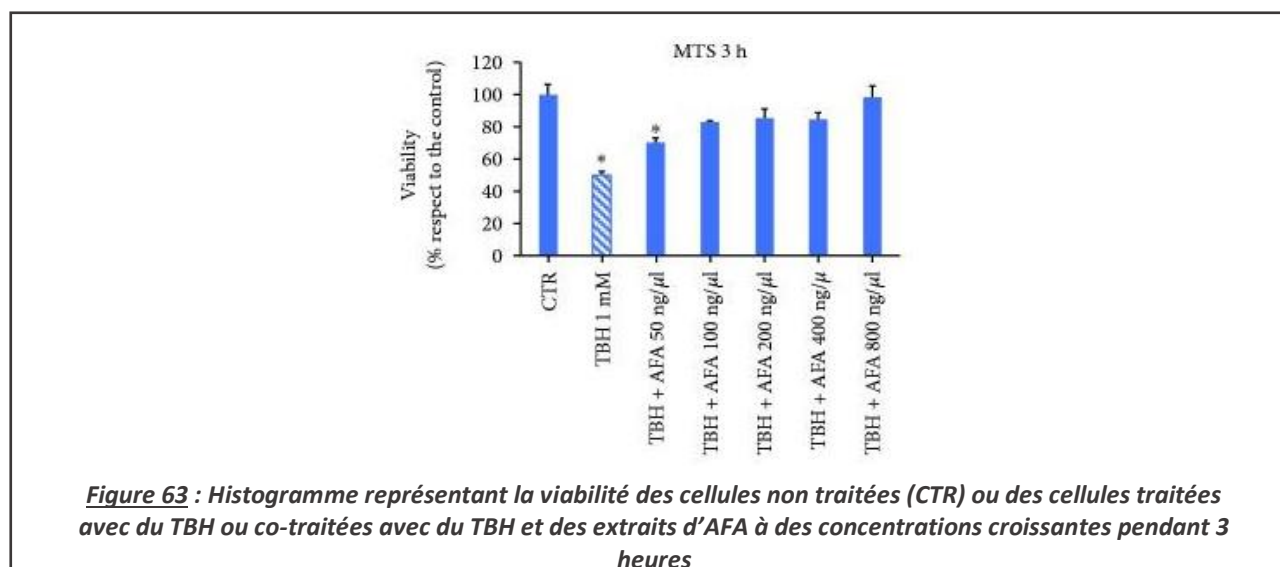
Les résultats obtenus (figure 62) ne montrent aucune différence significative par rapport au contrôle quelle que soit la concentration d'extrait utilisé (de 50 à 800 ng/μL). Ces résultats ont été confirmés par une observation morphologique au microscope où aucun dommage cellulaire n'a été observé.

Klamin® ne présente donc aucune cytotoxicité sur la lignée cellulaire LAN<sub>5</sub>, même à des doses élevées, cela signifie donc qu'il est exempt de molécule toxique. Ce premier essai est donc rassurant quant à l'utilisation du complément.

a. Pouvoir antioxydant : ERO provoquées par le TBH, un agent oxydant

L'action antioxydante de l'extrait d'AFA a été évaluée en traitant les cellules LAN<sub>5</sub> avec un agent oxydant : l'hydroperoxyde de tert-butyle (TBH). Ce traitement permet d'induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) responsables par la suite d'un stress oxydatif au sein des cellules.

❖ **Prévention du stress oxydatif au niveau cellulaire**



Les résultats de l'histogramme de la figure 63 montrent que l'extrait d'AFA augmente, de manière dose-dépendante, la viabilité des cellules LAN<sub>5</sub> par rapport aux cellules exposées au TBH. La cyanobactérie AFA semble donc protéger les cellules LAN<sub>5</sub> lorsqu'elles sont soumises à un stress oxydatif provoqué par des ERO.

Suite à ces premiers résultats, une deuxième expérience a été réalisée afin d'établir un lien entre AFA et la formation d'ERO. Afin de détecter leur présence dans le cytoplasme des cellules, une sonde fluorescente a été utilisée : plus il y a d'ERO et plus la fluorescence sera importante.

Les résultats, suite à l'analyse de la fluorescence au microscope, ont révélé une fluorescence intense des cellules LAN<sub>5</sub> traitées avec du TBH tandis qu'à l'inverse, aucune fluorescence n'a été observée pour le contrôle.

Concernant la cyanobactérie AFA, les résultats ont montré que la présence de Klamín® entraînait une baisse de la fluorescence à partir d'une concentration d'extrait à 800 ng/μL. Cette diminution témoigne donc d'une baisse de la production d'ERO.

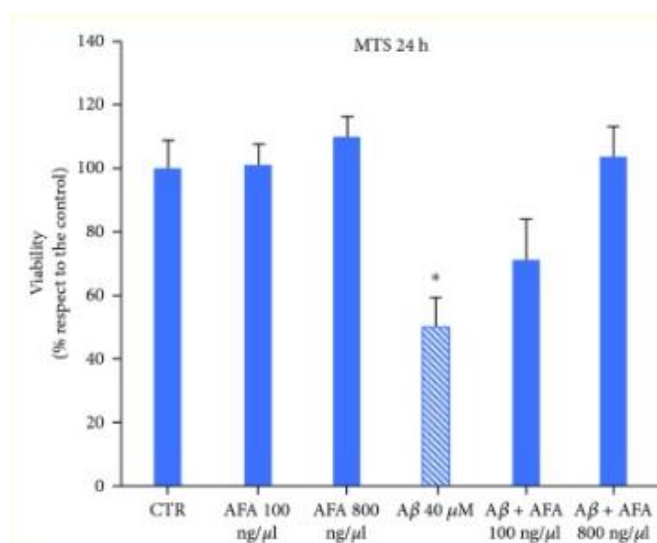
❖ **Prévention du stress oxydatif sur les mitochondries**

Lorsque les ERO touchent une mitochondrie, il se produit une phosphorylation oxydative des lipides de sa membrane. Cette modification va alors entraîner à une diminution de son potentiel membranaire, soit une dépolarisation, responsable de l'entrée en apoptose de la cellule la renfermant. Ici, l'effet protecteur de l'extrait d'AFA sur la fonction mitochondriale a été évalué par un test de fluorescence également.

Les résultats observés sont les mêmes que précédemment. Cela confirme que le complément alimentaire Klamín® permet de prévenir le dysfonctionnement mitochondrial induit par les ERO, et donc de diminuer le risque d'apoptose des cellules LAN<sub>5</sub>. Ces résultats sont d'ailleurs identiques à ceux déjà observés dans l'étude du chercheur Xue X. en 2015.

b. Pouvoir antioxydant : ERO provoquées par le peptide A $\beta$ , un agent pro-inflammatoire

Le potentiel effet neuroprotecteur de l'extrait d'AFA a ensuite été évalué en traitant les cellules LAN<sub>5</sub> avec le peptide A $\beta$ , un peptide pro-inflammatoire. Comme précédemment, ce traitement permet d'induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) responsables par la suite d'un stress oxydatif au sein des cellules.



**Figure 64 :** Histogramme représentant les cellules LAN<sub>5</sub> (CTR) non traitées, les cellules LAN<sub>5</sub> traitées avec l'extrait seul, A $\beta$  seul et les cellules LAN<sub>5</sub> traitées avec l'extrait et A $\beta$  pendant 24 heures

Les résultats de la [figure 64](#) ont montré une augmentation de la viabilité des cellules LAN<sub>5</sub> lorsqu'elles sont traitées avec de l'extrait d'AFA à une concentration comprise entre 100 ng / $\mu$ L et 800 ng/ $\mu$ L. Comme précédemment, une observation de la morphologie cellulaire a confirmé les résultats du test de viabilité. Cette cyanobactérie semble donc protéger les cellules LAN<sub>5</sub> lorsqu'elles sont soumises à un stress oxydatif provoqué par un peptide pro-inflammatoire.

Une deuxième expérience fut réalisée pour savoir si l'extrait d'AFA pouvait réduire la génération d'ERO. L'analyse par fluorescence a montré que les cellules traitées avec le peptide A $\beta$  seul présentaient une fluorescence importante : soit un taux important d'ERO. A l'opposé, les cellules cotraitées avec l'extrait d'AFA n'ont entraîné aucun signal de fluorescence.

On peut donc en conclure que l'extrait d'AFA possède un effet bénéfique sur les neurones dans lesquels un stress oxydatif a été induite par une substance pro-inflammatoire : le peptide A $\beta$ .

c. Conclusion pouvoir antioxydant

En conclusion, Klamin® peut s'opposer à la formation d'ERO, que ces dernières soient provoquées par un agent oxydant ou bien un agent inflammatoire. Cette activité antioxydante peut être due à l'effet synergique de tous les différents composants de l'extrait d'AFA, bien qu'il soit possible que certains soient plus impliqués que d'autres. Ainsi, les caroténoïdes, la phycocyanine, les MAA, les polyphénols, les vitamines, les enzymes antioxydantes et les acides aminés contenus dans AFA, jouent un rôle antioxydant crucial en s'opposant soit à la formation des ERO soit en les neutralisant.

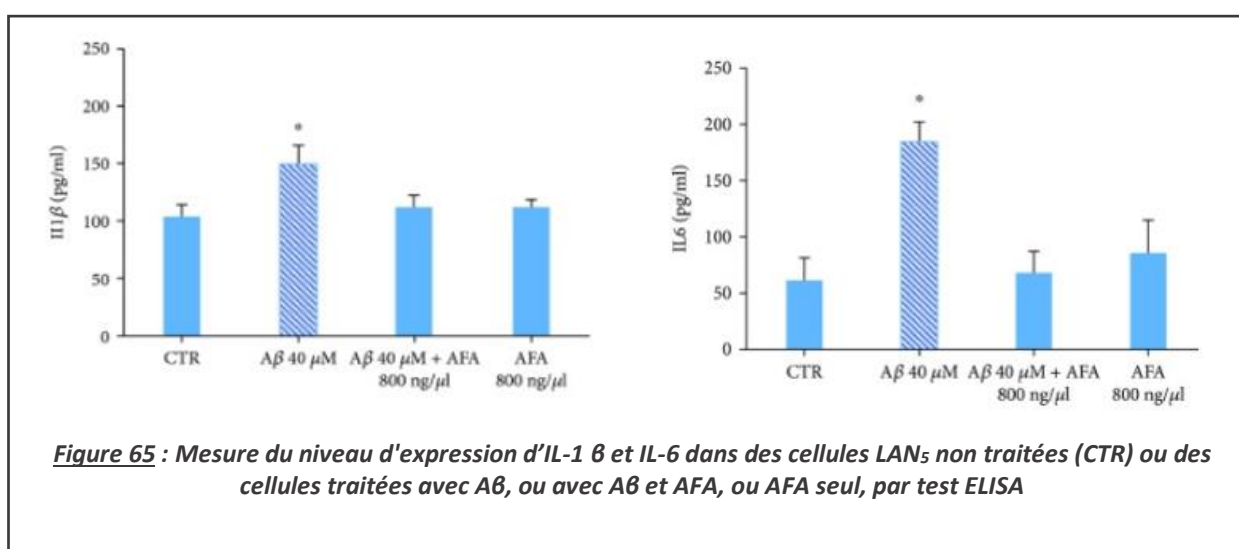
#### d. Neuroinflammation

Le NF- $\kappa$ B (facteur nucléaire kappa B) est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Une fois activé, il pénètre dans le noyau des cellules et est responsable du déclenchement de la transcription de gènes anti-apoptotiques et pro-inflammatoires.

Les chercheurs évaluèrent la capacité de l'extrait d'AFA à inhiber l'inflammation provoquée par le peptide A $\beta$  et ce, en analysant la localisation du facteur NF- $\kappa$ B activé.

L'analyse par immunofluorescence a montré que, suite à un traitement des cellules LAN<sub>5</sub> par le peptide A $\beta$ , le facteur NF- $\kappa$ B activé était localisé dans le noyau. A l'inverse, lorsque les cellules LAN<sub>5</sub> furent traitées avec AFA aucune présence du facteur ne fut détectée dans le noyau. N'accédant pas au noyau, aucun médiateur pro-inflammatoire n'a pu être ni transcrit ni traduit.

Afin d'appuyer ces observations, l'expression des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-6 fut mesurée.



**Figure 65 :** Mesure du niveau d'expression d'IL-1  $\beta$  et IL-6 dans des cellules LAN<sub>5</sub> non traitées (CTR) ou des cellules traitées avec A $\beta$ , ou avec A $\beta$  et AFA, ou AFA seul, par test ELISA

Les résultats de la figure 65 montrent une diminution significative de l'expression de ces deux cytokines pro-inflammatoires par rapport aux cellules traitées uniquement par A $\beta$  ( $p < 0,05$ ). Ces résultats sont donc en corrélation avec une absence de transcription de ces molécules impliquées dans l'inflammation en présence d'AFA.

L'extrait d'AFA exerce une activité anti-inflammatoire, en réponse au peptide A $\beta$ , par le blocage de la migration nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B. Ces résultats sont très intéressants notamment dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. En effet, l'accumulation des plaques A $\beta$  dans le cerveau provoque une inflammation chronique responsable par la suite d'une neurodégénérescence neurofibrillaire.

Pour mieux comprendre le rôle d'AFA dans le blocage de la migration nucléaire du FN- $\kappa$ B, il faudrait étudier les mécanismes impliqués.

e. Anti-fibrillogénèse

### **Agrégation des peptides A $\beta$**

La maladie d'Alzheimer est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par une perte progressive de la mémoire et de certaines fonctions cognitives entraînant des répercussions sur les activités de la vie quotidienne. Cette maladie est caractérisée par la présence de dégénérescences neurofibrillaires ainsi que de l'accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau, plaques contenant principalement le peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ).

Les chercheurs ont alors étudié si l'extrait d'AFA pouvait impacter la vitesse d'agrégation du peptide A $\beta$ . Pour mesurer cette cinétique, un colorant fluorescent a été utilisé pour visualiser les agrégats nouvellement formés.

Résultats	
<b>A t0</b>	Aucune fluorescence détectée
<b>A t8 : A<math>\beta</math></b>	Fluorescence diffuse Taille agrégats : 90 $\mu$ m
<b>A t8 : A<math>\beta</math> + AFA</b>	Fluorescence plus faible Taille agrégats : 50 $\mu$ m

Les résultats présentés dans le tableau, montrent que l'extrait d'AFA permet de réduire la cinétique de formation des agrégats A $\beta$  : la taille des plaques amyloïdes observée est effectivement plus petite.

Pour interpréter ces données, les chercheurs ont cherché à savoir si les composants anti-oxydants de l'extrait d'AFA avaient la capacité d'interagir avec la formation des agrégats A $\beta$ . Effectivement, les antioxydants contiennent un ou plusieurs cycles phénoliques qui ont la capacité d'entraîner une déstabilisation des résidus aromatiques, résidus retrouvés dans plaques les  $\beta$ -amyloïdes. Ainsi, Klamín® pourrait avoir une activité dite de « désagrégation » sur ces plaques. Ces premiers résultats offrent une voie de traitement potentielle pour freiner le développement de cette maladie, toujours incurable.

f. Conclusion de l'étude

Les résultats de cette étude ont donc montré que la spécialité Klamín® a la capacité de protéger les mitochondries des cellules neuronales contre le stress oxydatif, de lutter contre l'inflammation et d'empêcher l'agrégation du peptide A $\beta$  impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Cette étude n'est néanmoins qu'une preuve de concept et doit être complétée par d'autres expériences, notamment *in vivo*, pour confirmer les effets obtenus (181).

### 3) Neurotoxicité des anesthésiques locaux

En 2018, une étude menée par le chercheur Xue X. étudia les effets protecteurs des substances polymériques extracellulaires (EPS) contenues dans AFA sur le système neuronal. Suite à une injection intrapéritonéale de bupivacaïne chez le rat, la neurotoxicité induite par cet anesthésique local fut étudiée. L'objectif principal était d'étudier les effets protecteurs de cette cyanobactérie sur les lésions neuronales induites par l'anesthésie (182).

#### ❖ **Les substances polymériques extracellulaires (EPS)**

Les EPS sont des substances biologiquement actives synthétisées par la plupart des micro-organismes. Connues pour leur grande variabilité et complexité de structure : polysaccharides, acides aminés, lipides, lipopolysaccharides, les SPE sont vitales pour les cyanobactéries.

Grâce au caractère hydrophile des EPS, les cyanobactéries peuvent adhérer à tout type de substrat solide et liquide. Cette adhésion entraîne la formation de biofilms permettant aux cyanobactéries de résister aux contraintes environnementales, comme l'agitation de l'eau, et de s'adapter aux environnements extrêmes ou pollués par des métaux toxiques. Avec cette fonction de stabilisateur physique, le biofilm créé permet de piéger la matière organique et les oligoéléments nécessaires à la bonne croissance de l'algue. Certains scientifiques, comme Geesey et coll. (1982), les définirent comme « des substances polymériques extracellulaires d'origine biologique participant à l'agrégation des bactéries ». D'autres comme Characklis et Wilderer (1989) parlèrent de « polymères organiques d'origine microbienne, responsables de la liaison entre les cellules bactériennes et d'autres particules élémentaires pour assurer la cohésion et l'adhésion au substrat ».

Il existe deux groupes de EPS divisés en fonction de leur poids moléculaire. Concernant, les EPS de faible poids moléculaire, on retrouve les cyanotoxines, des substances antimicrobiennes, des régulateurs de la croissance et des pigments hydrosolubles. Les EPS de haut poids moléculaire, sont, quant à eux, synthétisées pendant la phase de croissance des cyanobactéries. Polymères issus de la biomasse, les EPS se présentent soit sous forme de capsules enrobant la cellule ou sont secrétées dans le milieu extérieur où elles jouent un rôle de protection contre la prédation par les protozoaires et la dessiccation (183).

#### ❖ **Déroulement de l'étude**

Des injections intrapéritonéales de substances polymériques extracellulaires d'AFA (EPS-A), à raison de 100 mg/kg et selon une fréquence d'une 1 fois/jour pendant 3 jours, furent faites chez 18 rats. Puis, ils reçurent une injection de bupivacaïne à raison de 2,5 mg/kg.

### **Analyse morphologique**

Afin de montrer l'impact de la bupivacaïne, sur le nombre et la morphologie des neurones, les chercheurs ont utilisé pour leurs observations la microscopie optique.

Pour les rats naïfs d'EPS-A, il a été observé une diminution du nombre de neurones ainsi qu'une modification de leur morphologie. A l'inverse, pour les rats ayant reçu des EPS-A, il a été observé un nombre de neurones plus important ainsi que des modifications morphologiques plus faibles.

Ces résultats suggèrent donc que les EPS-A ont la capacité d'atténuer les lésions neuronales induites par la bupivacaïne.



### **Déclenchement de l'apoptose**

Pour expliquer la diminution du nombre de neurones, les chercheurs se sont ensuite basés sur l'effet neurotoxique des anesthésiques locaux. Le taux d'apoptose dans les neurones de la moelle épinière fut augmenté suite à l'injection de bupivacaïne. Par contre, il a été observé, chez les rats traités par des EPS-A, une diminution significative de l'apoptose ( $p < 0,05$ ). L'effet neuroprotecteur des EPS-A pourrait donc être liée à leur capacité à réduire l'apoptose neuronale.

L'étude de l'expression de la caspase-3, molécule qui reflète le degré des dommages neuronaux confirma ces résultats. Ils montrèrent que les EPS-A étaient responsables d'une diminution significative de cette molécule ( $p < 0,05$ ). Leur présence réduisait bien le déclenchement de l'apoptose des cellules neuronales.

### **Déclenchement de l'autophagie**

Il a ensuite été évoqué que les EPS-A avaient un rôle dans le déclenchement de l'autophagie des cellules.

L'autophagie permet à une cellule de survivre lorsqu'elle est privée de nutriments ou soumise à un stress, à l'inverse de l'apoptose qui est un processus de mort programmée. Lorsque les cellules sont en souffrance, elles diminuent l'expression de deux protéines LC3 et beclin1, une diminution qui permettra à la cellule d'entrer en autophagie. L'autophagie joue donc un rôle important dans la survie des cellules et participe donc au bon maintien de l'homéostasie.

La bupivacaïne est une molécule responsable de l'augmentation de l'expression de LC3 et beclin1. De ce fait, les cellules rentreront directement en apoptose sans passer par la « case autophagie ». Mais dans cette étude, il fut montré que la pré-administration des EPS-A avait permis de diminuer significativement l'expression de ces deux molécules ( $p < 0,05$ ).

Les chercheurs suggèrent alors que l'autophagie et l'apoptose présenteraient des interactions inhibitrices croisées : l'activation de l'autophagie pourrait inhiber l'apoptose et ainsi favoriser la survie des cellules, ce qui est cohérent vis-à-vis des résultats précédemment obtenus.

### **Conclusion de l'étude**

Aujourd'hui, les anesthésiques locaux sont amplement utilisés dans l'anesthésie clinique et dans le traitement de la douleur. Leur neurotoxicité n'étant pas nulle, elle pose des véritables problèmes lors de leur utilisation. Des études ultérieures ont montré que des polysaccharides avaient la capacité de réduire le gonflement et le rétrécissement des neurones, de favoriser la régénération nerveuse, de réduire les défauts neurologiques et d'exercer un rôle protecteur sur les neurones endommagés. C'est pourquoi, les chercheurs ont décidé d'étudier cette cyanobactérie riche en polysaccharides.

En conclusion, les résultats suggèrent que les EPS-A sont des agents neuroprotecteurs et sont des molécules clés pour lutter contre la neurotoxicité provoquée par les anesthésiques locaux. Les mécanismes possibles peuvent être attribués à l'inhibition de l'apoptose, à l'induction de l'autophagie ou encore à l'amélioration de la survie cellulaire par un effet anti-oxydant. Là encore, d'autres recherches sur le lien entre l'apoptose et l'autophagie sont nécessaires, il reste à être évalué dans le futur, notamment chez l'Homme.



## IX. CONCLUSION

Aujourd'hui, toutes les recherches sont unanimes pour dire qu'*Aphanizomenon flos aquae* est l'aliment le plus complet de la planète. AFA est largement plus intéressante et plus bénéfique pour la santé que la Spiruline. Sa croissance et sa production ne nécessitent aucune utilisation d'engrais, de pesticides etc... Cet avantage permet donc d'offrir aux Hommes un aliment sain et respectueux de l'environnement. Si l'on ajoute que cette cyanobactérie croît dans un biotope dénué de toute pollution, cela en fait un produit d'une grande pureté et d'une grande qualité nutritive. Cette richesse alimentaire, de 115 nutriments, pourrait donc répondre positivement aux recommandations du *Programme National Nutrition Santé* en permettant aux Hommes de rééquilibrer leur alimentation dite « trop grasse, trop sucrée, trop salée, peu nutritive... ». Un complément alimentaire ne nécessite pas d'étude pré-clinique ou clinique pour être mis sur le marché : en effet, seule sa composition intervient dans cette décision. Grâce à des expériences réalisées sur la Spiruline dont la composition est assez ressemblante mais moins complète, il serait logique qu'AFA possède, elle aussi, une place de choix sur le marché alimentaire.

Sa production à grande échelle reste compliquée. L'industrialisation de cette cyanobactérie est d'une part, très difficile et d'une autre part, elle irait à l'encontre son identité : un aliment naturel et écologique. Il semble donc difficile de supplémenter les 9 milliards d'habitants de la planète, prévus en 2050, par la cyanobactérie. Sa commercialisation en fait une denrée chère et rare et par conséquent, il sera difficile pour toute la population d'y avoir recours. Pourtant, ce complément alimentaire fascine les consommateurs qui ont constaté des effets bénéfiques sur leur santé.

Les cyanobactéries sont les pionnières de la grande oxygénation sur Terre et sont capables de réaliser la photosynthèse. Si les Hommes arrivaient à produire l'AFA à grande échelle, dans un milieu mimant son lieu de croissance naturelle, elle pourrait participer à la lutte contre le réchauffement climatique. Là encore, AFA suit un mouvement écologique en pouvant diminuer les quantités de CO<sub>2</sub> atmosphérique, préservant ainsi, notre planète.

Par ses incroyables propriétés nutritionnelles, il n'était pas envisageable pour de nombreux scientifiques que cette cyanobactérie puisse être néfaste sur la santé humaine. Mais ces derniers, avant de commencer leurs études, n'ont pas oublié qu'AFA était une cyanobactérie, et qu'elle pouvait donc produire des toxines plus ou moins délétères pour l'organisme. Lorsque les chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'AFA du lac Klamath, ils ont, tout d'abord, réalisé des études toxicologiques pour garantir son innocuité et sa sécurité d'utilisation. Là, il fut conclu que la variété d'AFA poussant au sein du lac Klamath était génétiquement incapable de produire des toxines et que par conséquent son utilisation chez l'Homme était possible. Par ailleurs, de nombreux contrôles sont effectués lors de sa récolte pour garantir l'absence de tout contaminant. A ce jour nous pouvons affirmer que l'AFA du lac Klamath n'est pas nocive pour notre organisme, bien au contraire, ce qui est rassurant pour tous ses consommateurs.

Notons qu'au cours d'une étude, le chercheur polonais Piotr Rzymiski a constaté la survenue d'effets indésirables suite à une consommation d'AFA à des quantités supérieures à 6 g/jour. Des douleurs abdominales, diarrhées, vomissements, nausées étaient les effets indésirables les plus rapportés. Cependant, ces effets n'ont été observés que pour 20 consommateurs sur 150 et ne sont donc pas significatifs. (184)

De nombreuses observations et témoignages ont ensuite présenté l'AFA comme une cyanobactérie miracle aux mille propriétés. Mais les études cliniques actuelles restent encore fragiles pour démontrer l'efficacité d'AFA dans les diverses pathologies. De nombreuses expériences n'ont pas été réalisées directement chez l'Homme et les conditions de réalisation des tests n'étaient pas toutes optimales, avec par exemple, un nombre trop faible de volontaire ou bien sur des durées trop courtes. C'est pourquoi, la recherche sur l'AFA doit continuer et doit être absolument encouragée.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Singh Rachana, Parihar Parul, Singh Madhulika, Bajguz Andrzej, Kumar, Singh Samiksha, et al. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. 25 avr 2017;8.
2. J.Paniagua-Michel, E. Dujardin, C. Sironval. Chronique, Le Tecuitlatl concentré de spiruline source de protéines comestibles chez les Aztèques. Cahiers agricultures 1993, 2 : 283-7. Disponible sur: <http://revues.cirad.fr/index.php/cahiers-agricultures/article/viewFile/29800/29560>
3. Wayne W. Carmichael, Drapeau Christian, Donald M. Anderson. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. & Flah. Var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. J Appl Phycol. 2000;12:585-95.
4. Janicka Ewa, Figour Alexandre. Le Miracle des Algues Bleu-Vert *Aphanizomenon Flos Aquae* (AFA) du lac Klamath : Vie alternative. Disponible sur: <http://viealternative.free.fr/telechargement/KLAMATH/Klamath-solstice-lo.pdf>
5. Dana Spirulina. Quelles différences entre Klamath, Spiruline et Chlorelle ? 28 sept 2018; Disponible sur: <https://www.dana-spirulina.fr/differences-klamath-spiruline-chlorelle/>
6. Afssa. Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles, ANSES. 16 mai 2003;(n° 2003-SA-0002). Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2003sa0002.pdf>
7. Marie-Laure de Boutray. Les cyanobactéries et leurs toxines dans les sources d'eau potable. Ingénierie de l'environnement. Université Paris-Est; Ecole polytechnique (Montréal, Canada), 2017 (NNT : 2017PESC1069). 26 Mar 2018.
8. Prunier Jacques. Livre, Cellules souches adultes : *Aphanizomenon* & Synerstem (ISBN : 5800101777147).
9. Ces Toulousains cultivent une micro-algue pour répondre au défi alimentaire sur Terre... et sur Mars. 6 févr 2017;ladepeche.fr. Disponible sur: <https://www.ladepeche.fr/article/2017/02/06/2512128-toulousains-cultivent-micro-algue-repondre-defi-alimentaire-terre-mars.html>
10. Hervé Cagnec. Livre, La Klamath : L'aliment primordial (ISBN : 978-2-85327-468-5). Médicis.
11. Wayne W. Carmichael, Christian Drapeau, Donald M. Anderson. Récolte d'*Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. & Flah. var. *flos-aquae* (cyanobactérie) du lac Klamath pour usage alimentaire humain. J Appl Phycol. 2000;12:585-95.
12. Cirés Samuel, Ballot Andreas. A review of the phylogeny, ecology and toxin production of bloom-forming *Aphanizomenon* spp. and related species within the Nostocales (cyanobacteria). Harmful Algae. 1 avr 2016;54:21-43.
13. Schaeffer DJ, Malpas PB, Barton LL. Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. Ecotoxicol Environ Saf. sept 1999;44(1):73-80.
14. Scoglio Stefano. Microcystins in water and in microalgae. Toxicol Rep. 3 août 2018;5:785-92.
15. Schaeffer DJ., Barton LL., Malpas PB. Évaluation des risques liés à la microcystine dans les aliments *Aphanizomenon flos-aquae*. sept 1999;44 (1):73-80.
16. Lyon-Colbert Amber, Su Shelley, Cude Curtis. A Systematic Literature Review for Evidence of *Aphanizomenon flos-aquae* Toxicogenicity in Recreational Waters and Toxicity of Dietary Supplements: 2000-2017. Toxins. 21 juin 2018;10(7).

17. Park Hae-Kyung, Kwon Mi-Ae, Lee Hae-Jin, Oh Jonghee, Lee Su-Heon, Kim In-Soo. Molecular Verification of Bloom-forming *Aphanizomenon flos-aquae* and Their Secondary Metabolites in the Nakdong River. *Int J Environ Res Public Health*. 13 2018;15(8).
18. Pietri Anne-Marie. Livre, L'aliment le plus complet de la planète : L'algue bleu-vert A.F.A (ISBN : 9782851576507). Lanore.
19. Prunier Jacques. Composition comparées pour 100g : Spiruline, Chlorelle et *Aphanizomenon flos aquae*, SynerJ Health. Disponible sur: <https://regeneration-naturelle.fr/wp-content/uploads/2016/06/afa-klamath-alphaone-spiruline-chlorella-synerj.jpg>
20. Wu Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. mai 2009;37(1):1-17.
21. Mero Antti. Leucine Supplementation and Intensive Training. *Sports Med*. 1 juin 1999;27(6):347-58.
22. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6306, L-Isoleucine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Isoleucine>
23. Doi Masako, Yamaoka Ippei, Sugahara Kunio, Yoshizawa Fumiaki. Hypoglycemic effect of isoleucine involves increased muscle glucose uptake and whole body glucose oxidation and decreased hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2007;292:1683–1693.
24. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6106, Leucine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6106>
25. Han Hui, Yin Jie, Wang Bin, Huang Xingguo, Yao Jiming, Zheng Jie, et al. Effects of dietary lysine restriction on inflammatory responses in piglets. *Sci Rep*. 5 févr 2018;8.
26. Datta Debatosh, Bhinge Akshay, Chandran Vidya. Lysine: Is it worth more? *Cytotechnology*. juill 2001;36(1-3):3-32.
27. Griffith R. S., Norins A. L., Kagan C. A multicentered study of lysine therapy in Herpes simplex infection. *Dermatologica*. 1978;156(5):257-67.
28. Kalogeropoulou Dionysia, LaFave Laura, Schweim Kelly, Gannon Mary C., Nuttall Frank Q. Lysine ingestion markedly attenuates the glucose response to ingested glucose without a change in insulin response. *Am J Clin Nutr*. août 2009;90(2):314-20.
29. Civitelli R, Villareal DT, Agnusdei D, Nardi P, Avioli LV, Gennari C. Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. déc 1992;8(6):400-5.
30. Sinha Shivam, Goel Satish Chandra. Effect of amino acids lysine and arginine on fracture healing in rabbits: A radiological and histomorphological analysis. *Indian J Orthop*. 2009;43(4):328-34.
31. Li Xue-Yin, Liu Yang, Jiang Wei-Dan, Jiang Jun, Wu Pei, Zhao Juan, et al. Co- and Post-Treatment with Lysine Protects Primary Fish Enterocytes against Cu-Induced Oxidative Damage. *PLoS One*. 26 janv 2016;11(1).
32. Xu Peng, Zheng Yadong, Zhu Xiaoxu, Li Shiyi, Zhou Cunliu. L-lysine and L-arginine inhibit the oxidation of lipids and proteins of emulsion sausage by chelating iron ion and scavenging radical. *Asian-Australas J Anim Sci*. juin 2018;31(6):905-13.
33. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6137, Methionine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6137>
34. Irvin T. T. The effect of methionine on colonic wound healing in malnourished rats. *Br J Surg*. mars 1976;63(3):237-40.
35. Martínez Yordan, Li Xue, Liu Gang, Bin Peng, Yan Wenxin, Más Dairon, et al. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*. déc 2017;49(12):2091-8.

36. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6288, L-Threonine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6288>
37. Feng Lin, Peng Yan, Wu Pei, Hu Kai, Jiang Wei-Dan, Liu Yang, et al. Threonine Affects Intestinal Function, Protein Synthesis and Gene Expression of TOR in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). PLoS One. 26 juill 2013;8(7).
38. Lindseth Glenda, Helland Brian, Caspers Julie. The Effects of Dietary Tryptophan on Affective Disorders. Arch Psychiatr Nurs. avr 2015;29(2):102-7.
39. Hartmann Ernest. Effects of L-tryptophan on sleepiness and on sleep. J Psychiatr Res. 1983 1982;17(2):107-13.
40. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6287, Valine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6287>
41. Appleton Jeremy. Arginine: Clinical Potential of a Semi-Essential Amino Acid. Altern Med Rev. 2002;7(6):11.
42. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6274, Histidine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6274>
43. Dinicolantonio James J, McCarty Mark F, OKeefe James H. Role of dietary histidine in the prevention of obesity and metabolic syndrome. Open Heart. 29 juin 2018;5(2).
44. Lee Da-Young, Kim Eun-Hee. Therapeutic Effects of Amino Acids in Liver Diseases: Current Studies and Future Perspectives. J Cancer Prev. juin 2019;24(2):72-8.
45. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6322, Arginine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6322>
46. Campbell Bill I, La Bounty Paul M, Roberts Mike. The Ergogenic Potential of Arginine. J Int Soc Sports Nutr. 31 déc 2004;1(2):35-8.
47. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6267, Asparagine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6267>
48. Bellinger Phillip M.  $\beta$ -Alanine supplementation for athletic performance: an update. J Strength Cond Res. juin 2014;28(6):1751-70.
49. Müller Walter A., Faloona Gerald R., Unger Roger H. The effect of alanine on glucagon secretion. J Clin Invest. oct 1971;50(10):2215-8.
50. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5950, Alanine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5950>
51. Patience J. F. A review of the role of acid-base balance in amino acid nutrition. J Anim Sci. 1 févr 1990;68(2):398-408.
52. Kim Min-Hyun, Kim Hyeyoung. The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases. Int J Mol Sci. 12 mai 2017;18(5).
53. Gleeson Michael. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. J Nutr. oct 2008;138(10):2045S-2049S.
54. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5961, Glutamine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5961>
55. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5862, Cysteine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5862>

56. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 750, Glycine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/750>
57. Razak Meerza Abdul, Begum Pathan Shajahan, Viswanath Buddolla, Rajagopal Senthilkumar. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;
58. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5951, Serine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5951>
59. Rodriguez Arianne E., Ducker Gregory S., Billingham Leah K., Martinez Carlos A., Mainolfi, Suri Vipin, et al. Serine metabolism supports macrophage IL-1 $\beta$  production. *Cell Metab*. 2 avr 2019;29(4):1003-1011.e4.
60. De Koning Tom J., Snell Keith, Duran Marinus, Berger Ruud, Poll-The Bwee-Tien, Surtees Robert. L-serine in disease and development. *Biochem J*. 1 mai 2003;371(Pt 3):653-61.
61. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6057, Tyrosine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6057>
62. Fernstrom John D., Fernstrom Madelyn H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr*. 2007;137(6 Suppl 1):1539S-1547S; discussion 1548S.
63. Elkin RG, Featherston WR, Rogler JC. Effects of dietary phenylalanine and tyrosine on circulating thyroid hormone levels and growth in the chick. *J Nutr*. 1980;110(1):130-8.
64. Fabian Carol, Kimler Bruce, Hursting Stephen. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Res BCR*. 4 mai 2015;17:62.
65. Freitas Raquel D. S., Campos Maria M. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. *Nutrients*. 26 avr 2019;11(5).
66. Rose DP, Connolly JM. Regulation of Tumor Angiogenesis by Dietary Fatty Acids and Eicosanoids. *Nutr Cancer*. juill 2000;37(2):119-27.
67. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1 mai 2018;132:41-8.
68. Sguera Sébastien. *Spirula Platensis* et ses constituants, intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. Univ Nancy Henri-Poincaré. 2008;hal-01732214.
69. Timoneda Joaquín, Rodríguez-Fernández Lucía, Zaragoza Rosa, Marín M. Pilar, Cabezuelo, Torres Luis, et al. Vitamin A Deficiency and the Lung. *Nutrients*. 21 août 2018;10(9).
70. Clagett-Dame Margaret, Knutson Danielle. Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutrients*. 29 mars 2011;3(4):385-428.
71. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 14985 Vitamin E. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985>
72. Rizvi Saliha, Raza Syed T., Ahmed Faizal, Ahmad Absar, Abbas Shania, Mahdi Farzana. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*. mai 2014;14(2):e157-65.
73. Fricker Rosemary A, Emma L EL, Jenkins Stuart I, Síle M. The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *Int J Tryptophan Res IJTR*. 21 mai 2018;11.
74. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 1130, Thiamine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1130>
75. Dervaux Alain, Laqueille Xavier. Le traitement par thiamine (vitamine B1) dans l'alcoolodépendance. *Presse Médicale*. 1 mars 2017;46(2, Part 1):165-71.

76. Mahabadi Navid, Bhusal Aakriti, Banks Stephen W. Riboflavin Deficiency. Vol. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing; 2020.
77. National Center for Biotechnology Informationy (2020). PubChem Compound Summary for CID 493570, Riboflavin. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/493570>
78. National Center for Biotechnology Informationy (2020). PubChem Compound Summary for CID 938, Nicotinic acid. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/938>
79. Kamat JP, Devasagayam TPA. Nicotinamide (vitamin B3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria. Redox Rep. 1 août 1999;4(4):179-84.
80. National Center for Biotechnology Informationy (2020). PubChem Compound Summary for CID 6613, Pantothenic acid. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6613>
81. Stover Patrick J, Field Martha S. Vitamin B-61. Adv Nutr. 7 janv 2015;6(1):132-3.
82. National Center for Biotechnology Informationy (2020). PubChem Compound Summary for CID 1054, Pyridoxine. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1054>
83. Fernandez-Mejia Cristina. Pharmacological effects of biotin. J Nutr Biochem. 1 juill 2005;16(7):424-7.
84. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 135398658, Folic acid. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398658>
85. Donnelly JG. Folic acid. Crit Rev Clin Lab Sci. juin 2001;38(3):183-223.
86. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 44176380 Vitamin B12. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44176380>
87. Abdullah Muhammad, Jamil Radia T., Attia Fibi N. Vitamin C (Ascorbic Acid). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
88. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 54670067, Ascorbic acid. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067>
89. Waldman Talya, Sarbaziha Raheleh, Merz C. Noel Bairey, Shufelt Chrisandra. Calcium Supplements and Cardiovascular Disease: A Review. Am J Lifestyle Med. 1 juill 2015;9(4):298-307.
90. Kirkland v, Sarlo Gabrielle L., Holton Kathleen F. The Role of Magnesium in Neurological Disorders. Nutrients. 6 juin 2018;10(6).
91. Gröber Uwe, Schmidt Joachim, Kisters Klaus. Magnesium in Prevention and Therapy. Nutrients. 23 sept 2015;7(9):8199-226.
92. EPA. Toxicological review of boron and compounds. juin 2004;CAS No. 7440-42-8. Disponible sur: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxreviews/0410tr.pdf?fbclid=IwAR2Nf3Kf7BlhGPs87ec tiSuES3A5SF7Cr-rKMZh2Dy0RI5aeZPinuZ7QnjQ](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0410tr.pdf?fbclid=IwAR2Nf3Kf7BlhGPs87ec tiSuES3A5SF7Cr-rKMZh2Dy0RI5aeZPinuZ7QnjQ)
93. U.S. Departement of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for boron. nov 2010; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp26-c2.pdf>
94. EPA. Toxicological review of chlorine dioxide and chlorite. sept 2000;CAS Nos. 10049-04-4 and 7758-19-2. Disponible sur: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxreviews/0496tr.pdf?fbclid=IwAR24oX5o4cPydOtc\\_444QP5npGOa91SqM0RKiVWAC-3WjK\\_y5RSBQBw9aAI](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0496tr.pdf?fbclid=IwAR24oX5o4cPydOtc_444QP5npGOa91SqM0RKiVWAC-3WjK_y5RSBQBw9aAI)

95. EPA. Chromium Compounds. avr 1992; Disponible sur: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/chromium-compounds.pdf?fbclid=IwAR2RNTH787TOPDFKlosnMTg\\_s7PCOLac\\_PxpcaWHYm0KkhNKerRskrTIF3o](https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/chromium-compounds.pdf?fbclid=IwAR2RNTH787TOPDFKlosnMTg_s7PCOLac_PxpcaWHYm0KkhNKerRskrTIF3o)
96. Jin Jennifer, Mulesa Leanne, Carrilero Rouillet Mariana. Trace Elements in Parenteral Nutrition: Considerations for the Prescribing Clinician. *Nutrients*. 28 avr 2017;9(5).
97. EPA. Cobalt Compounds. avr 1992; Disponible sur: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/cobalt-compounds.pdf?fbclid=IwAR0m08Db34tdz5rletxHcMdWUPvHzsF08qaHibCX3fAo3OqqTpftElDknY4>
98. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for copper. sept 2004; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132-c2.pdf>
99. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for tin and tin compounds. août 2005; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp55-c2.pdf>
100. EPA. Provisional Peer Reviewed Toxicity Values for Iron and Compounds (CASRN 7439-89-6). 2006;EPA/690/R-06/020F:44.
101. Ullah Rizwan, Zafar Muhammad Sohail, Shahani Nazish. Potential fluoride toxicity from oral medicaments: A review. *Iran J Basic Med Sci*. août 2017;20(8):841-8.
102. Tao Shyy-Hwa, Bolger P. Michael. Hazard Assessment of Germanium Supplements. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1 juin 1997;25(3):211-9.
103. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for iodine. avr 2004; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp158.pdf>
104. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for manganese. sept 2012; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151-c2.pdf>
105. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Molybdenum. mai 2020;246.
106. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for nickel. août 2005; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp15-c2.pdf>
107. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for selenium. sept 2003; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp92.pdf>
108. U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for vanadium. sept 2012; Disponible sur: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp58-c2.pdf>
109. EPA. Toxicological review of zinc and compounds. juill 2005;(CAS No. 7440-66-6). Disponible sur: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxreviews/0426tr.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0426tr.pdf)
110. Simonich Michael T., McQuistan Tammie, Jubert Carole, Pereira Cliff, Hendricks, Schimerlik Michael, et al. Low-dose dietary chlorophyll inhibits multi-organ carcinogenesis in the rainbow trout. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. mars 2008;46(3):1014-24.
111. Zheng Han, You Yang, Hua Meiyun, Wu Pengfei, Liu Yu, Chen Zishuo, et al. Chlorophyllin Modulates Gut Microbiota and Inhibits Intestinal Inflammation to Ameliorate Hepatic Fibrosis in Mice. 4 déc 2018;9(Frontiers in Physiology).
112. Vadiraja B. B., Gaikwad N. W., Madyastha K. M. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 août 1998;249(2):428-31.

113. Jiang Liangqian, Wang Yujuan, Yin Qifeng, Liu Guoxiang, Liu Huihui, Huang Yajing, et al. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *J Cancer*. 20 sept 2017;8(17):3416-29.
114. Jensen Gitte S., Drapeau Cassandra, Lenninger Miki, Benson Kathleen F. Clinical Safety of a High Dose of Phycocyanin-Enriched Aqueous Extract from *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study with a Focus on Anticoagulant Activity and Platelet Activation. *J Med Food*. 1 juill 2016;19(7):645-53.
115. Drapeau C. Livre, Le pouvoir insoupçonnée des cellules souches (ISBN : 9782761927895). Les éditions de l'Homme.
116. Minich Deanna M., Bland Jeffrey S. Acid-alkaline balance: role in chronic disease and detoxification. *Altern Ther Health Med*. août 2007;13(4):62-5.
117. Frassetto Lynda, Banerjee Tanushree, Powe Neil, Sebastian Anthony. Acid Balance, Dietary Acid Load, and Bone Effects—A Controversial Subject. *Nutrients*. 21 avr 2018;10(4).
118. Ostensvik O, Skulberg OM, Underdal B, Hormazabal V. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria--a comparative study of bacterial bioassays. *J Appl Microbiol*. juin 1998;84(6):1117-24.
119. Jensen Gitte S., I. Ginsberg Donald, Huerta Patricia, Citton Monica, Drapeau Christian. Consumption of *Aphanizomenon flos-aquae* Has Rapid Effects on the Circulation and Function of Immune Cells in Humans A novel approach to nutritional mobilization of the immune system. *JANA*. 1 janv 2000;2.
120. Hart Aaron N., Zaske Lue Ann, Patterson Kelly M., Drapeau Christian, Jensen Gitte S. Natural killer cell activation and modulation of chemokine receptor profile in vitro by an extract from the cyanophyta *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Med Food*. sept 2007;10(3):435-41.
121. Besedovsky Luciana, Lange Tanja, Born Jan. Sleep and immune function. *Pflüg Arch - Eur J Physiol*. 1 janv 2012;463(1):121-37.
122. Crewther Blair T., Cook Christian, Orysiak Joanna, Zmijewski Piotr, Obmiński Zbigniew. Individual variation in the cortisol response to a simulated Olympic weightlifting competition is related to changes in future competitive performance. *Biol Sport*. juin 2019;36(2):133.
123. Carrega Paolo, Ferlazzo Guido. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol*. 29 nov 2012;3.
124. Inngjerdingen Marit, Damaj Bassam, Maghazachi Azzam A. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood*. 15 janv 2001;97(2):367-75.
125. Beider Katia, Nagler Arnon, Wald Ori, Franitza Suzanna, Dagan-Berger, Wald Hanna, et al. Involvement of CXCR4 and IL-2 in the homing and retention of human NK and NK T cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID mice. 2003;102(6):8.
126. Pugh N, Ross SA, ElSohly HN, ElSohly MA, Pasco DS. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med*. nov 2001;67(8):737-42.
127. Uluişik Deniz, Keskin Ercan. Effects of Ginseng and Echinacea on Cytokine mRNA Expression in Rats. *Sci World J*. 22 mai 2012;2012.
128. See DM., Broumand N., Sahl L., Tilles JG. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*. 1 janv 1997;35(3):229-35.



129. Shih Chao-Ming, Cheng Shin-Nan, Wong Chih-Shung, Kuo Yu-Ling, Chou Tz-Chong. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. *Anesth Analg.* avr 2009;108(4):1303-10.
130. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 nov 2000;277(3):599-603.
131. Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. :15.
132. González Ricardo, Rodríguez Sandra, Romay Cheyla, González Addys, Armesto Julio, Ramirez Diadelis, et al. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol Res.* 1 janv 1999;39(1):55-9.
133. Romay C, Ledón N, González R. Phycocyanin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic acid-induced mouse-ear inflammation test. *J Pharm Pharmacol.* mai 1999;51(5):641-2.
134. Calder Philip C. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients.* mars 2010;2(3):355.
135. Gutiérrez Saray, Svahn Sara L, Johansson Maria E. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *Int J Mol Sci.* 11 oct 2019;20(20).
136. Sperling RI, Weinblatt M, Robin JL, Ravalese J, Hoover RL, House F, et al. Effects of dietary supplementation with marine fish oil on leukocyte lipid mediator generation and function in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* sept 1987;30(9):988-97.
137. Rajaei Elham, Mowla Karim, Ghorbani Ali, Bahadoram Sara, Bahadoram Mohammad, Dargahi-Malamir Mehrdad. The Effect of Omega-3 Fatty Acids in Patients With Active Rheumatoid Arthritis Receiving DMARDs Therapy: Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Glob J Health Sci.* juill 2016;8(7):18-25.
138. Calder Philip C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol.* mars 2013;75(3):645-62.
139. Jensen Gitte S., Ginsberg D.I., Drapeau Christian. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *JANA.* 1 janv 2001;3:24-30.
140. Pham-Huy Lien Ai, He Hua, Pham-Huy Chuong. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci IJBS.* juin 2008;4(2):89.
141. Benedetti Serena, Benvenuti Francesca, Scoglio Stefano, Canestrari Franco. Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Med Food.* févr 2010;13(1):223-7.
142. Benedetti Serena, Benvenuti Francesca, Pagliarani Silvia, Francogli Sonia, Scoglio Stefano, Canestrari Franco. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci.* 24 sept 2004;75(19):2353-62.
143. Kuriakose Gini C., Kurup Muraleedhara G. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Aphanizomenon flos-aquae* Linn against paracetamol intoxication in rats. *Indian J Exp Biol.* nov 2010;48(11):1123-30.
144. Ryan Michael J., Dudash Holly J., Docherty Megan, Geronilla Kenneth B., Baker, Haff G. Gregory, et al. Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Exp Gerontol.* nov 2010;45(11):882-95.
145. Kuriakose Gini C., Kurup Muraleedhara G. Evaluation of renoprotective effect of *Aphanizomenon flos-aquae* on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Ren Fail.* 2008;30(7):717-25.
146. Shytle R. Douglas, Ehrhart Jared, Tan Jun, Vila Jennifer, Cole, Sanberg Cyndy D., et al. Oxidative Stress of Neural, Hematopoietic, and Stem Cells: Protection by Natural Compounds. *Rejuvenation Res.* juin 2007;10(2):173-8.

147. De Caro Viviana, Murgia Denise, Seidita Francesco, Bologna Emanuela, Alotta Gioacchino, Zingales Massimiliano, et al. Enhanced In Situ Availability of Aphanizomenon Flos-Aquae Constituents Entrapped in Buccal Films for the Treatment of Oxidative Stress-Related Oral Diseases: Biomechanical Characterization and In Vitro/Ex Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 17 janv 2019;11(1).
148. Su Lian-Jiu, Zhang Jia-Hao, Gomez Hernando, Murugan Raghavan, Hong, Xu Dongue, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 13 oct 2019;
149. Marí Montserrat, Morales Albert, Colell Anna, García-Ruiz Carmen, Fernández-Checa José C. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. nov 2009;11(11):2685-700.
150. Abd El-Hack Mohamed E., Abdelnour Sameh, Alagawany Mahmoud, Abdo Mohamed, Sakr Moustafa A., Khafaga Asmaa F., et al. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomed Pharmacother*. 1 mars 2019;111:42-50.
151. Schwartz J, Shklar G. Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. juin 1987;45(6):510-5.
152. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. mars 2004;58(2):100-10.
153. Trejo-Solís Cristina, Pedraza-Chaverrí Jose, Torres-Ramos Mónica, Jiménez-Farfán, Cruz Salgado Arturo, Serrano-García Norma, et al. Multiple Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Lycopene in Cancer Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013.
154. Milani Alireza, Basirnejad Marzieh, Shahbazi Sepideh, Bolhassani Azam. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. juin 2017;174(11):1290-324.
155. Vélchez Carlos, Forján Eduardo, Cuaresma María, Bédmar Francisco, Garbayo Inés, Vega José M. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. *Mar Drugs*. 3 mars 2011;9(3):319-33.
156. Kucuk Omer, Sarkar Fazlul H., Djuric Zora, Sakr Wael, Pollak Michael N., Khachik Fred, et al. Effects of Lycopene Supplementation in Patients with Localized Prostate Cancer. *Exp Biol Med*. nov 2002;227(10):881-5.
157. Xue Xing, LV Ying, Liu Qing, Zhang Xiaolan, Zhao Youhong, Zhang Lili, et al. Extracellular polymeric substance from Aphanizomenon flos-aquae induces apoptosis via the mitochondrial pathway in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Exp Ther Med*. sept 2015;10(3):927-32.
158. Bechelli Jeremy, Coppage Myra, Rosell Karen, Liesveld Jane. Cytotoxicity of Algae Extracts on Normal and Malignant Cells. *Leuk Res Treatment*. 2011;2011.
159. Rieger Aja M., Nelson Kimberly L., Konowalchuk Jeffrey D., Barreda Daniel R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *JoVE*. 24 avr 2011;(50):2597.
160. Scoglio Stefano, Lo Curcio Valeria, Catalani Simona, Palma Francesco, Battistelli Serafina, Benedetti Serena. Inhibitory effects of Aphanizomenon flos-aquae constituents on human UDP-glucose dehydrogenase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. déc 2016;31(6):1492-7.
161. Chen Jee-Wei E., Pedron Sara, Shyu Peter, Hu Yuhang, Sarkaria Jann N., Harley Brendan A. C. Influence of Hyaluronic Acid Transitions in Tumor Microenvironment on Glioblastoma Malignancy and Invasive Behavior. *Front Mater*. juin 2018;5.
162. Lokeshwar Vinata B., Mirza Summan, Jordan Andre. Targeting Hyaluronic Acid Family for Cancer Chemoprevention and Therapy. *Adv Cancer Res*. 2014;123:35-65.
163. Bhat Vadiraja B., Madyastha K. M. C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 18 août 2000;275(1):20-5.

164. Lahitová N, Doupovcová M, Zvonár J, Chandoga J, Hocman G. Antimutagenic properties of fresh-water blue-green algae. *Folia Microbiol (Praha)*. 1994;39(4):301-3.
165. Kushak Rafail, Drapeau Christian, M Van Cott Elizabeth, H Winter Harland. Favorable effects of blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae* on rat plasma lipids. January. 1 janv 2000;2.
166. Gerster H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr*. 1998;68(3):159-73.
167. Kushak Rafail I, Drapeau Christian, Winter Harland S. On Nutrient Assimilation in Rats. 2001;5.
168. Baroni Luciana, Scoglio Stefano, Benedetti Serena, Bonetto Chiara, Pagliarani Silvia, Benedetti Yanina, et al. Effect of a Klamath algae product (« AFA-B12 ») on blood levels of vitamin B12 and homocysteine in vegan subjects: a pilot study. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr*. mars 2009;79(2):117-23.
169. Jensen GS, Hart AN, Zaske LAM, Drapeau C, Gupta N, Schaeffer DJ, et al. Mobilization of human CD34+CD133+ and CD34+CD133- stem cells in vivo by consumption of an extract from *Aphanizomenon flos-aquae*—related to modulation of CXCR4 expression by an L-selectin ligand? *Cardiovasc Revasc Med*. 1 juill 2007;8(3):189-202.
170. Ismail Zeinab Mohamed Kamel, Kamel Ashraf Mahmoud Fawzy, Yacoub Mira Farouk Youssef, Aboulkhair Alshaymaa Gamal. The Effect of In Vivo Mobilization of Bone Marrow Stem Cells on the Pancreas of Diabetic Albino Rats (A Histological & Immunohistochemical Study). *Int J Stem Cells*. mai 2013;6(1):1-11.
171. Sanaei Maryam, Ebrahimi Mehdi, Banazadeh Zahra, Shafiee Gita, Khatami Fatemeh, Ahadi Zeinab, et al. Consequences of *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) extract (Stemtech (TM) ) on metabolic profile of patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord*. 2015;14:50.
172. Drapeau Christian, Antarr Donna, Ma Huaiyu, Yang Zhijian, Tang Li, Hoffman Robert M., et al. Mobilization of bone marrow stem cells with StemEnhance improves muscle regeneration in cardiotoxin-induced muscle injury. *Cell Cycle Georget Tex*. mai 2010;9(9):1819-23.
173. Benmouhoub N., Dubreuil C., Paya MF., Prunier J. « Le pouvoir des cellules souches et leur entretien par l'Algue *Aphanizomenon flos aquae* », Disponible sur : <http://syner-j-health.e-monsite.com/medias/files/le-pouvoir-des-cellules-souches-et-leur-entretien-par-l-algue-aphanizomenon-flos-aquae.pdf>. Synerj Health.
174. Lieberman Harris R. Amino Acid and Protein Requirements: Cognitive Performance, Stress, and Brain Function. 1999;National Academies Press (US).
175. Irsfeld Meredith, Spadafore Matthew, Prüß Birgit M.  $\beta$ -phenylethylamine, a small molecule with a large impact. *Webmedcentral*. 30 sept 2013;4(9).
176. Scoglio Stefano, Benedetti Yanina, Benvenuti Francesca, Battistelli Serafina, Canestrari Franco, Benedetti Serena. Selective monoamine oxidase B inhibition by an *Aphanizomenon flos-aquae* extract and by its constitutive active principles phycocyanin and mycosporine-like amino acids. *Phytomedicine*. 15 juin 2014;21(7):992-7.
177. Sabelli H, Fink P, Fawcett J, Tom C. Sustained antidepressant effect of PEA replacement. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1996;8(2):168-71.
178. Scoglio Stefano, Benedetti Serena, Canino Claudia, Santagni Susanna, Rattighieri Erika, Chierchia Elisa, et al. Effect of a 2-month treatment with Klammin, a Klamath algae extract, on the general well-being, antioxidant profile and oxidative status of postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. avr 2009;25(4):235-40.
179. Genazzani AD, Chierchia E, Lanzoni C, Santagni S, Veltri F, Ricchieri F, et al. Effects of Klamath Algae extract on psychological disorders and depression in menopausal women: a pilot study. *Minerva Ginecol*. oct 2010;62(5):381-8.

180. Cremonte Maurizio, Sisti Davide, Maraucci Ilaria, Giribone Simona, Colombo Evelin, Rocchi Marco Bruno Luigi, et al. The Effect of Experimental Supplementation with the Klamath Algae Extract Klamin on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Med Food*. déc 2017;20(12):1233-9.
181. Nuzzo D, Presti G, Picone P, Galizzi G, Gulotta E, Giuliano S, et al. Effects of the *Aphanizomenon flos-aquae* Extract (Klamin®) on a Neurodegeneration Cellular Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9089016.
182. Xue X, Lv Y, Leng Y, Zhang Y. Protective effects of extracellular polymeric substances from *Aphanizomenon flos-aquae* on neurotoxicity induced by local anesthetics. *Exp Ther Med*. oct 2018;16(4):3011-9.
183. Trabelsi Lamia. Thèse de doctorat : Identification et caractérisation des polymères extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* Compère (1968). Inst Supérieur Biotechnol Monast.
184. Rzymiski Piotr, Jaśkiewicz Monika. Microalgal food supplements from the perspective of Polish consumers: patterns of use, adverse events, and beneficial effects. *J Appl Phycol*. 2017;29(4):1841-50.

# ANNEXE 1 : COMPOSITION DES COMPLEMENTES ALIMENTAIRES

<p><u>StemFlo<sup>®</sup></u> (Stemtech) Page 119</p>	<p><b><u>Pour 1 gélule :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Resvératrol (polyphénol) : 190 mg</li> <li>• Myrtille de tourbière : 140 mg</li> <li>• Vitamine C : 90 mg</li> <li>• Curcumine : 22,5 mg</li> <li>• Magnésium : 16,9 mg</li> <li>• Amla (fruit de <i>Phyllanthus emblica</i>) : 10 mg</li> <li>• Groseilles noires : 10 mg</li> </ul>
<p><u>StemEnhance<sup>®</sup></u> (Stemtech) Page 110 Page 113 Page 119</p>	<p><b><u>Pour 1 gélules :</u></b> ⇒ <b>Extrait d'<i>Aphanizomenon flos aquae</i> : 500 mg</b></p> <p><b><u>Enrichi* par : 5 x (quantité) retrouvée dans l'AFA brute de :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Phényléthylamine</li> <li>- Phycocyanine</li> <li>- Polysaccharide (Migratose<sup>®</sup>)</li> <li>- Ligand L-sélectine</li> </ul> <p><small>*provenant d'extrait d'AFA</small></p>
<p><u>Klamin<sup>®</sup></u> (Nutrigea) Page 125 Page 127 Page 129 Page 130</p>	<p><b><u>Pour 1 gélule :</u></b> ⇒ <b>Extrait d'<i>Aphanizomenon flos aquae</i> : 450 mg</b></p> <p><b><u>Enrichi* par :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PEA : 11 à 15 mg par g d'extrait d'AFA</li> <li>- Phycocyanine : 5 % à 7 %</li> <li>- MAA : 0,8 % à 1 %</li> </ul> <p><small>*provenant d'extrait d'AFA</small></p>
<p><u>Nutrastem<sup>®</sup></u> (NT 020) Page 76</p>	<p><b><u>Pour 1 gélule :</u></b></p> <p><b><u>Enrichi en :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitamine D3 : 2,5 µg</li> <li>- Extrait aqueux de thé vert : 200 mg</li> <li>- Extrait de myrtille sauvage : 90 mg</li> <li>- L-Carnosine : 50 mg</li> </ul>

## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée **Bonnet Sandrine**

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :

*SBonnet*

## SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : **21301328**

N° Thèse : **32**

Nom et Prénom : **Bonnet Sandrine**

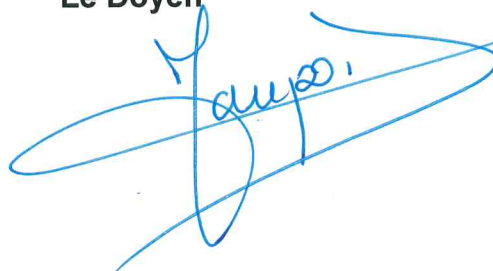
Sujet : **A la recherche des pouvoirs d'*Aphanizomenon flos aquae* sur le corps humain**

Tours, le : 10/09/2020

Le(s) Directeur(s) de Thèse : Madame Isabelle Dimier-Poisson



Vu et Transmis :  
Le Doyen



## TITRE DE LA THÈSE

**A la recherche des pouvoirs d'*Aphanizomenon flos aquae* sur le corps humain**

## RÉSUMÉ DE LA THÈSE

*Aphanizomenon flos aquae* (AFA) est une cyanobactérie bleu-vert qui croit dans le lac Klamath situé en Oregon aux Etats-Unis, zone protégée de toute pollution industrielle. Totalement digeste et hautement assimilable, cette cyanobactérie possède une richesse de 115 nutriments : acides aminés, lipides, vitamines, sels minéraux, pigments photosynthétiques, enzymes, flavonoïdes et glucides complexes, tous reconnus scientifiquement comme présentant de multiples effets bénéfiques pour la santé. Ainsi, AFA figure comme l'aliment le plus complet et le plus équilibré de la planète.

Les effets d'AFA sur le corps humain ont principalement été découverts à la suite de témoignages faits par des consommateurs. D'ailleurs, l'utilisation de cette cyanobactérie ne semble pas avoir de limite dans le domaine médical. En effet, elle est consommée pour tous types de maux : fatigue, dépression, cancer, troubles liés à la ménopause, infections virales, maladies inflammatoires, maladies cardiaques etc... Mais son potentiel ne se limiterait pas seulement à cela : cette cyanobactérie aurait la propriété de stimuler et d'activer la migration des cellules souches présentes dans la moelle osseuse. Par conséquent, *Aphanizomenon flos aquae* aurait la possibilité de régénérer et guérir toute cellule, tout tissu ou encore tout organe présent dans le corps humain.

De ce fait, il est possible que dans le futur, *Aphanizomenon flos aquae* arrive petit à petit dans nos assiettes pour nous offrir un meilleur capital de santé.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

***Aphanizomenon flos aquae – cyanobactérie – nutrition - effets sur la santé - cellules souches***

JURY

PRÉSIDENT : **Madame Isabelle Dimier-Poisson**, Professeur des Universités et enseignant chercheur, Laboratoire immunologie parasitaire à la faculté de pharmacie Philippe Maupas – TOURS (37200)

Membres :

**Monsieur Juste Matthieu**, Maître de Conférences et enseignant chercheur, Laboratoire immunologie parasitaire à la faculté de pharmacie (Tours, 37200)

**Monsieur Besson Pierre**, Maître de Conférences et enseignant chercheur, Laboratoire de physiologie à la faculté de médecine (Tours, 37200)

**Madame Berteaux-Pilleux Valérie**, Pharmacien titulaire d'officine (Dreux, 28100)

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : **le 10 septembre 2020 à Tours (37200)**