

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN PHARMACIE INDUSTRIELLE

Intitulé du mémoire

Etude de l'activité antibactérienne de
l'encre de seiche dans l'amélioration des
propriétés biologiques d'un hydrogel

Présenté par :

M^{elle} : MAHMOUCHE Amira

Encadré par :

M^{me} : LARIBI Hassiba

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Dieu Tout Puissant pour m'avoir donné la force de le mener à terme.

Je tiens à présenter toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui y ont contribué, de près ou de loin.

Particulièrement à notre promotrice Madame Laribi que je remercie de m'avoir encadrée, orientée, et aidée.

J'adresse également tous mes remerciements aux enseignants du département de Génie des procédés, à tous les professeurs intervenants et toutes les personnes, qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques, ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à toutes mes questions.

Je remercie les membres de jury chacun par son propre nom trouver ici l'expression de notre gratitude pour leur temps qu'ils ont bien voulu consacrer à la lecture approfondie de ce mémoire en tant que examinateur .

Je remercie ma très chère maman, qui a toujours été là pour moi.

Je remercie aussi mes chers (es) amis (es) de la promotion et tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Je remercie mon frère, ma sœur pour leurs encouragements.

Enfin, Je remercie tous les amis que j'aime tant, notamment Noussaiba, Maman Naima, Coucou, Farid, Mustapha, et Billel, pour leur confiance et leur sincère amitié. Je leur exprime toute ma reconnaissance, mon fidèle attachement, mon respect et ma gratitude.

Que dieu leur accorde santé et prospérité.

ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو تطوير منتج بيولوجي من مصدر بحري للاستخدام الصيدلاني على شكل مسحوق أسود مشابه لمسحوق السمك يسمى PFDS والذي سيتم إنتاجه في هيدروجيل طبيعي ، وهذا الأخير يتميز بالأنشطة المضادة للجراثيم وقد أثبتت الاختبارات الميكروبيولوجية ذلك.

الهيدروجيل مضاد للميكروبات مصمم كضمادة واقية على الجروح الجافة. أثبتت اختبارات التورم أن الهيدروجيل يحمي جلد المريض ، ويسمح بانتشار الرطوبة داخل الجرح مما يسمح له أيضاً بالتقاط البكتيريا بفضل الخصائص الميكانيكية المثيرة التي يبررها السلوك الريولوجي اللزوجة المرنة.
الكلمات الرئيسية: هيدروجيل ، حبر الحبار ، تأثير مضاد للجراثيم ، مسحوق أسود.

Abstract :

the objective of this study is the development of a biological product from a marine source for pharmaceutical use in the form of a black powder similar to a fish powder called PFDS which will be produced in a natural hydrogel, the latter presents activities better bactericides this has been well demonstrated by microbiological tests.

The hydrogel with antimicrobial effect designed as a protective dressing on dry wounds. The swelling tests have proven that the hydrogel protects the patient's skin, allows the diffusion of moisture inside the wound which also allows him to capture bacteria thanks to the interesting mechanical characteristics which are justified by the behavior viscoelastic rheology.

Keywords: hydrogel, squid ink, antibacterial effect, black powder.

Résumé :

L'objectif de cette étude est la valorisation d'un produit biologique d'une source marine pour usage pharmaceutique sous forme d'une poudre noire assimilée à une poudre de poisson appelée PFDS qui sera élaborée en un hydrogel naturelle, cette dernière présente des activités bactéricides meilleures ceci a été bien mis en évidence par des tests microbiologiques. L'hydrogel à effet antimicrobien conçu comme un pansement protecteur sur les plaies sèches . Les tests de gonflement ont prouvé que l'hydrogel protège la peau du patient , permet la diffusion de l'humidité à l'intérieur de la plaie ce qui lui permet aussi de capter les bactéries grâce aux caractéristiques mécaniques intéressantes qui sont justifiées par le comportement rhéologique viscoélastique.

Mots clés : hydrogel, encre de seiche, effet antibactérien, poudre noire.

Sommaire

Liste des abréviations	5
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux	8
Introduction générale.....	1
I. Généralité sur la valorisation de l'encre de seiche	2
I.1 L'encre de seiche.....	2
I.2 Les propriétés biologiques de l'encre :	2
I.3 Les différentes applications de l'encre de sépia.....	3
II Généralité sur activité antibactérienne et la peau	5
II.I Les micro-organismes	5
II.1.1 Définition	5
II.II Les bactéries.....	5
II.2.1 Définition	5
II.2.2 Classification bactérienne	6
II.III La peau.....	8
II.3.1 Définition :	8
II.3.2 Constitution de la peau.....	9
II.IV La plaie.....	10
II.4.1 Définition	10
II.4.2 Type de plaies et la cicatrisation :	10
II.4.3 Processus de cicatrisation :.....	11
III.1 Généralités sur les hydrogels	12
III.1.1 Qu'est-ce qu'un hydrogel ?.....	12
III.1.2 Méthodes de synthèse des hydrogels	15
III.1.3 Propriétés notables des hydrogels :	16
III.1.4 Application des hydrogels.....	18
III.1.4.1 Applications biomédicales	18
I. Présentation du médicament	20
I.1 La composition de gel	20
I.1.1 Principe actif encre de seiche	20
I.2.1 Les excipients :.....	21
I.2 Rôle des excipients.....	22
II.2 Matériel et méthodes	23

II.1	Matériel et produits utilisés :.....	23
II.1.1	Matériels :	23
II.2	Méthodes utilisées :.....	23
II.1.2	Produits utilisés:.....	23
II.3	Méthode de fabrication :	24
II.3.1	Méthode de fabrication de la poudre noire :	24
II.4	Méthodes d'analyse :.....	24
II.4.1	Evaluation de l'activité antibactérienne :.....	24
III.	Résultats et discussion :.....	29
III.1	Résultat de l'activité antibactérienne	29
III.1.1	Sensibilité aux contrôles	29
III	Résultat de l'extrait aqueux de l'encre.....	31
	Synthèse bibliographique	34
	Conclusion.....	41
	Référence	43

Liste des abréviations

API : ingrédient pharmaceutique actif.

MP : matière première

MH : milieu Mueller Hinton

UV-Vis : ultraviolet –visible

PEG : Poly éthylène glycol

PLC : Poly ϵ - caprolactone

PVA : alcool polyvinylique

HEMA : méthacrylate de polyhydroxyéthyle

EGDMA : Diméthylacrylate d'éthylène glycol

PEG : Poly éthylène glycol

PFDS : farine de poisson sépia

GEN : Gentamycine

EAU-D : eau distillée

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

ZI : zone d'inhibition

Liste des figures

Figure 1.1 : localisation de la glande chez le mâle (a) et femelle (b)

Figure 2.2 : différentes morphologies de bactéries

Figure 2.3 : schéma représentant les différents constituants de la peau

Figure 3.4 : Chimie structurale d'un hydrogel.

Figure 3.5 : Schéma de formation de deux types d'hydrogels physiques ioniques : un d'hydrogel "ionotropique" et un hydrogel polyionique

Figure 3.6 : Schéma de formation d'un hydrogel chimique par différents types de polymérisation ou réticulation de polymères hydrosolubles

Figure 1.7 : poudre de la poche noire

Figure 2.8: illustration de principe de la méthode de diffusion par disque

Figure 2.9: filtres seringue « chrodisc by CHM »

Figure 2.10 : Procédure de stérilisation des échantillons à analyser par filtration

Figure 2.11 : suspension des souches bactériennes

Figure 2.12 : Dépôt des disques

Figure 3.13: Zones d'inhibition de contrôles sur les souches étudiées

Figure 3.14: la ZI de contrôle sur la souche *E.coli*

Figure 3.15: la ZI de contrôle sur la souche *S.aureus*

Figure 3.16 : Effet de l'encre de seiche sur les souches étudiées

Figure 3.17: Effet de l'encre de seiche sur la souche *S.aureus* pour différents concentrations

Figure 3.18 : Effet de l'encre de seiche sur la souche *E.Coli* pour différents concentrations

Figure 4.19 : Activité antibactérienne des extraits d'encre pigmentée contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : les caractéristiques de quelque bactérie à gram positif

Tableau 2.2 : les caractéristiques de la bactérie E.COLI

Tableau 3.3 : les méthodes couramment utilisées pour synthétiser des hydrogels

Tableau 1.4 : le rôle des excipients

Tableau 2.5 : Liste des testent des Souches bactériennes.

Tableau 2.6 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés d'extraits étudiés

Tableau 3.7 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition des contrôles utilisés sur les souches étudiées

Tableau 3.8 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches induite par l'encre de seiche liquide

Introduction

Introduction générale

L'encre de seiche, aussi appelée sépia, est un liquide opaque présent dans la poche de la seiche que cette dernière éjecte pour se protéger et s'extraire de situations dangereuses. . Ce liquide que libère la seiche est utilisé non seulement en gastronomie espagnole et italienne, mais également en imprimerie, dans l'industrie textile et en médecine pour la prévention et la lutte contre plusieurs maladies [1].

. il est une cure efficace pour renforcer les défenses immunitaires, lutter contre le stress et la fatigue et fortifier la peau ainsi que les cheveux

Parmi les problèmes de santé les plus rencontrés chez les patients blessés sont bien que les plaies sèches due à une peau sèche, une carence en vitamine qui peut affaiblir la peau et empêcher le tissu de guérir et régénère normalement

Les hydrogels sont devenus très populaires en raison de leurs propriétés uniques telles que la haute teneur en eau, la douceur, la flexibilité et la biocompatibilité. Les polymères hydrophiles naturels et synthétiques peuvent être réticulés physiquement ou chimiquement afin de produire des hydrogels. Leur ressemblance avec les tissus vivants ouvre de nombreuses opportunités pour des applications dans les domaines biomédicaux. Actuellement, les hydrogels sont utilisés pour fabriquer des lentilles de contact, des produits d'hygiène, des systèmes d'administration de médicaments et des pansements [2].

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'étudier, valoriser et de tester le pouvoir antimicrobien de la matière biologique encre de seiche provient d'une source marine dans le but de sélectionner des souches inhibitrices possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes afin de préserver la santé et l'hygiène publique.

En outre, nous abordons dans la partie expérimentale les études antibactériennes et la formulation du produit.

Enfin, nous terminons par une conclusion dans laquelle nous exposons les apports de ce travail et les résultats obtenus qui peuvent constituer une contribution intéressante dans la prévention contre les infections et mettre au point des systèmes de protection adéquats pour les peaux sensible.

*Données
Bibliographique*

I. Généralité sur l'encre de seiche

I.1 L'encre de seiche

La glande d'encre de seiche est considérée comme un système biologique de la Mélanogénèse le plus perfectionné [1].

La glande d'encre ou poche de noir est présente dans le tractus digestif et elle est accolée à ce dernier composée de plusieurs alvéoles [1].

Elle contient des mélanomes lorsqu'elles deviennent matures libèrent de grain de mélanine accolées à du matériel cellulaire maintenu en suspension dans le liquide [1].

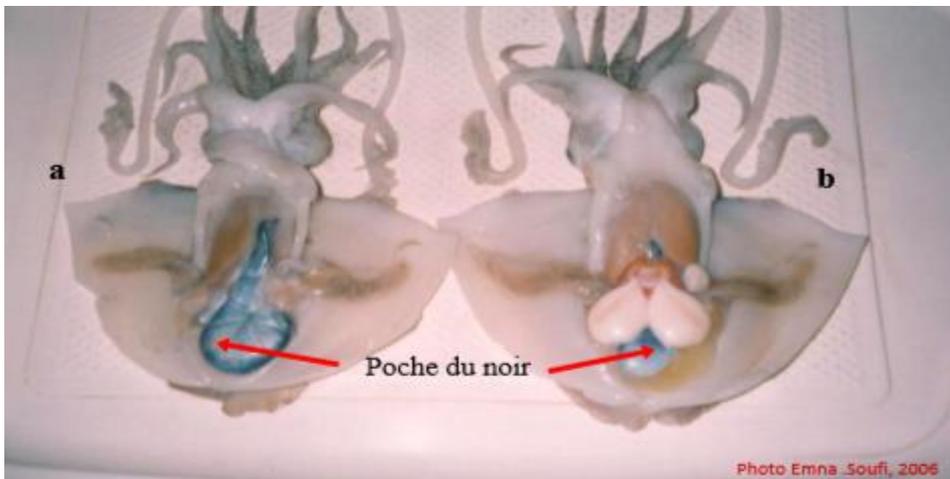


Figure 1. 1 localisation de la glande chez le mâle (a) et femelle (b)

I.2 Les propriétés biologiques de l'encre :

La mélanine possède aussi de nombreuses fonctions physiologiques (Riley1997) parmi lesquels le rôle d'antioxydant.

En effet, les molécules d'eumélanine possèdent à la fois des groupements fonctionnels oxydants (o-quinone) et réducteurs (o-hydroquinone) [1].

De plus, l'encre semble contenir un antioxydant par le fait que l'oxydation de ces composés dans l'eau de mer est retardée. Un antioxydant naturel stabilisant ces messages chimique dans l'eau de mer pourrait ainsi être présent dans l'encre [1].

Senan et al(2004)., ont étudié les propriétés antiprolifératives de l'encre de seiche sur les fibroblastes des embryons de poulet in vitro.L'activité antimicrobienne de l'encre contre

différents groupes de microorganismes a été largement étudiée durant les trente dernières années [1].

Sadok et al (2004)., ont démontré le potentiel significatif que possède cette encre contre les bactéries anaérobies particulièrement la flore psychotrope [1].

I.3 Les différentes applications de l'encre de sépia

Dans beaucoup de pays asiatiques, les déchets résultant du conditionnement des céphalopodes sont valorisés en divers produits utilisables dans les industries alimentaires, les produits cosmétiques et pharmaceutiques, les peintures [3].

L'encre de seiche est une substance liquide noire naturelle concentrée dans une poche qui constitue un organe propre aux céphalopodes. Au Japon, cette encre est utilisée dans la préparation de seiche crue et salée. Au cours de la préparation de l'Ika-shiokara [3].

TAKAI *et al* (1993)., ont montré que cette encre a une influence sur la qualité microbiologique du produit. En effet, l'encre du calamar (espèce proche de la seiche) augmente la période de comestibilité de l'Ika-shiokara [3].

MOCHIZUKI (1979) a caractérisé l'isolat qui a un effet inhibiteur sur la culture de *Staphylococcus aureus* et en a déduit que la propriété antibactérienne est due à une substance similaire au lysozyme du blanc d'œuf [3].

CHANG LONG *et al.* (1994)., ont montré que l'encre de seiche a des effets immunologiques sur les souris [3].

Des chercheurs tunisiens ont commencé à se préoccuper de la valorisation des encres de seiche. Ainsi, en se basant sur la technique de Kanikawa, NEIFAR (2000) a pu mettre au point une technique permettant la transformation des déchets de la seiche en un produit noir appelé PFDS similaire à une farine de poisson. Ce produit a un effet positif sur la croissance des poulets de chair [3].

La consommation du PFDS diminue les risques de mortalité en augmentant l'immunité des animaux probablement grâce aux constituants de ce produit, notamment de l'encre de seiche [3].

SAIDANE (2001) et SADOK *et al.* (2004) ont montré que le surnageant (clair et limpide) obtenu par centrifugation de l'encre provenant de *Sepia officinalis* permet la prolongation de la durée de conservation réfrigérée des produits de haute valeur marchande tels que les crevettes [3].

Afin de préserver la qualité microbiologique et la composition chimique de la chair de crevette décortiquée conservée à différentes températures (-2°C, 0°C), l'utilisation de l'encre de seiche (*Sepia Officinalis*) en solution à différentes concentrations (0,0%, 0,01%, 0,2%, 2%) a été testée [4].

L'évaluation quantitative de la flore bactérienne aérobie psychrotrophe a été déterminée après trois jours de stockage. Les résultats montrent que la réfrigération et le traitement ont un effet certain sur la réduction de la flore aérobie, et particulièrement après 10 jours d'entreposage [4].

L'inhibition constatée sur la chair des crevettes augmente en fonction de la concentration de la solution de traitement. Cependant aucun effet caractéristique n'est constaté sur les bactéries mésophiles après 16 jours de conservation [4].

II Généralité sur activité antibactérienne et la peau

II.I Les micro-organismes

II.1.1 Définition

Le mot micro-organisme signifie « petit organisme ». En effet, les micro-organismes sont de minuscules organismes vivants invisibles à l'œil nu et présents presque partout sur terre. Ils ont un rôle essentiel dans la nature mais sont source de nombreux problèmes dans l'industrie alimentaire. Leur activité métabolique modifie la composition des aliments qu'ils ont infectés.

Le terme de micro-organisme englobe à la fois les bactéries, certains champignons (moisissures, levures) mais aussi les virus (pour certains biologistes). Ces organismes sont donc un groupe très hétérogène (comprenant des procaryotes et des eucaryotes) dont les seuls points communs sont la taille et la forme [5].

II.II Les bactéries

II.2.1 Définition

Les bactéries sont des micro-organismes vivants, au même titre que les virus et les champignons. Elles ont été découvertes à la fin du 17^{ème} siècle par Anthoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais, qui inventa la microscopie. Elles sont très nombreuses et ont souvent été considérées comme des agents pathogènes et agressifs, responsables de maladies plus ou moins graves. Mais, contrairement au virus, ce n'est pas toujours le cas... En effet, le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries qui constituent la « flore commensale». Par exemple, au niveau du système digestif, le microbiote intestinal, largement impliqué dans les processus de digestion et de défense de l'organisme, est composé d'environ mille milliards de bactéries. Certaines de ces bactéries sont utilisées dans l'alimentation ou dans certains médicaments pour rééquilibrer le microbiote et rétablir une fonction digestive normale (suite à des épisodes de diarrhée.) [6].

II.2.2 Classification bactérienne

- **Selon classification de linné[6]**: Chaque espèce se distingue par des caractéristiques métaboliques et morphologiques
 - les cocci seront plutôt courts et sphériques.
 - les bacilles en forme de bâtonnet.
 - d'autres peuvent être incurvés ou spiralés..

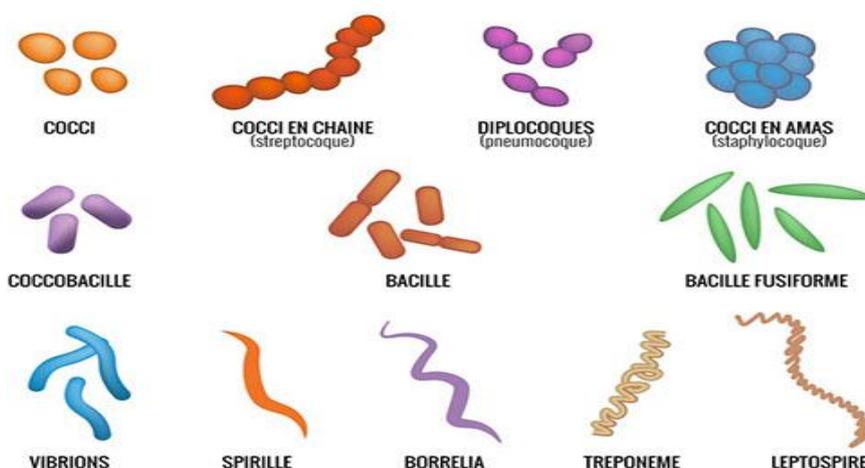


Figure 2.2 : différentes morphologies de bactéries

- **selon la classification du Gram :**

Le tableau ci-dessous présente la classification des bactéries selon le gram positif et le gram négatif

➤ Gram positif :

Tableau 2.1 représente les caractéristiques de quelque bactérie à gram positif [7].

Morphologie	Genre	Espèce	Nom courant	Habitat	Pouvoir pathogène
En amas	Staphylococcus	Aureus	Staphylocoque doré	Peau	Suppuration
		Epidermidis	Staphylocoque blanc	muqueuses	

En chaînettes	Streptococcus	A, C, G streptocoque B D	streptocoque Beta hémolytique / Entérocoque	Pharynx voies génitales intestin	Angines Syndromes poststreptococcique infections néonatales Infections urinaire, digestive endocardites
Diplocoques	Streptococcus	Streptococcus	Pneumocoque	voies respiratoires	Pneumonies Méningites Otites

➤ **Gram négatif :**

Escherichia coli: Bacille à coloration de Gram négative, oxydase négative, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm, Escherichia coli (E. coli) est normalement présente parmi le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux à sang chaud. Mais certaines souches de E. coli sont pathogènes, car elles ont acquis des facteurs de virulence. Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches de E. coli pathogènes sont regroupées en pathovars (ou pathotypes) parmi lesquels les EHEC. Les EHEC libèrent des toxines, les shigatoxines (Stx) (encore parfois appelées vérotoxines), qui induisent des lésions de l'endothélium vasculaire, principalement intestinal, rénal et cérébral. Une souche de E. coli possédant un gène stx est appelée E. coli producteur de shigatoxine ou STEC (shigatoxin-producing E. coli) ou encore parfois VTEC (verotoxin-producing E. coli) sans que cela présage de la virulence de ces souches. Les gènes stx sont portés par des phages ayant leur génome inséré dans le chromosome bactérien. Certaines substances (comme des antibiotiques) ou facteurs de stress peuvent induire le phage Stx de la souche EHEC, provoquant la lyse de la bactérie et un relargage massif des toxines.[8].

Tableau 2.2 :représente les caractéristiques de la bactérie *E.COLI* [6].

Famille	Genre	Espèce	Souche
Entérobactéries	Escherichia	Coli	individu ou clone caractérisé par ses antigènes (sérotype), la structure de son génome (génotype), son pouvoir pathogène particulier (pathovar), etc.

II.III La peau

II.3.1 Définition :

La peau, appelée aussi tégument (du latin tegumentum, couverture), est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme, pesant 4 kg et représentant une surface de 2 m². L'épaisseur de la peau est de 2 mm en moyenne, mais elle varie de 1 mm au niveau des paupières (peau fine) à 4 mm au niveau des paumes et des plantes (peau épaisse).

La peau constitue beaucoup plus qu'une simple enveloppe recouvrant notre corps. Elle est en effet le siège de nombreuses fonctions : fonction de protection, fonction de thermorégulation, fonction sensorielle, fonction d'échanges, fonctions métaboliques. Sur un plan structural, la peau est constituée de trois tissus superposés : le tissu le plus externe est l'épiderme (du grec « epi », dessus, et « derma », la peau), le tissu intermédiaire est le derme et le tissu le plus profond est l'hypoderme (du grec « hypo », en dessous [9]).

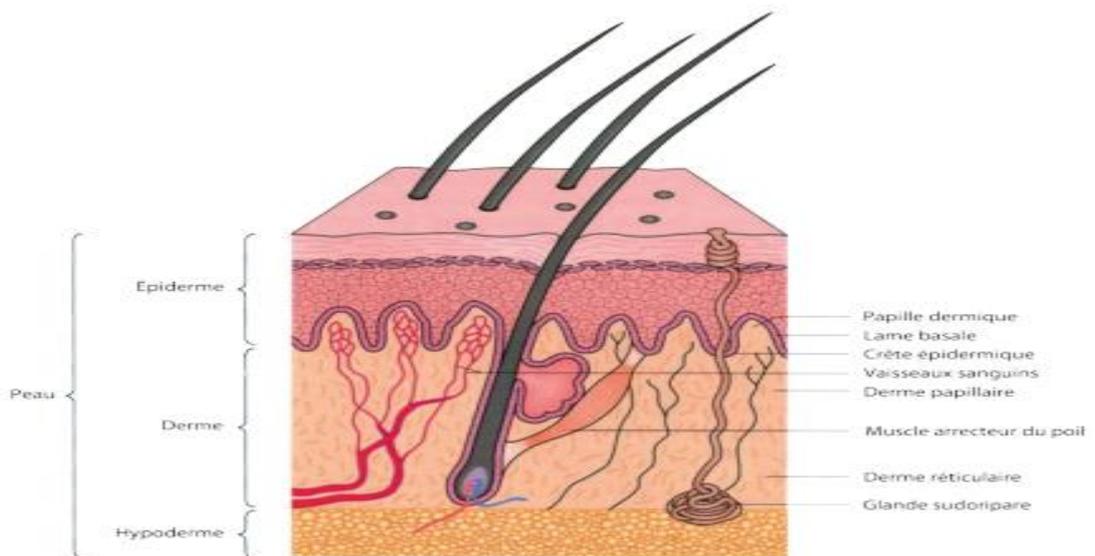


Figure 2.3 : schéma représentant les différents constituants de la peau

II.3.2 Constitution de la peau

La peau est constituée de 3 couches superposées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme [9].

L'épiderme :

En contact direct avec l'extérieur, il associe souplesse, imperméabilité et résistance. Pour éviter un passage direct entre justement l'extérieur et l'intérieur du corps, l'épiderme est dépourvu de vaisseaux sanguins (ainsi, lors d'une coupure superficielle, seule une fine pellicule de peau se détache et il n'y a pas de saignement). L'épiderme est constitué de 4 régions différentes que l'on distingue au microscope électronique.

- 1- La couche basale, la plus profonde : Au contact du derme, elle est composée d'une couche unique de cellules, les kératinocytes, qui se multiplient rapidement et dont le rôle est de renouveler le contingent des cellules cutanées. On trouve aussi dans cette couche les cellules mélanocytaires, ou mélanocytes, qui fabriquent un pigment spécifique appelé mélanine, permettant de protéger la peau des rayons du soleil.
- 2- La couche de Malpighi (ou couche épineuse) : Elle est constituée de la superposition de 4 à 5 épaisseurs de kératinocytes liés entre eux. Cet accrochage étroit favorise la fonction d'imperméabilité de la peau. Progressivement, dans leur mouvement de l'intérieur vers l'extérieur, les cellules accumulent la mélanine et se chargent en grains de kératine qui joue un rôle important dans la fonction de barrière du revêtement cutané.
- 3- La couche granuleuse : A ce stade, les cellules remplies de kératine se rapprochent de la surface de la peau et commencent à dégénérer et à se déstructurer.
- 4- La couche cornée : C'est la couche la plus superficielle de la peau. Les cellules devenues plates et translucides sont mortes et forment une couche résistante et imperméable.

Le derme :

Situé sous l'épiderme, il constitue la partie résistante de la peau. Son épaisseur varie suivant les zones et peut atteindre jusqu'à 1 cm au niveau du dos. Composé à 80% d'eau, il est très riche en fibres d'élastine et de collagène; il est donc à la fois solide, souple et élastique. Des muscles, dits peauciers, viennent s'y attacher. Ils soutiennent le revêtement cutané dans certaines zones comme les seins ou le cou. C'est également dans le derme que se trouvent la plupart des éléments annexes de la peau : poils, glandes sudoripares qui fabriquent la sueur, glandes sébacées qui fabriquent le sébum Schéma de la peau vue en

coupe 6 et vaisseaux sanguins qui apportent nutriments et cellules de défense. Le derme sert ainsi de couche nourricière à l'épiderme [9].

L'hypoderme

C'est un tissu de soutien souple et déformable dont le rôle est de servir d'interface entre la peau et les organes qu'elle recouvre (muscles, os...). Il est très riche en cellules graisseuses (adipocytes) et en fibroblastes. L'hypoderme est présent sur tout le corps sauf au niveau des oreilles, des paupières et des organes génitaux externes masculins. Il est particulièrement épais au niveau des parties du corps soumises à des pressions importantes comme les talons ou les fesses. L'hypoderme joue également un rôle de réserve énergétique. La graisse contenue dans les adipocytes peut être mobilisée sous forme d'énergie en cas d'effort intense ou prolongé ou de jeûne. L'hypoderme participe à la régulation thermique, la graisse jouant un rôle d'isolant passif, en réduisant les échanges de température avec l'extérieur [9].

II.IV La plaie

II.4.1 Définition

Une plaie se définit comme une solution de continuité ayant une origine mécanique ou chimique accompagnée d'une perte de substance plus ou moins importante. En considérant leur durée d'évolution [10].

I.4.3 Type de plaies et la cicatrisation :

les plaies peuvent être classées en deux catégories :

- les plaies aiguës : elles sont souvent d'origine traumatique, leur évolution est rapide
- les plaies chroniques : ce sont des plaies plus complexes qui vont cicatriser difficilement et beaucoup plus lentement.

Les plaies aiguës peuvent présenter des retards de cicatrisation en cas de complications telles que des surinfections, une réaction inflammatoire inappropriée, un mauvais état général de l'animal...

La cicatrisation permet de réparer cette solution de continuité. C'est un ensemble de mécanismes visant la reconstruction du tissu lésé [10].

Il existe deux modes de cicatrisation en fonction de l'aspect de la plaie :

- **la cicatrisation par première intention** : elle concerne les plaies dont l'affrontement cutané est parfaitement bord à bord qu'il y ait eu ou non perte de substance. Les tensions appliquées aux marges de la plaie ne doivent pas être excessives et aucun corps étranger ne doit se trouver dans la plaie. Celle-ci doit également être parfaitement aseptique. La cicatrisation est 30 alors rapide avec une phase inflammatoire courte et une réépithélialisation rapide. La cicatrice est généralement très discrète, sa phase de maturation étant réduite [10].
- **la cicatrisation par seconde intention** : elle intervient lorsque les plaies présentent des marges éloignées l'une de l'autre ou contiennent des tissus nécrosés, des corps étrangers, des germes... Les plaies cicatrisant par seconde intention sont le siège d'une phase inflammatoire aiguë initiale évoluant très lentement. La résultante est peu esthétique et la maturation de la plaie sera importante [10].

II.4.3 Processus de cicatrisation :

Il comprend quatre phases comme suit [11] :

- **Phase 1 : inflammation – détersion**

Création du caillot qui est un réservoir de facteurs de croissance qui stimulent la migration et l'activation des macrophages. Les neutrophiles et les macrophages des tissus libèrent des enzymes qui permettent la détersion de la plaie [11] .

- **Phase 2 : réparation tissulaire– bourgeonnement**

La migration et la prolifération des fibroblastes permettent la synthèse de la nouvelle matrice extracellulaire avec le formation d'un tissu de granulation puis d'un bourgeon charnu [11].

- **Phase 3 : épidermisation**

Il s'agit de la fermeture de la plaie par migration des kératinocytes à partir des berges [11].

- **Phase 4 : remodelage**

Cette phase correspond à une étape de maturation de la cicatrice qui dure au moins un an (protéger la plaie des traumatismes et exposition solaire). Une altération de cette phase peut conduire à une cicatrice chéloïde [11].

III Les hydrogels

III.1 Généralités sur les hydrogels

III.1.1 Qu'est-ce qu'un hydrogel ?

Un hydrogel est un réseau polymérique hydrophile qui peut absorber de l'eau jusqu'à plusieurs milliers de fois sa masse sèche.

Les hydrogels peuvent être stables chimiquement ou peuvent se dégrader et se dissoudre

Les hydrogels sont dits "réversibles" ou "physiques" lorsque le réseau est un enchevêtrement de polymère tenu par des forces secondaires de type liaisons hydrogènes, ioniques ou hydrophobes [12].

Les domaines de réticulation des gels physiques créent des inhomogénéités [12].

Les chaînes de polymères libres représentent un réseau transitoire dans les gels physiques puisque les sites de réticulation ne sont pas permanents. Lorsqu'un polyélectrolyte est combiné à un ion multivalent de charge opposée, cela peut conduire à la formation d'un hydrogel physique dit "ionotropique". D'autre part, lorsque deux polyélectrolytes de charges opposées sont mélangés, ils peuvent gélifier ou précipiter en fonction de leur concentration, de la force ionique et du pH de la solution [12].

Les produits de ce type de systèmes réticulés "physiquement" sont appelés coacervats complexes ou complexes polyélectrolytes. Les interactions dans les hydrogels physiques étant réversibles, il est possible de les défaire en jouant sur les conditions physiques telles que la force ionique, le pH, la température [12].

Les hydrogels sont dits "permanents" ou "chimiques" lorsque leur réseau est réticulé de manière covalente. Les premiers hydrogels synthétiques de Wichterle and Lim [1960] étaient formés par la copolymérisation du monomère HEMA avec le monomère EGDMA.

Comme les hydrogels physiques, les hydrogels chimiques ne sont pas homogènes. Ils contiennent généralement des régions peut gonflées par l'eau où la densité de réticulation est élevée. Ces régions appelées "clusters" sont dispersées parmi des régions à faible densité de réticulation très gonflées en eau. Dans certains cas, en fonction de la composition du solvant, de la température et de la concentration lors de la formation du gel, une séparation de phase peut avoir lieu, formant ainsi des cavités (ou macropores)

remplis d'eau dans le gel. Dans les gels chimiques, les chaînes de polymères libres sont des "défauts" dans le réseau et ne contribuent pas à l'élasticité permanente du réseau [12].

Il existe un certain nombre de structures macromoléculaires possibles pour les hydrogels physiques et chimiques, incluant les suivantes :

un réseau réticulé ou enchevêtré d'homopolymères linéaires, de copolymères linéaires et de copolymères à blocs ou branchés; un complexe polyionion multivalent, polyion-polyion ou liaisons hydrogènes;

un réseau hydrophile stabilisé par des régions hydrophobes; des réseaux inter-pénétrés (ou mélanges physiques). D'autres part, les hydrogels peuvent avoir différentes formes physiques, comme par exemple:

- Un solide mou (ex. lentilles de contact).
- Une poudre comprimée (ex. pilules ou capsules pour ingestion orale).
- Des microparticules (ex. vecteurs bioadhésifs ou traitement des plaies).
- Sous forme de revêtement (ex. sur les implants, sur les pilules ou capsules).
- Sous forme de membrane ou de feuille (ex. réservoir dans un patch de libération sous-cutanée, gels d'électrophorèse à 2D).
- Solide encapsulé (ex. pompe osmotique)
- Liquide (formant un gel par chauffage ou refroidissement)[12].

Les hydrogels peuvent être partagés entre les polymères d'origine naturelle et les polymères synthétiques. Il est également possible de former des hydrogels en mélangeant les deux classes [12].

Les hydrogels issus de polymères naturels offrent en général plusieurs avantages inhérents tels que la biocompatibilité et la biodégradabilité, ainsi que la présence de fragments biologiques favorisant l'activité cellulaire. À l'inverse, les hydrogels synthétiques ne possèdent pas de propriétés biologiques intrinsèques. Néanmoins, les polymères synthétiques ont généralement des structures bien définies qui peuvent être ajustées de manière à satisfaire la biodégradabilité et la biofonctionnalité [12].

. Les hydrogels ne se désintègrent pas lors du gonflement, grâce à leur structure réticulée. La réticulation peut avoir lieu dans deux environnements: in vitro, lors de la préparation d'un hydrogel ou in vivo (in situ), après l'application à un endroit précis du corps humain. Pour initier la réticulation chimique, il est nécessaire d'introduire un agent de réticulation de bas poids moléculaire avec un polymère dans le mélange réactionnel. En l'absence de

points de réticulation, les chaînes polymères linéaires hydrophiles se dissolvent dans l'eau en raison de la chaîne polymère et de la compatibilité thermodynamique de l'eau. Néanmoins, en présence de points de réticulation, la solubilité est contrebalancée par la force de rétraction de l'élasticité des points de réticulation dans le réseau. Lorsque ces forces deviennent égales, le gonflement atteint alors un équilibre[13].

L'hydrophilie du réseau est due à la présence de groupements hydrophiles tels que $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH-$ et $-SO_3H$, effet capillaire et pression osmotique.

Les points de réticulation chimiques et physiques maintiennent la structure 3D des hydrogels à l'état gonflé. En réticulation chimique, les chaînes de polymère sont liées par covalence via un agent de réticulation, où en réticulation physique les hydrogels possèdent des jonctions de domaine physique, une liaison hydrogène, une interaction hydrophobe, une complication ionique, qui permet la coulée de solvants, la modification en vrac post-processus, la facilité de fabrication, le remodelage, la biodégradation et la non-toxicité montrent de meilleures propriétés, ce qui manque aux hydrogels réticulés chimiquement[13].

Gibas et Janik ont rapporté que le gonflement des hydrogels est un processus complexe comprenant un certain nombre d'étapes :

- Dans la première étape, les groupes hydrophiles polaires de la matrice hydrogel sont hydratés par l'eau, qui se présente sous la forme d'eau liée primaire.
- Dans la deuxième étape, l'eau interagit également avec les groupes hydrophobes exposés, qui apparaissent sous la forme d'eau liée secondaire.
- Dans la troisième étape, la force motrice osmotique du réseau vers une dilution infinie est résistée par les réticulations physiques ou chimiques, donc de l'eau supplémentaire est absorbée.

L'eau absorbée dans le gonflement d'équilibre est appelée eau en vrac ou eau libre, qui remplit les espaces entre le réseau ou les chaînes et le centre des pores plus grands.

La quantité d'eau absorbée par un hydrogel dépend de la température et de l'interaction spécifique entre les molécules d'eau et les chaînes polymères, ce qui peut s'expliquer par la théorie de Flory-Huggins [13].

La partie solide de l'hydrogel est un réseau de chaînes polymères réticulées, un réseau 3D généralement appelé maillage, comme le montre la figure 1, avec les espaces remplis d'un fluide, normalement de l'eau. Les mailles retiennent le fluide et confèrent une force

élastique qui peut être complétée par l'expansion et la contraction de l'hydrogel, et sont donc responsables de la solidité de l'hydrogel. La phase ionique des hydrogels se compose généralement de groupes ionisables liés aux chaînes polymères et d'un certain nombre d'ions mobiles, y compris les contre-ions et les co-ions en raison de la présence du solvant électrolytique, qui entoure l'hydrogel[13].

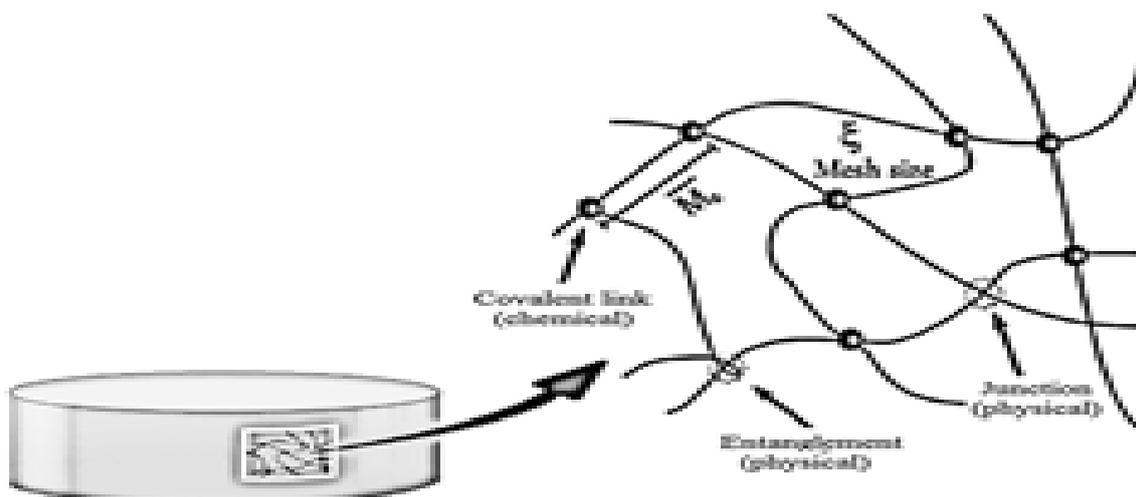
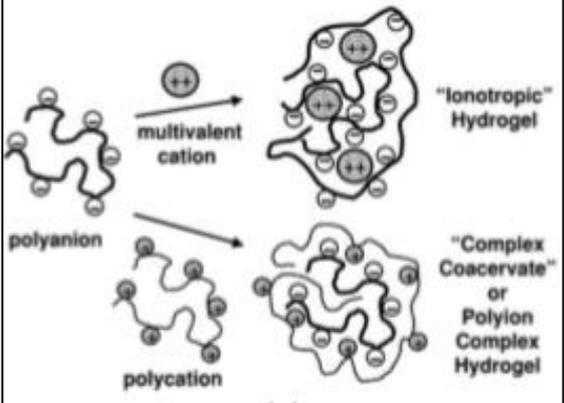
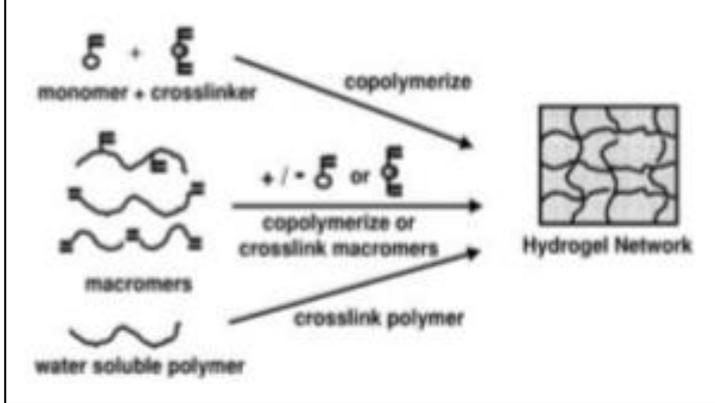


Figure 3.4 : Chimie structurale d'un hydrogel.

III.1.2 Méthodes de synthèse des hydrogels

Le tableau (3.3) au-dessous vous présente quelques méthodes couramment utilisées pour synthétiser des hydrogels [12]

Hydrogels physique	Hydrogels chimique
<ul style="list-style-type: none"> - Chauffage ou refroidissement d'une solution (ex. agarose ou gélatine dans l'eau). - Diminution du pH pour former un gel par liaisons hydrogènes entre deux polymères en solution aqueuse (ex. PEG et PAA). - Mélange de solutions d'un polyanion et d'un polycation pour former un gel sous forme de 	<ul style="list-style-type: none"> - Radiation (ex. irradiation de PEG dans l'eau). - Réticulation chimique (ex. traitement du collagène avec du glutaraldéhyde). - Copolymérisation d'un monomère par un agent réticulant en solution (ex. HEMA + EGDMA). - Polymérisation d'un monomère dans un polymère solide différent pour former un réseau interpénétré (ex. acrylonitrile + amidon). - Conversion chimique d'un polymère hydrophobe en hydrogel (ex. hydrolyse partielle

<p>coacervat complexe (ex. alginate de sodium plus polylysine).</p> <p>- Gélification d'une solution de poly-électrolyte avec union multivalent de charge opposée(ex.alginate de sodium + calcium).</p>	<p>de poly(acétate de vinyl) PVAc en alcool polyvinylique PVA).</p>
	
<p>Figure 3.5 Schéma de formation de deux types d'hydrogels physiques ioniques : un d'hydrogel "ionotropique" et un hydrogel polyionique</p>	<p>Figure 3.6 : Schéma de formation d'un hydrogel chimique par différents types de polymérisation ou réticulation de polymères hydrosolubles [Hoffman, 2002]</p>

III.1.3 Propriétés notables des hydrogels :

Les hydrogels utilisés comme biomatériaux dans les biotechnologies nécessitent certaines propriétés physico-chimiques que l'on doit pouvoir caractériser et contrôler, dont les présente comme suit :

Dégradabilité : Le contrôle de la dégradation d'un biomatériaux est souvent un facteur clé dans les applications biomédicales. En se dégradant, le matériau laisse de l'espace pour la croissance d'un nouveau tissu, ou laisse diffuser les molécules bioactives. La dégradation du gel peut être contrôlée par des méthodes physiques et/ou chimiques : il est possible de jouer sur la masse molaire des polymères ou leur composition pour contrôler la cinétique de dégradation in vivo. L'utilisation d'enzymes est un exemple de méthode biologique permettant la dégradation des hydrogels [12].

Propriétés mécaniques : Les propriétés mécaniques d'un hydrogel sont très importantes pour le choix du matériau à utiliser au regard d'une application. Pour mieux comprendre le comportement mécanique des hydrogels, on utilise les théories d'élasticité et viscoélasticité basées sur la réponse temporelle du gel soumis à une contrainte. On peut

distinguer les gels mous, comme les élastomères, qui sont viscoélastiques et possèdent un faible module d'Young. Ils possèdent une contrainte seuil de plasticité à partir de laquelle la déformation est irréversible : c'est le régime de viscoplasticité.

Les gels plus rigides possèdent des modules d'Young supérieurs : ils sont moins déformables et peuvent casser lorsque la contrainte dépasse une contrainte seuil de rupture. La rigidité d'un polymère réticulé provient essentiellement de la densité de réticulation et de l'énergie des liaisons. On peut par exemple, lorsqu'un hydrogel n'est pas homopolymérique, améliorer la rigidité finale du matériau en augmentant la proportion de monomères plus "solides" et en augmentant ainsi la raideur du squelette de polymères (en remplaçant par exemple des acrylates par des méthacrylates). On peut également augmenter la densité de réticulation d'un gel en augmentant la quantité d'agent réticulant ou la concentration en polymère [12].

Les conditions de formation de l'hydrogel telles que le temps de réaction, la température, la quantité et le type de solvant influent sur la structure finale du gel et peuvent également affecter les propriétés mécaniques du gel.

Porosité : De nombreuses applications sont basées sur la diffusion de soluté dans un hydrogel.

La porosité du gel (taille des pores du réseau) et les paramètres qui affectent la diffusion d'un soluté dans le gel sont donc des caractéristiques importantes à déterminer.

Il existe différents modèles mathématiques qui modélisent les phénomènes de transports dans un gel. Les chaînes de polymères bloquent ou retardent le mouvement des solutés en réduisant le volume libre moyen disponible :

elles agissent comme une barrière physique et augmentent la longueur du chemin à parcourir [12].

La structure du réseau (taille des pores), la composition du polymère, la nature et la taille des solutés sont autant de paramètres à prendre en compte dans le phénomène de diffusion. Dans le cas de gels à larges pores (supérieurs à la taille des solutés) la diffusion est limitée par la tortuosité du réseau. Lorsque la taille des solutés est de l'ordre de la taille des pores de l'hydrogel, on peut déterminer leur coefficient de diffusion par diverses modélisations dont la forme générale est la suivante :

$$\frac{D_{gel}}{D_{eau}} = f(a, \Phi, \xi)$$

Avec :

D_{eau} : le coefficient de diffusion du soluté dans l'eau pure.

D_{gel} : le coefficient de diffusion du soluté dans l'hydrogel.

a : la taille du soluté

Φ la fraction volumique en polymère dans le gel

ξ la taille caractéristique de la maille du réseau de l'hydrogel [12].

La taille de la maille ξ peut être affectée par plusieurs facteurs incluant : le degré de réticulation du gel, la structure chimique du polymère et l'environnement extérieur (pH, température, force ionique) [12].

III.1.4 Application des hydrogels

III.1.4.1 Applications biomédicales

Les hydrogels copient le comportement des organes humains en réponse aux changements des conditions environnementales telles que le pH, la température, les enzymes et le champ électrique, qui trouvent des applications dans les implants médicaux, les muscles ou organes prothétiques, les pinces robotiques, les appareils de diagnostic des muscles artificiels, la stabilisation des os implants, épaissement intimal chez les animaux et diminution de la thrombose. Les hydrogels utilisés dans les cathéters urinaires peuvent empêcher la colonisation bactérienne à la surface et fournir une surface lisse et glissante pour améliorer sa biocompatibilité. L'une des applications avancées des hydrogels rapportée par Park et al, est leur capacité à convertir des stimuli électrochimiques en travail mécanique (contraction), c'est-à-dire contraction et relaxation réversibles sous des stimuli physico-chimiques pour le développement de muscles artificiels, qui fonctionnent comme le muscle et le tissu humains mais avec un muscle à commande électrique comme des actionneurs[13].

III.1.4.2 Application biotechnologique

Les hydrogels ont été utilisés comme membranes matricielles immédiates dans des capteurs ayant la dureté, l'élasticité, la diffusion sélective d'analyte et les indices de réfraction souhaités. Des hydrogels intelligents ont été utilisés pour concentrer des solutions aqueuses diluées de solutés macromoléculaires, y compris des protéines et des enzymes, sans perturber l'activité de l'enzyme en ajustant la température ou le pH de l'environnement en fonction de la taille et de la charge nette. Les hydrogels intelligents dans les solutions, par gonflement et rétrécissement réversibles en réponse à un petit changement de la situation environnementale, sont également fonctionnels dans les dispositifs de purification. L'immobilisation des adsorbants dans des hydrogels tels que l'agarose et le gel d'alginate de calcium est efficace pour empêcher l'encrassement de

l'adsorbant par des contaminants colloïdaux. En modifiant le comportement de gonflement, il a été rapporté que les hydrogels contrôlent les réactions des substrats avec des enzymes immobilisées[13].

III.1.4.3 Applications pharmaceutiques

Hydrogels à base de PVA

Ses applications courantes incluent l'insuline, l'estomac, le foie, le côlon, l'intestin, le cerveau, le sang, le système nerveux et l'accouchement ciblé sur les tumeurs.

L'administration contrôlée de médicaments est un facteur important pour l'application d'hydrogels dans l'industrie pharmaceutique.

Kim et Lee, ont étudié les billes de l'alcool polyvinylique (PVA) composites pour une administration contrôlée de médicaments avec une structure à double couche avec la conclusion que le temps de libération peut être encore prolongé en augmentant le PVA et son degré de réticulation[13].

Hydrogels à base de PEG – PCL

Les diacrylates de PEG et de PCL pour l'administration contrôlée de médicaments et la régénération tissulaire sont des hydrogels qui présentaient un comportement de gonflement thermosensible négatif en raison de copoly-mères blocs hydrophiles et hydrophobes. Les tests de dégradation in vitro ont montré que la dégradation s'est produite sur une période de 3 à 8 mois.

Par conséquent, en raison de leur biodégradabilité, biocompatibilité, élasticité et fonctionnalité, ces hydrogels conviennent aux applications pharmaceutiques [13].

*Données
expérimentale*

I. Présentation du médicament

I.1 La composition de gel

I.1.1 Principe actif encre de seiche

Description :

Poudre noire, cristalline, pratiquement soluble dans l'eau dont la composition chimique de la poudre de l'encre montre qu'elle est riche en taurine, en hydroxyproline, en acide aspartique, en acide glutamique, en alanine, en leucine, en homarine et en glycinebêtaïne. Elle contient une faible quantité d'oxyde de triméthylamine.

L'encre est fortement concentrée en deux amines : la dopamine et la L dopa (LD), un antioxydant non identifié qui prévient l'oxydation de ces deux amines à leur contact dans l'eau de mer

Divers enzymes mélanogéniques parmi lesquelles la tyrosinase, le dopachrome (rearranging enzyme), la peroxydase et la P mel 17 'protéine'[3].

L'encre de céphalopode consiste en une suspension de granulés de mélanine dans un milieu visqueux incolore. Dans la cavité du manteau, l'encre contient également des protéines, des lipides, des glycosaminoglycanes et divers métaux (cuivre, cadmium)[18]

Il contient également une variété d'enzymes mélanogéniques, dont la tyrosine, qui est une enzyme de réarrangement du dopachrome (Palumbo et al., 1998).[18]



Figure 1.7 : poudre de la poche noire

I.2.1 Les excipients :

➤ Caraghénane

Formule empirique et poids moléculaire

L'USP32 – NF27 décrit le carraghénane comme l'hydrocolloïde obtenu par extraction à l'eau ou à l'alcali aqueux de certains membres de la classe des Rhodophyceae (algues rouges). Il se compose principalement d'esters de sulfate de potassium, de sodium, de calcium, de magnésium et d'ammonium de galactose et de copolymères de 3,6-anhydrogalactose. Ces hexoses sont alternativement liés aux sites a-1,3 et b-1,4 dans le polymère.

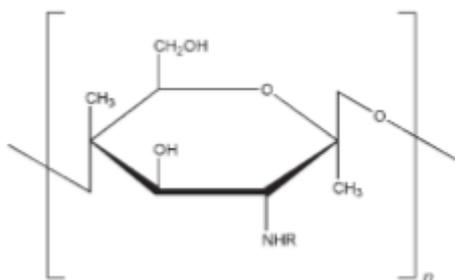
L'i-carraghénane (iota-carraghénane) est un polymère gélifiant contenant environ 32% d'ester sulfate en poids et environ 30% de 3,6anhydrogalactose.[14]

Description

La carraghénane est une poudre de couleur jaune-brun à blanche, grossière à fine, inodore et insipide, soluble dans l'eau chaude à 80°C

➤ Chitosane

Structure chimique



Poly-b- (1,4) -2-amino-2-désoxy-D-glucose [9012-76-4]

Description

Le chitosane se présente sous forme de poudre ou de flocons inodores, blancs ou blanc crème, il est Peu soluble dans l'eau; pratiquement insoluble dans l'éthanol (95%), d'autres solvants organiques et des solutions neutres ou alcalines à un pH supérieur à environ 6,5. Le chitosane se dissout facilement dans des solutions diluées et concentrées de la plupart des substances des acides organiques et dans une certaine mesure dans les acides minéraux inorganiques (à l'exception des acides phosphoriques et sulfuriques) [16]

➤ Gel de lin

Description

Est un gel translucide obtenu par extraction des petites graines brunâtre de forme ovale, cette dernière renferment :
Huile grasse abondante (46%) qui possède le plus fort taux d'acides gras essentiels de la famille des omégas 3 et 6 Protéines (20 à 30%), Fibres solubles (environ 15%), Lignanes (des phytoestrogènes), Mucilage (6 à 10%), formé de glucosanes, galactanes, pentosanes, et de stérols

➤ Eau purifiée

H₂O

M=18.02

L'eau est un liquide clair, incolore, inodore et insipide. Il est largement utilisé comme MP, ingrédient et solvant dans la transformation, la formulation et la fabrication de produits pharmaceutiques, d'ingrédients pharmaceutiques actifs (API) et d'intermédiaires, et de réactifs analytiques. Des qualités spécifiques d'eau sont utilisées pour des applications particulières à des concentrations allant jusqu'à 100%. [16].

I.2 Rôle des excipients

Tableau 1.4 rôle des excipients

Les excipients	Le rôle
Gel de lin	Agent hydratant
Eau purifiée	La phase aqueuse
Chitosane	Conservateur
La gomme carragénane	Agent épaississant ; polymère gélifiant

*Matériel et
méthodes*

II.2 Matériel et méthodes

II.1 Matériel et produits utilisés :

II.1.1 Matériels :

- Balance analytique
- Homogénéisateur
- Tube à essai
- Boite de pétri
- Ecouvillon
- Autoclave
- Incubateur
- Bec Bunsen
- Pissette
- Pipette
- Seringue
- Filtre stérilisant
- disques de papier wattman

II.2 Méthodes utilisées :

II.1.2 Produits utilisés:

- Eau physiologique
- Eau distillé
- Milieu gélosé MH (Meiller Hinton)
- Culture pure
- Souche bactérienne
- Grain de lin
- Chitosane
- La gomme Caraghénane
- Extrait de pamplemousse

II.3 Méthode de fabrication :

II.3.1 Méthode de fabrication de la poudre noire :

II.3.1.1 Protocole de préparation de la poudre noire PFDS :

On récupère la poche de l'encre de la seiche délicatement et attentivement afin d'éviter de la détériorer, en suite, on fait passer l'encre de état liquide à l'état solide dans un congélateur à 4°C pendant 48h, une fois on a eu une masse solide qui est un peu mouillée(humide) ,on essaye d'enlever la fine couche extérieure de la poche , et après en utilisant les mains soigneusement , on la rend en fine poudre puis on la porte dans un endroit propre à l'air libre afin de la sécher et avoir des petits cristaux noirs d'encre de seiche (poudre de l'encre de seiche).

II.4 Méthodes d'analyse :

II.4.1 Evaluation de l'activité antibactérienne :

Bien que les propriétés antibactériennes de l'encre soient documentées dans la littérature, le plus souvent des études sont conduites en solution, il est donc délicat de savoir si l'activité antibactérienne observée est-elle efficace sur les microorganismes de la flore cutanée dans le cadre de développement d'un dispositif hydratant, pansement primaire pour le soin des plaies sèches Il nous est donc apparu important d'évaluer in vitro cette activité dans des conditions bien défini Afin de procéder à une culture bactérienne en milieu solide, nous avons choisi de travailler sur une solution de l'encre de seiche à différents concentration 1000µg/ml ,0.75 µg/ml ,0.5µg/ml et 0.25µg/ml.

Dans cette étude on a choisi la méthode de diffusion sur disque appelé aussi l'antibiogramme pour cela on a fait une comparaison de l'effet de l'encre de seiche avec celui de l'antibiotique Gentamycine qui un effet antibactérien à large spectre, de plus il est utilisé dans la prise en charge de plusieurs spécialités pour le traitement des maladies infectieuses .

Choix de milieu de culture :

Un milieu de culture composé d'un mélange de substrats nutritifs (L'extrait de bœuf et l'hydrolysate acide de caséine fournissent de l'azote, des vitamines, du carbone, des acides aminés, du soufre, amidon et d'autres nutriments essentiels), l'utilisation d'un milieu approprié pour tester la sensibilité des micro-organismes aux sulfamides et au triméthoprim est essentielle. Il s'agit d'un milieu non sélectif, il permet une meilleure diffusion des antibiotiques.

Le milieu de culture qui a été choisi est Mueller Hinton (MH).

II.4.1.2 Souches bactérienne :

Les souches bactériennes utilisées ont été fournis par le l'hôpital CHU benboulaïd de Blida, voir **Tableau2.5**

Tableau 2.5 : Liste des testent des Souches bactériennes.

Souches microbiennes	Nom de la souche	Gram	Référence
Souches de références	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923

II.4.1.3 Technique de l'antibiogramme (diffusion en milieu solide)

L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par [Sacchetti et al.,(2005)]

a) Principe

La méthode consiste à déposer un disque en papier absorbant de 09 mm de diamètre imprégné de la solution à tester la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencée par la suspension microbienne à étudier.

La solution de l'encre diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque .L'effet de l'encre se traduit par la présence d'une zone d'inhibition (ZI) de la croissance microbienne autour du disque, dont le diamètre de la zone d'inhibition est exprimé en millimètre (voir **figure 2.8**).

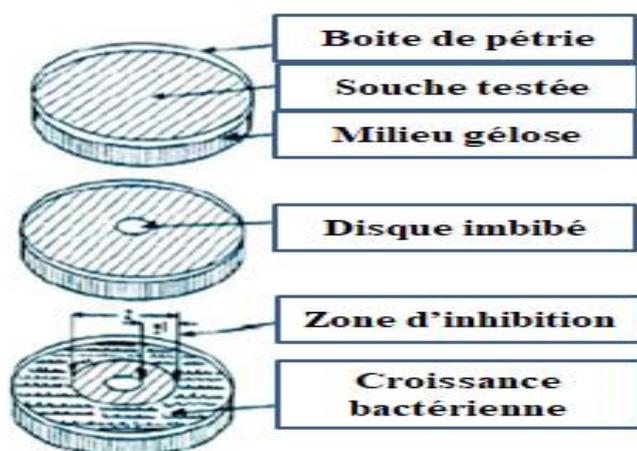


Figure 2.8: illustration de principe de la méthode de diffusion par disque [(zaiki,1988)]

B) Mode opératoire

Tout le matériel utilisé a été stérilisé dans le four à 180 °C pendant 1 h 30 afin de travailler aseptiquement

➤ préparation de milieu de culture

-Solubilisation du milieu gélose de MH (Meiller Hinton) dans un bain marie pendant 20min à 100°C

-Laisser le milieu 5 min à la température du laboratoire (25-28 °C) avant de les faire couler dans des boîtes de Pétri devant le bec bunsen.

➤ Repiquage des souches

A partir de leur milieu de conservation, les bactéries sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller .Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24h à 37°C, afin d'obtenir une culture jeune avec des colonies isolées.

➤ Préparation de la solution de l'encre de seiche :

La solution de l'encre, et 03 échantillons de différentes concentrations ont été préparées avec l'eau distillée, dont les concentrations sont les suivantes : 1000µg/ml ,0.75 µg/ml ,0.5µg/ml et 0.25µg/ml .

Les différentes concentrations préparées à partir de la solution mère (S1) on été filtrées avec des filtres de 0.45 µm(voir figure2.9)



Figure 2.9: filtre seringue CHM

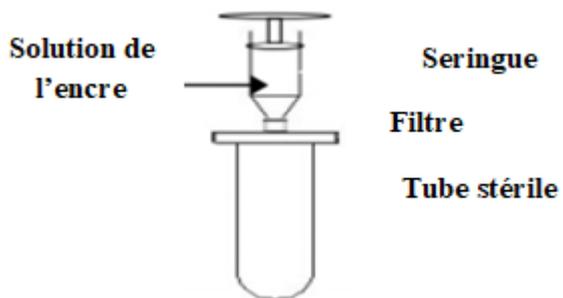


Figure 2.10:Procédure de stérilisation des échantillons à analyser par filtration

➤ Préparation des suspensions microbiennes

- A partir d'une culture jeune de 18 heures prélever à l'aide d'une anse, 03 à 04 colonies bien isolées

- Décharger dans 5ml de l'eau physiologique stérile.

- Bien homogénéiser la suspension microbienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mac Farland.



Figure 2.11 : suspension des souches bactériennes

➤ **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée.
- L'essorer en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Etaler l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur périphérique de la boîte de Pétri.

➤ **Préparation des disques**

Des disques de 9 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120°C°.

- Les disques ont été imbibés par des concentrations variables 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml de solution de l'encre
- A l'aide d'une pince stérile déposer le disque sur la surface de gélose ensemencée.
- Laisser diffuser pendant 30 minutes.



Figure 2.12 : Dépôt des disques

➤ **Incubation**

-L'incubation est faite dans une étuve à 37C° pendant 24 h pour les bactéries.

➤ **Lecture des résultats (Mesure de diamètre)**

La mesure des zones d'inhibition se fait à l'aide d'un pied à coulisse :

-Absence de culture autour du disque : présence d'une activité inhibitrice.

-Présence de culture autour du disque : pas d'effet inhibiteur.

L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne est donnée selon **Mutai et al.,(2009)** dans le **Tableau 2.6**.

Tableau2.6 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés d'extraits étudiés.

Diamètres des ZI (mm)	Transcription	Activité inhibitrice	Sensibilité du germe
ZI ≤ 10 mm	-	Non inhibitrice	Non sensible
10mm ≤ ZI ≤ 16mm	+	Légèrement inhibitrice	Peu sensible
16mm ≤ ZI ≤ 28mm	++	Modérément inhibitrice	Assez sensible
D ≥ 28 mm	+++	Fortement inhibitrice	Très sensible

*Résultats et
discussion*

III. Résultats et discussion :

III.1 Résultat de l'activité antibactérienne

Nous avons étudié *in vivo* le pouvoir antibactérien de l'encre de seiche. Il a été évalué dans cette étude par la technique de diffusion sur gélose (méthodes des disques) vis-à-vis de deux souches bactériennes. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre.

Les résultats présentés dans les figures (3.13 ; 3.14 ;3.15) montrent que les espèces microbiennes étudiées montrent des degrés de sensibilité différente vis-à-vis l'encre étudiées.

III.1.1 Sensibilité aux contrôles

Les résultats du test de sensibilité aux contrôles des souches sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3.7 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition des contrôles utilisés sur les souches étudiées

Souches		Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
		GEN	EAU-D
<i>Bactéries</i>	<i>E. coli</i>	32	00
	<i>S. aureus</i>	30	00

- GEN : Gentamycine
- EAU-D: eau distillée.

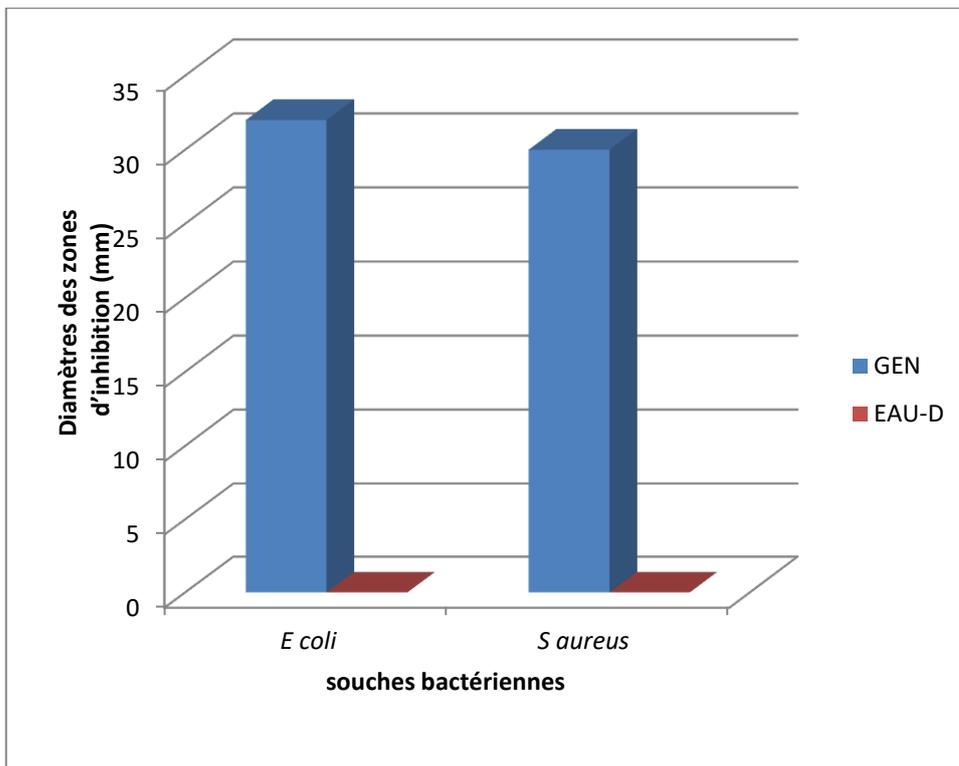


Figure 3.13: Zones d'inhibition de contrôles sur les souches étudiées

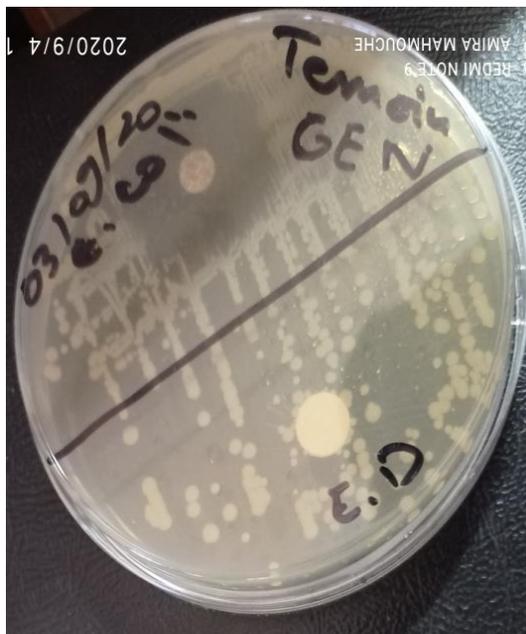


Figure 3.14: la ZI de contrôle sur la souche *E.coli* **Figure 3.15:** la ZI de contrôle sur la souche *S.aureus*

L'analyse des résultats concernant l'effet d'antibiotique Gentamycine sur la croissance des souches montre que la souche Gram négatif *E.coli* est la plus sensible à GEN avec une zone d'inhibition de 32 mm de diamètre (figure3.14). Cependant la souche Gram positif sensible à GEN avec une zone d'inhibition de 30 mm de diamètre (figure3.15). L'eau distillée n'a révélée aucune activité sur les souches étudiées.

III Résultat de l'extrait aqueux de l'encre

Le tableau 8 donne les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux de l'encre avec des concentrations de 1000µg/ml ,0.75 µg/ml ,0.5µg/ml et 0.25µg/ml pour différentes souches.

Tableau 3.8: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches induite par l'encre de seiche liquide

Souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				Sensibilités des souches
	Encre de seiche en µg/ml				
	1000µg/ml	0.75µg/ml	0.5µg/ml	0.25µg/ml	
<i>E. coli</i>	00	12	00	00	Peu sensible
<i>S. aureus</i>	00	00	0	0	Résistante

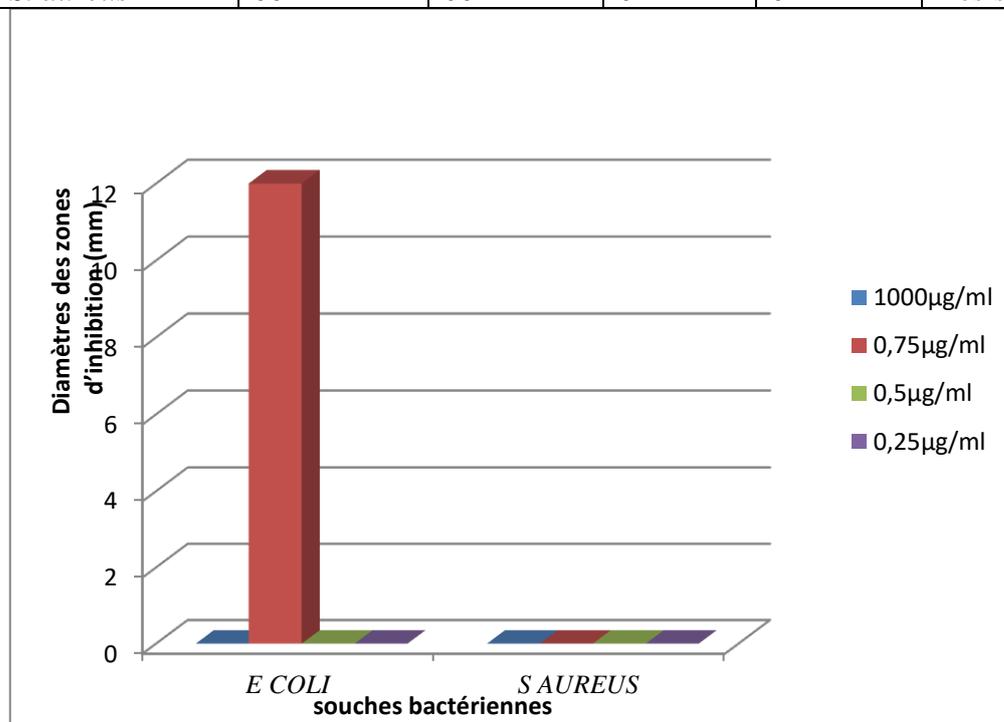


Figure 3.16 : Effet de l'encre de seiche sur les souches étudiées



Figure 3.17: Effet de l'encre de seiche sur la souche *S.aureus* pour différents concentrations



Figure 3.18 : Effet de l'encre de seiche sur la souche *E.Coli* pour différents concentrations

D'après le (tableau 3.8) et la (figure 3.18 ;3.19 ;3.20), on constate que l'encre de seiche (1000 µg/ml;0,5 µg/ml et 0.25µg/ml) n'a exercé aucun effet inhibiteur vis -à-vis des souches testées.

Nous remarquons également que l'encre de seiche à 0.75µg/ml, montre une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de *E.Coli* avec une zone d'inhibition de 12 mm par rapport à celle de témoin gentamicine..

Nous constatons que l'encre de seiche à 0.75 µg/ml présente une activité sur les bactéries à Gram négatif que sur les bactéries à Gram positif étudiés. En particulier elle possède un effet inhibiteur vis-à-vis *E.Coli* tandis que elle n'a aucun effet inhibiteur envers la croissance de la souche bactérienne *staphylococcus aureus* cela peut être due à :

- La méthode d'extraction
- l'homogénéité de la solution et la solubilité
- la quantité de l'encre mise dans les disques pourrait être à l'origine de ces résultats.

L'action de l'encre de seiche, reste inférieure comparée à celle de l'antibiotique testé, ce dernier a réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées, ce qui confirme que la sépia est douée de propriété antibactérienne très appréciée.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par les travaux qui ont été démontré depuis longtemps par [(Mochizuki et al)]

Takai et al ., ont affirmés qu'à la fois la croissance de *staphylococcus epidermis* et *satpyllococcus aureus* est inhibé par les extraits aqueux de l'encre de calmar.

- ❖ Les extraits aqueux de l'encre de seiche ont montré un large spectre d'action antimicrobienne et se sont avérés efficace contre neufs agent pathogènes testés.

Une activité similaire a été observée pour l'extrait aqueux de sépia *pharaounis* contre les bactéries *procteus merabilis* et pour celui de calamar contre *E.coli*

- ❖ L'activité antimicrobienne de l'encre contre différents groupes de microorganismes a été largement étudiée durant les trente dernières années
- ❖ **Sadok et al (2004)** ont démontré le potentiel significatif que possède cette encre contre les bactéries anaérobies particulièrement la flore psychotrope [3].

Synthèse
Bibliographique

Synthèse bibliographique

En 1982, Selon Mimura et al ont trouvés que l'encre de seiche a de fortes propriétés anti-ulcérogènes. Les extraits de mélanine constituent près de 90% de l'encre de seiche et pourraient inhiber la sécrétion gastrique chez le rat. Le poids moléculaire de la protéine mélano contenue dans les fractions actives pourrait être responsable de l'activité anti-ulcérogène, en augmentant l'activité glycoprotéique de la muqueuse gastrique [18].

En 1994, Takaya et coll ont décrit la fraction peptidoglycane antitumorale de l'encre de seiche obtenue à partir d'*Illex argentinus*. Un tampon Tris-HCl (pH 6,8) a été utilisé pour l'extraction et le fractionnement de l'encre pour obtenir la fraction peptidoglycane [18].

En 1979, Mochizouki a rapporté que l'encre de seiche a un effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus* et a des propriétés antiseptiques. L'encre de seiche pharaon, *Sepia pharaonic*, a des effets antibactériens contre les agents pathogènes humains tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *K. pneumonia* et *E. coli*. Dans ces cas, les chercheurs ont découvert que l'encre brute extraite dans l'hexane et l'encre purifiée sur colonne extraite dans l'éther diéthylique présentent des effets inhibiteurs maximaux contre ces agents pathogènes [18].

En 2000, Naraoka et al ont montré que deux composants différents sont responsables de l'activité antitumorale de l'encre de seiche. Ils ont suggéré que l'illexine-peptidoglycane, la tyrosinase et le complexe de ces deux sont responsables de l'activité antitumorale de l'encre de seiche, et la complexité des deux composants a montré l'activité antitumorale la plus élevée contre les cellules tumorales Meth-A des souris BALB / c [18].

En 2002, Nirmale et coll ont suggéré que l'encre lyophilisée et précipitée du calmar indien *Loligo duvauceli* a de bons effets antibactériens. Il a surtout montré de puissants effets antibactériens contre les bactéries à Gram négatif, *Salmonella* spp. *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *Pseudomonas* spp. Cependant, les effets de la bactérie Gram-positive *Staphylococcus* spp. et *Micrococcus* spp. sont plus faibles que les effets contre bactéries à Gram négatif [18].

En 2003, Russo et coll., ont appliqué *S. encre officinalis* sur diverses lignées cellulaires, y compris les cellules PC12 et a constaté qu'il était cytotoxique pour les lignées cellulaires PC12 et pourrait être utilisé dans de futurs médicaments cancérigènes [18].

En 2005, Lin et Chen., ont également isolé mélanine de l'encre de seiche (sépie) et a étudié les propriétés antioxydantes, et ils ont trouvé un antioxydant élevé [18].

En 2006, I. Aloulou et al., ont fait une étude préliminaire du traitement d'effluents contenant de l'encre de seiche par centrifugation et procédés à membranes

Il s'agit d'une étude préliminaire sur le traitement d'effluents de conditionnement de la seiche avant congélation en vue de réduire la charge polluante des rejets et de valoriser l'encre qu'ils contiennent.

Deux types de procédés ont été mis en œuvre : d'une part, la centrifugation, qui permet de fractionner la suspension d'encre de seiche entre un culot noir et un surnageant limpide et, d'autre part, l'ultrafiltration (UF) et la microfiltration (MF).

D'après l'étude de séparation par centrifugation pour raison de diminuer la charge polluante de l'encre de seiche on a pu conclure que la phase soluble est bien que la phase majoritaire qui représente $\frac{3}{4}$ de la matière, dont c'est la phase de surnageant composé de protéine ; lipide possède une couleur jaune claire et après lyophilisation deviendra marron alors que la phase insoluble c'est la phase du culot qui représente une fraction organique avec une couleur noire

Les résultats concluent que le mélange contient en proportion concentré la mélanine on peut conclure que cette couleur intense est due à la présence de la mélanine dans le culot en particulier la Eumélanine [3].

En 2007, Chen et coll., ont retiré la mélanine de l'encre de seiche, et un test d'activité de piégeage des radicaux libres a été effectué sur la mélanine retirée. Ils ont montré ce calmar la mélanine élimine remarquablement les radicaux libres hydroxyles qui sont des indicateurs des propriétés anti oxydantes de mélanine de calmar [18].

En 2008, Lei et coll., ont également découvert les effets antioxydants de l'encre de seiche mélanine-Fe lorsqu'ils l'utilisaient comme traitement de l'anémie ferriprive (IDA) chez le rat [18].

En 2009, Zhong et coll., ont travaillé sur les effets protecteurs de l'encre de seiche en chimiothérapie. Dans l'étude, des souris BALB / c ont été utilisées comme modèles animaux et des blessures ont été induites par le cyclophosphamide. Cette étude a montré

des résultats positifs pour la protection du système hémopoïétique contre les lésions chimiothérapeutiques et a suggéré qu'il pourrait être utilisé pour développer des médicaments de protection cellulaire à utiliser dans le traitement clinique des tumeurs [18].

En 2010, Chen et coll., ont rapporté que les sulfates chimiquement les polysaccharides (SIP) isolés de l'encre de calmar (*Ommastrephes bartrami*) ont une bonne activité antitumorale contre les cellules tumorales HepG2. Les études in vitro et in vivo fournissent une preuve substantielle que les SIP ont des composés potentiels pour la prévention des métastases tumorales [18].

En 2010, Vennila et coll., en 2011, Nithya et al., ont rapporté que l'encre de seiche (*Sepia aculeate*) et l'encre de seiche (*L. duvauceli*) ont des effets antifongiques contre *Fusarium spp.* et les fumigates d'*Aspergillus* [18].

En 2011 Smiline Girija A.S et al., ont étudiés effet antibactérien de l'encre de seiche sur les Beta-lactamases à spectre étendu produisant des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*

La présente étude consiste en une nouvelle thérapeutique à partir de sources naturelles pour empêcher l'émergence et la prolifération de populations microbiennes résistantes qui peuvent avoir un impact significatif dans le traitement des infections microbiennes cliniquement difficiles

La présente étude vise à rapporter l'effet antibactérien de l'encre de seiche contre les souches productrices de BLSE d'*E.coli* et *K.pneumoniae*..

Les résultats concluent que l'extrait à l'hexane de l'encre de seiche a une forte activité antibactérienne contre les souches productrices de BLSE de *E. coli* et *K.pneumoniae*. L'étude actuelle suggère que l'encre de seiche est un pigment énigmatique de valeur thérapeutique dans un proche avenir pour le traitement des terribles infections causées par les souches BLSE.

L'activité antibactérienne potentielle de l'encre de seiche a déjà été rapportée contre les bactéries du biofilm. Il a été démontré qu'une protéine extraite de l'encre de seiche en très faible concentration inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus*.

L'huile de seiche oxydée est connue pour son action antibactérienne.

La tyrosinase, une enzyme présente dans l'encre de seiche, est connue pour jouer un rôle clé dans la défense contre les microbes.

L'encre de seiche constitue le pigment mélanine et le processus de mélanogénèse a été bien expliqué dans la glande d'encre de *Sepia* .

L'encre de seiche est un mélange complexe d'organites, de prémélanosomes, de mélanosomes, de granules, de matière protéique (enzymes), de glucosamine et de phospholipides en suspension. Il a également été démontré que la glande à encre contenait une variété d'enzymes mélanogènes telles que la tyrosinase, la dopachrome tautomérase et la peroxydase.

. Des études scientifiques récentes ont révélé les valeurs conservatrices et antioxydantes de l'encre de *Sepia officinalis*.

L'encre de *Sepiella inermis* a été étudiée pour son activité antirétrovirale. L'étude actuelle consiste à explorer l'activité antibactérienne de l'encre du calmar du sud de l'Inde *Loligo duvauceli* contre les souches productrices de BLSE de *E. coli* et *K.pneumoniae*. [15]

En 2011, Giriji et coll., ont rapporté une nouvelle protéine antimicrobienne, la Lolduvin-s, qui a été isolée de l'encre de calmar indien (*Loligo duvauceli*) et a montré des activités antibactériennes et antifongiques prometteuses contre différents agents pathogènes [18].

En 2012 il a également été rapporté que l'encre de seiche avait de bonnes propriétés antibactériennes contre les souches productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) d'*E. Coli* et de pneumonie à *Klebsiella* [18].

En 2013, Fahmy et Soliman., ont rapporté que l'extrait d'encre de seiche (*Sepia officinalis*) a une activité cytotoxique et peut être utilisé comme médicaments anticancéreux prometteurs, ce qui déterminé selon la méthode à la sulforhodamine B (SRB) contre la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire (HepG2) [18].

En 2013, Fahmy et Soliman., ont enquêté sur la activité antioxydante de l'encre de seiche (*S.officinalis*) extrait utilisant 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) des dosages de piégeage et de peroxydation lipidique et mesurés propriétés antioxydantes prometteuses de l'encre *Sepia* extrait.

En 2014, Diaz et coll., ont évalué l'activité anticancéreuse de l'encre de calmar (*L. duvauceli*). De l'encre de seiche brute et partiellement purifiée a été utilisée sur la lignée cellulaire Hep G2, et des analyses de viabilité cellulaire et de prolifération cellulaire ont été effectuées. Ils ont révélé une bonne activité anti-cancérigène de l'encre *L. duvauceli* partiellement purifiée sur la lignée cellulaire HepG2 [18].

En 2014, Girija et coll., ont révélé que l'extrait d'encre de calmar (*L. duvauceli*) a un potentiel antibactérien contre les agents pathogènes des caries dentaires [18].

En 2014 Derby et al., ont étudié l'activité anti oxydante de l'encre de seiche sur les poulets de chair en croissance poulets en mélangeant de l'encre dans leur alimentation [18].

En 2015, Nicomrat et Tharajak., ont constaté que l'encre de calmar (*L. duvauceli*) et de seiche molle (*Sepioteuthis Lessoniana*) a une forte activité antimicrobienne contre les biofilms provoquant des micro-organismes [18].

En 2015, Soliman et coll., ont constaté que l'extrait d'encre de *S.officinalis* avait des effets anticancéreux contre le carcinome d'ascite d'Ehrlich (EAC) chez des souris albinos suisses. Il a ajouté que l'encre sépia l'extrait inhibe la croissance tumorale dans la tumeur ascite [18].

En 2016, Karim et coll., ont suggéré que les calmars traités avec 0,25% d'encre de seiche présentaient une très faible croissance de bactéries pendant le stockage à 4 ° C [18].

En 2016, Diaz et Thilaga., ont révélé que des extraits d'encre bruts et partiellement purifiés de calmars (*L. duvauceli*) et de seiches (*Sepia pharaonis*) ont des effets antibactériens contre huit souches bactériennes différentes.

Dans la plupart des études, différents types d'échantillons d'encre ont montré des activités antimicrobiennes importantes contre la plupart des bactéries pathogènes qui ont fait de l'encre céphalopode un très bon agent antimicrobien et est donc devenu un objet d'attraction parmi les chercheurs [18].

En 2016 , Smiline Girija AS et Vijayashree Priyadharsini., ont fait dépistage préliminaire de l'effet antibactérien des extraits d'encre de seiche pigmentée contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) [16].

L'extraction brute des biomolécules actives de l'encre de seiche a été effectuée en utilisant la méthode d'extraction par solvant ;utilisant des solvants polaires et non polaires comme l'hexane, l'éther de pétrole, le chloroforme, le butanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol et l'éthanol ensuite ils ont évalués l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion en puits d'agar [16].

L'activité antimicrobienne des extraits bruts contre le SARM a montré que l'extrait d'hexane présentait une taille de zone de 18 mm pour la souche de test de SARM (figure 1), marquant ainsi une activité antibactérienne élevée [16].



Figure 4.19 : Activité antibactérienne des extraits d'encre pigmentée contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

La présente étude vise à évaluer la propriété antibactérienne des extraits d'encre de seiche de *Loligo duvauceli* contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline [SARM].

Les résultats de l'étude indiquent que l'encre de *Loligo duvauceli* constitue des molécules bioactives efficaces contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Une activité élevée est observée avec l'extrait d'hexane contre le SARM avec une bonne valeur CMI et CMB [16].

Une activité antibactérienne prometteuse d'extraits d'encre de seiche a été signalée plus tôt contre les producteurs BLSE de *E. coli* et *K. pneumoniae* [16].

Des extraits d'encre de seiche ont également montré des propriétés antibactériennes contre quatre pathogènes carieux. De plus, nous avons breveté une nouvelle protéine de l'encre de seiche avec un potentiel antimicrobien. Cette présente enquête est un rapport supplémentaire sur l'efficacité de l'extrait d'hexane contre la souche MRSA et pourrait être utilisé dans le futur scénario thérapeutique dans le traitement de terribles infections causées par ce groupe d'agents pathogènes. Cependant, des recherches supplémentaires sur les extraits d'encre de seiche sont en cours concernant la toxicité et les essais sur les animaux [16].

En 2017, Aktivitas Antibakteri dari Melanin Tinta Sotong, Fitriah et al., Ont étudiés l'activité antibactérienne de la mélanine de la seiche et de l'encre de seiche.

Ils ont trouvés que les céphalopodes de classe (tels que les calmars et les seiches) ont une encre qui se distingue par ses défenses.

Cette étude vise à comparer l'activité antibactérienne de la mélanine de l'encre de seiche (*Sepia* sp.) Avec l'encre de seiche (*Loligo* sp.) Contre *E. coli*. Des études d'extraction et de purification ont été menées sur *Sepia* et *Loligo* mélanine en utilisant un traitement à l'acide chlorhydrique 0,5 M. sous mécanique. Les mélanines ont été obtenues et ont évalué leur activité par des méthodes de contact direct entre la mélanine et *E. coli* dans un bouillon nutritif. Le total des microbes a été compté. par nombre total de plaques. Les deux encres ont également été testées leur activité contre *E. coli*. Les résultats ont montré que la mélanine des encres de seiche et de calmar avait une activité inhibitrice à des concentrations de 10 mg / ml et 20 mg / ml, atteignant respectivement 99,99% contre *E. coli*. Les encres des deux céphalopodes à la même concentration que la mélanine ne présentaient pas toute activité inhibitrice contre *E. coli*. La mélanine de *Sepia* sp. ont une activité antibactérienne plus élevée que la mélanine de *Loligo* sp.

La mélanine de la seiche (*Sepia* sp.) Et de l'encre de calmar (*Loligo* sp) a une activité inhibitrice contre *E. coli*. L'activité inhibitrice contre *E. coli* de la mélanine de l'encre de seiche était supérieure à celle de la mélanine du calmar. La seiche et l'encre de seiche à une concentration de 0,013 à 0,020 g / mL n'avaient pas d'activité inhibitrice contre *E. coli* [17].

En 2018 , Hossain, M.P et al., ont étudiés les Propriétés médicinales et thérapeutiques de l'encre céphalopode ils ont trouvés que l'encre de différentes espèces de céphalopodes contient également différentes propriétés nutraceutiques qui sont jetées comme sous-produit par la plupart des industries de transformation et des consommateurs

Ils ont clairement montré que cette encre est une excellente source pour réduire divers problèmes de santé et peut être largement utilisée dans les industries pharmaceutiques et alimentaires [18].

Conclusion

Conclusion

Le présent travail on a porté sur une étude antibactérienne de l'extrait aqueux de l'encre de seiche

Dans un premier temps, l'effet antibactérien basé sur des tests spécifiques a permis de déterminer la zone d'inhibition dont confirmer et prouver la valeur thérapeutique de ce dernier.

On a constaté que l'extrait aqueux de l'encre de seiche à différentes concentrations 1000 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml n'a pas révélé un pouvoir antimicrobien sur la croissance des différentes souches testées « *Staphylococcus aureus* et *E.Coli* ». alors que pour la concentration de 0.75 µg/ml a révélé l'existence d'un pouvoir antimicrobien sur la croissance de la souche testé « *E.coli* ». Ce qui indique que l'encre de seiche possède un effet thérapeutique moyen sur les infections par rapport à celui de la gentamicine témoin.

Cette étude reste préliminaire certes, et de ce fait, ses résultats nécessitent d'être confirmés ou infirmés par des méthodes analytiques performantes, pour déterminer, mettre en valeur l'activité biologique de l'encre dans le domaine, pharmaceutique et médicale.

Il serait intéressant donc de poursuivre ce travail par des perspectives qui consistent en :

- Elargir la gamme des microorganismes testés afin de généraliser l'effet antimicrobien de l'encre à large spectre.
- Déterminer les effets thérapeutiques de cette encre par des études cliniques approfondies comme l'effet antioxydant, anti-inflammatoire qui pourrait enrichir les travaux sur cette encre.

*Références
bibliographiques*

Référence

- [1] : Emna SOUFI-Kechaou « Bioréacteur enzymatique couplé à l'ultrafiltration pour la valorisation des co-produits issus des industries de la pêche. Application à la seiche officinalis »,thèse,2011.(google scholar).
- [2] : A.Loudani.« Etude de l'effet des nanoparticules d'oxyde de Zinc dans l'amélioration des propriétés biologiques d'un hydrogel : application comme film protecteur sur les couches ».thèse 2018/2019
- [3] : I. Aloulou,K.Walha,R.Ben Amar,F. Quemeneur et P. Jaouen « Étude préliminaire du traitement d'effluents contenant de l'encre de seiche par centrifugation et procédés à membranes » Revue des sciences de l'eau , Volume 19, Issue 4, p. 383–392,2006.(google scholar)
- [4] : S. Sadok , A.Abdelmoulah ,A. El Abed « Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus* » . Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, p. 115-122 .(google scholar)
- [5] : H. PACE, A.CHERUEL, E.COLLU, E.DUDOGNON, C.MOUREAU, C.SCHMITT, M.PLESSIS. « Sécurité sanitaire des aliments Tuteur » 2013-2014 .
- [8]: Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, « Caractéristiques et sources d'E. coli entérohémorragiques (EHEC) » Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail,Mai 2019.
- [9] : A.Méllissopoulos,L.Christine « La peau/Structure et physiologie » Lavoisier SAS, Paris,2012.
- [10] : : L.Charletoux « innocuité de la Coblation® dans la cicatrisation des plaies » Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 136 p,2015.(google scholar)
- [11] : EVOLUTION DES PRATIQUES EN PLAIE ET CICATRISATION- C.MAZELLIER - CH de Thiers
- [12] : Leslie Rolland. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2013. Français(google scholar)
- [13] : H.A. Othman , F.B Javed, Z.A Ahmad,Md.Hazizan. Akil « Classification, processing and application of hydrogels: A review Faheem Ullah a , Muhammad Bisyrul ».Journal homepage,volume 57,p414-433,2015(google scholar).
- [14] : Handbook of pharmaceutical excipients,6ème édition, raymond C rowe, paul J sheskey and marian E Quinn.
- [15] : A.S.Smiline Girija, V.J. Priyadharshini, P.K. Suba, P.Hariprasad & R.Raguraman.

« Effet antibactérien de l'encre de seiche sur les BLSE produisant des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* » Indian Journal of Geo-Marine Sciences ; Volume 41, issue 4, 338-343 Août 2012.

[16] : AS. Smiline.Girija & V.J. Priyadharsini « Dépistage préliminaire de l'effet antibactérien des extraits d'encre de seiche pigmentée contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) » Indian Journal of Geo Marine Sciences Volume 47, issue 07, 1441-1445, Juillet 2018.

[17] : Y.Fitrial et IK. Khotimah. Antibacterial Activity of Melanin from Cuttlefish and Squid Ink » Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia, Volume 20, issue 2 , p266-274, 2017.

[18] : M.P.Hossain, M.S.Rabeta, A.T.Husnul « Propriétés médicinales et thérapeutiques de l'encre céphalopode » Journal homepage, volume 3 , issue 3, p 188-198, juin 2019.

Site web :

[6] : <https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/classification>

[7] : https://medecine.univamu.fr/sites/medecine.univamu.fr/files/diplome/bacteries_dr_gouriet.pdf

Annexes

Annexe I

(Photos de quelque appareil et tests biologiques)



Figure 1 : Peser 1000 μ g de la poudre



Figure2 : bain marie



Figure 3: Préparation des boîtes de Pétrie

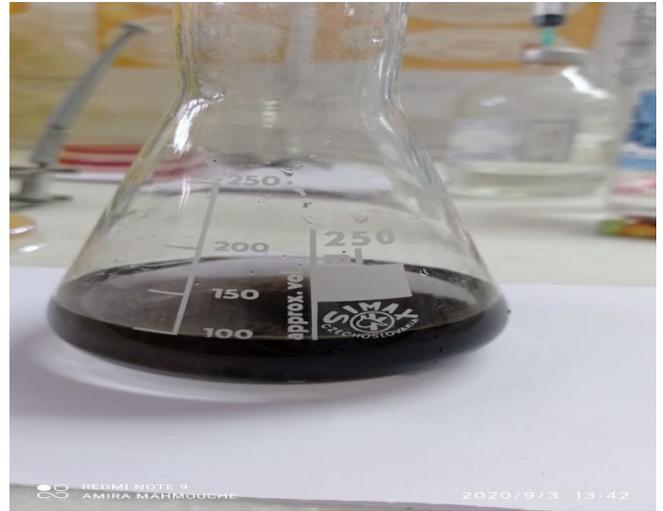


Figure 4 : préparation de la solution mère et les dilutions
-1 solution mère
- 2,3,4 solutions filles à différentes concentrations



Figure 5: souches bactériennes

Annexe II

Préparation des solutions :

Solution mère :

S_0 (solution mère) : 1mg dans 100 ml équivalent de 1000 μ g dans 100ml

Donc :

$$S_0 = \frac{1mg}{100ml} = \frac{1000\mu g}{100ml} = 10 \frac{\mu g}{ml}$$

$S_0 = 10 \mu g/ml$

Solution filles :

Préparation des solutions filles à différentes concentration 0.75 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.25 μ g/ml dans des fiole de 50 ml

- pour une solution de $S_1 = 0.75 \mu g/ml$
- pour un volume de $V_1 = 50 ml$
 - on a : $S_0 V_0 = S_1 V_1$

Donc

$$V_0 = \frac{S_1 V_1}{S_0} = \frac{0.75 \times 50}{10} = 3.75 ml$$

Concentration (μ g/ml)	0.75	0.5	0.25
Volume (ml)	3.75	2.5	1.25