

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكيمياء الحيوية

Mémoire présenté dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275
En vue de l'obtention du diplôme de Master
et diplôme startup –diplôme brevet

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie /Biochimie Appliquée*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Production d'un collyre naturel à base de champignon médicinal souterrain « Bio Care Eye Drops »

Présenté par : BEKKOUCHE Abir

Le 25/09/2023

GUENNICHE Amira

SALHI Maroua

Jury d'évaluation :

Encadreur : BELLIL Ines (Prof – UFMC1).

Président : MOSBAH Asma (Prof - UFMC1).

Examineur : BENOUCHENNE Djamila (MCB - ENSB de Constantine).

Incubateur: KASSAH LAOUAR Mounia (MCB - UFMC1).

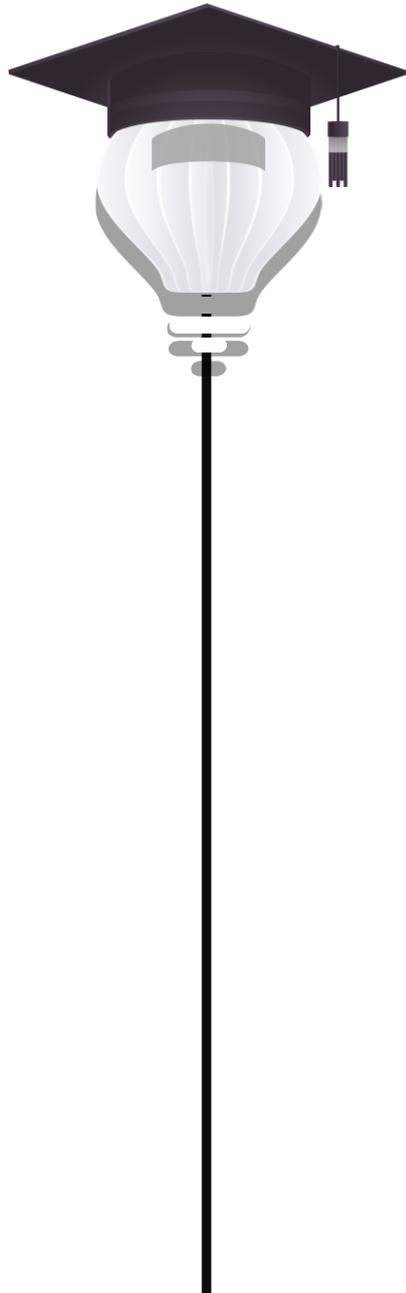
Cati : BETINA Soumeya (MCB - UFMC1).

Sécateur Socioéconomique : ABABSA Zine El Abidine (GMP Pharma).

Année universitaire
2022 - 2023



Remerciement





Remerciements



- ★ *Au terme de cet humble travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout à Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce mémoire. Nos vifs remerciements s'adressent à tous les membres du jury : nous vous remercions vivement le Pr. **MOSBAH Asma** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*
- ★ *Nous remercions notre examinateur Dr. **BENOUCHEENNE Djamilâ** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.*
- ★ *Nous désirons exprimer nos gratitudes à notre encadreur Pr. **BELLIL Inès** pour nous avoir guidées dans la réalisation de ce travail, par sa patience, ses conseils précieux et ses critiques constructives a su nous mettre sur la bonne voie. Nos profonds remerciements s'adressent au roi de l'animalerie Monsieur **BAHRI Laid** pour nous avoir aidé, guidé et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique et pour le bon déroulement de ce travail, sa confiance, ses précieux conseils, sa patience, sa disponibilité.*
- ★ *Nos remerciements à tous nos Professeurs, doctorants, techniciens de laboratoires, camarades de classe et personnels du département de Biologie pour leurs contributions à notre réussite.*
- ★ *Nous remercions nos parents pour le soutien inconditionnel qu'ils ont fait, merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel.*
- ★ *Nous souhaitons aussi remercier nos frères, nos sœurs et nos beaux-frères pour leur accompagnement durant ces deux années et leur soutien sans faille. Nous remercions également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce mémoire.*
- ★ *Enfin, Nous remercions nos amis et camarades de promotion pour ces années passées ensemble, dans les meilleurs moments comme dans les pires.*



Dédicace



Je dédie ce modeste travail :

*À mes chers parents **BEKKOUCHE SAID** et **BELKHIRI ZAHIA**, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*À mes chères sœurs : **Manel, Afaf, Lamis** et **Alaa** pour leurs engagement permanent, leur générosité ainsi que leur soutien moral.*

*À mon cher frère : **Oussama**, pour son soutien et ses conseils précieux.*

*À mes chers neveux et nièces : **Oubaïd, Anes, Bylesan, Roa** et **Iline**, que dieu les protège*

À tout le personnel administratif et technique de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie.



Abir



Dédicace



Alhamdoulou li Allah, qui me donne tout puissant, le courage, la patience d'étudier et suivre le chemin de la science. Avec les sentiments de la plus profonde humilité je dédie ce modeste travail :

*À ma chère mère **Hafiza**, celle qui m'a donné la vie, à la lumière de mon âme, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, merci pour votre présence dans les moments qui m'étaient les plus difficiles.*

*À mon cher père **Mabrouk** qui m'a toujours soutenu, qui a sacrifié sa vie pour notre bien, qui s'est privé de tous pour répondre à nos besoins. Aucun mot ne saurait exprimer tout mon amour, ma gratitude et ma profonde reconnaissance.*

*À mes sœurs chéries **Belkís** et **Rahma** que dieu vous procure santé et bonheur durant toute votre vie. À mon unique adorable petit frère « **Mohamed El Yamine** » qui m'a souvent poussé vers l'avant et avec qui je me décomprime, que dieu te protège mon héros.*

*À mes amies : « **Karima, Anfel, Dhikra, et Roeya** », pour votre fidèle amitié et les moments passés ensemble tout au long de mes études et en dehors. À tous ceux qui utilisent la science pour le bonheur et la prospérité de l'humanité. Je dédie cet humble travail.*



Amira



Dédicace



Avant tout, Mes chaleureuses dédicaces aux personnes qui croient en moi et que je les chérir de m'avoir soutenu durant toutes mes années d'études.

*A mon père « **BACHIR** », qu'il trouve ici ma plus profonde gratitude, mon amour et mes respects A la plus merveilleuse des mères « **Rima** » qui était toujours ma source de soutien et d'inspiration Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de ma soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour profond, que dieu le tout puissant vous protège et vous accorde santé, longue vie et bonheur.

*A ma chère sœur « **OUMAIMA SAFA** » A mon cher frère « **ACHRAF EDDINE** » Pour son soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études que dieu vous protège et vous donne ce que vous souhaitez.*

*A mon chère fiancé « **WASSIM** » qui m'a aidé et soutenue tout au long de ce travail A tout la famille « **SALHI** » et « **ARIBI** » A mon encadreur « **BELLIL INES** » et mon Coencadreur « **BENOUCHEHNE DJAMILA** » pour sa disponibilité, pertinentes et son encouragement A professeur « **BENLABED KADOUR** » et Monsieur « **MEGOUZI ADEM** » qui ont participé à l'élaboration de ce travail et pour leurs nombreux encouragements.*

*A ma meilleure amie « **MIMI** » qui ma beaucoup aidée et soutenue dans les moments difficiles et qui a été près de moi dans les moments de fous rire ou de larmes A tous ceux qui ont offert de l'aide et des conseils A tous ceux qui j'ai omis de citer.*



Maroua



Sommaire



Sommaire

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iv
Introduction générale.....	1

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les truffes

1.Généralités sur les truffes	3
2.Répartition géographique des champignons souterrains	4
2.1. Distribution géographique mondiale.....	5
2.2. Distribution géographique en Algérie.....	5
3.Anatomie structurale du champignon souterrain	5
3.1. Partie reproductrice	5
3.2. Partie végétative ou mycélium	6
4.Valeurs nutritionnelles et thérapeutiques	6
4.1. Composition chimique	6
4.2. Activités biologiques	7

Chapitre II : Oeil humain et sa physiologie

1.Généralités sur le globe oculaire	9
1.1. Introduction	9
1.2. Anatomie de l'œil	9
1.2.1. Enveloppes	9
1.2.2. Milieux transparents	10
2.Anatomophysiologie de la cornée	12
2.1. Introduction	12
2.2. Anatomie de la cornée	13
2.3. Physiologie de la cornée	14
2.3.1. Innervation cornéenne	14
2.3.2. Nutrition cornéenne	14
2.3.3. Transparence cornéenne.....	15

3. Maladies cornéennes	15
3.1. Kératite	15
3.1.1. Kératite bactérienne	15
3.1.2. Kératite herpétique	16
3.2. Ulcère cornéen	18
3.3. Syndrome de cogan	19
3.4. Glaucome	19
3.5. Conjonctivite.....	20

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Echantillonnage	22
2. Préparation de l'extrait	22
2.1. Extraction à froid par macération	22
2.2. Rendement d'extraction	23
3. Analyse qualitative par screening phytochimique des métabolites secondaires	24
3.1. Recherche des flavonoïdes	24
3.2. Recherche des coumarines	24
3.3. Recherche des stérols et stéroïdes	24
3.4. Recherche des tanins	24
3.5. Recherche des triterpènes	24
3.6. Recherche des composés réducteurs	25
3.7. Recherche des saponosides	25
3.8. Recherche des alcaloïdes	25
4. Evaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques des métabolites secondaires de champignon souterrain	26
4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait	26
4.1.1. Méthode de diffusion sur milieu solide	26
5. Évaluation <i>in vivo</i> de l'effet des métabolites secondaires de l'extrait de champignon souterrain	29
5.1. Animaux et les conditions d'hébergement	29
5.2. Produits utilisés	29
5.3. Mode opératoire	30

5.4. Préparation de la suspension bactérienne	30
5.5. Infection oculaire	30
5.6. Système de notation pour l'infection cornéenne bactérienne	33
5.7. Traitement	33

Chapitre IV : Résultats et discussion

1.Résultats d'extraction des substances bioactives par macération dans le méthanol ...	35
2.Analyse qualitative par le <i>Screening</i> phytochimique	36
3.Etude <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne de l'extrait de champignon souterrain ...	38
3.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique	38
3.2. Résultats de l'activité de l'antibiotique avec trois souches bactériennes	42
4.Etude <i>in vivo</i> de l'efficacité de l'extrait de champignon souterrain chez les souris	42
4.1. Résultats de provocation de la kératite bactérienne	43
4.2. Résultats de l'instillation de l'extrait aqueux de champignon souterrain et la ciprofloxacine	43

Conclusion et perspectives	46
---	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

CRL	Contrôle (témoin)
DMSO	DiMéthyleSulfOxyde
D.O	Densité Optique
FeCl3	Chlorure de Fer
GN	Gélose Nutritive
HCl	Chlorure d'hydrogène
H2SO4	Acide Sulfurique
MH	Muller-Hinton
NaOH	Hydroxyde de sodium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PIO	Pression à l'Intérieur de l'Oeil
S/C	Sous Cutané
UFC	Unité Formant Colonie
V/V	Volume/Volume

Liste des figures

Figure 1	Schéma des couches de la choroïde	10
Figure 2	Photographie d'un cristallin humain sain	11
Figure 3	Schéma en coupe de l'œil humain	12
Figure 4	Présentation de la cornée de l'œil humain	13
Figure 5	Structure de la cornée	13
Figure 6	Kératite bactérienne	16
Figure 7	Une kératite épithéliale herpétique	17
Figure 8	Pathogénèse de la kératite herpétique stromale	18
Figure 9	Un ulcère cornéen bactérien opaque	19
Figure 10	Différence entre un œil normal et un œil atteint de glaucome	20
Figure 11	Types de conjonctivite	21
Figure 12	Différentes étapes de la préparation du matériel végétal	22
Figure 13	Protocole d'extraction par macération dans le méthanol	23
Figure 14	Préparation des dilutions de l'extrait dans le diméthylesulfoxyde	27
Figure 15	Ensemencement des souches bactériennes dans la gélose MH	28
Figure 16	Anesthésie locale par une injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg)	31
Figure 17	Anesthésie locale par une injection S/C de quelques gouttes de lidocaïne à 1%	31
Figure 18	Blessure cornéenne et le grattage à l'aide d'une aiguille de calibre stérile	32

Figure 19	Application locale de la suspension bactérienne sur la surface cornéenne	32
Figure 20	Traitement des souris par voie topique avec quelques gouttes de l'extrait aqueux de champignon souterrain	34
Figure 21	Aspect de l'extrait obtenu par l'extraction par macération	35
Figure 22	Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait brut obtenu par méthode de macération	39
Figure 23	Diamètres d'inhibition de l'extrait de champignon souterrain sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	39
Figure 24	Diamètres d'inhibition de l'extrait de champignon souterrain sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	40
Figure 25	Diamètres d'inhibition de l'extrait de champignon souterrain sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	40
Figure 26	Œil de souris infecté par la souche <i>Staphylococcus aureus</i> (24h après l'infection)	43
Figure 27	Chronologie de l'évolution de la kératite traitée avec l'extrait aqueux de champignon souterrain et le médicament de référence	44

Liste de tableaux

Tableau 1	Diversité des espèces du genre <i>Helianthemum</i> , plantes hôtes des terfez	3
Tableau 2	Composition chimique des champignons souterrains	7
Tableau 3	Volumes d'eau et d'extraits utilisés pour le test des saponosides	25
Tableau 4	Différentes souches bactériennes utilisées dans l'activité antibactérienne	26
Tableau 5	Système de notation pour les infections cornéennes bactériennes	33
Tableau 6	Rendement, aspect et couleur de l'extrait hydro-méthanolique de ce champignon obtenu par macération.	36
Tableau 7	Résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait de champignon souterrain	37
Tableau 8	Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique comme témoin positif et de l'extrait brut de champignon souterrain (200 mg/ml).	42
Tableau 9	Effet de l'extrait aqueux de champignon souterrain sur l'évolution des attributs de la kératite induite par <i>Staphylococcus aureus</i> .	44



Introduction générale



La cornée, en tant que composant clé de l'œil, est sujette à diverses maladies qui peuvent compromettre la vision. Parmi celles-ci, on trouve la kératite et l'ulcère cornéen... etc.

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes et les champignons qui poussent autour de lui pour se nourrir et se soigner. Durant des siècles, nos ancêtres ont accumulé un véritable savoir sur les vertus médicinales des plantes et champignons.

La phytochimie est la science qui étudie la composition chimique des métabolites secondaires produits, elle étudie leurs structures, leurs synthèses et leurs mécanismes d'action dans les cellules hôtes (**Egbuna et al., 2018**). Elle est très répandue aujourd'hui à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes et champignons ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologique constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques, pour un objectif majeur, d'éviter l'utilisation des médicaments synthétiques qui ont des effets secondaires non négligeables sur la santé humaine (**Karimi et al., 2015**).

L'utilisation excessive et inappropriée de collyres chimiques peut contribuer au développement de diverses maladies oculaires. Les produits chimiques présents dans ces collyres, bien qu'ils puissent initialement soulager certains symptômes, peuvent à long terme causer des dommages à la santé oculaire. Par exemple, l'utilisation prolongée de collyres vasoconstricteurs conçus pour réduire la rougeur des yeux peut entraîner une dépendance, provoquant une augmentation de la rougeur et de l'irritation lors de l'arrêt de l'utilisation. De plus, des collyres contenant des corticostéroïdes peuvent supprimer temporairement l'inflammation, mais une utilisation prolongée peut affaiblir la structure de l'œil et augmenter le risque de développer des infections oculaires, des cataractes et d'autres complications.

Les plantes médicinales et champignons médicinaux constituent un réservoir important inépuisable de biomolécules présentant des vertus thérapeutiques variées. Ils contiennent une grande diversité de biomolécules très intéressantes pour le développement de médicaments contre diverses cibles pharmacologiques. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels (**Govindoppa, 2015**).

Les champignons médicinaux, notamment les truffes qui sont dotés de propriétés pharmacologiques et thérapeutiques sont aussi très importants et ont été largement utilisés pour se soigner de différentes pathologies. Il s'agit d'une richesse spécifique sur le plan phytochimique et propriétés biologiques surtout que les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches pour de nouveaux constituants naturels.

Selon l'OMS environ 80% de la population mondiale compte toujours sur l'utilisation des plantes médicinales et champignons médicinaux comme un premier traitement. Les substances naturelles constituent la source principale, représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons.

L'Algérie, à l'instar de nombreux pays du monde, recèle un patrimoine floristique important qu'il soit utile d'explorer et de valoriser en utilisant les substances bioactives issues du métabolisme secondaire des plantes ou champignons (**Taleb-Toudert, 2015**). Le champignon souterrain, est une espèce rare et endémique en Algérie. Connue sous différents noms vernaculaires, cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle comme cicatrisant, antimicrobien et antioxydant.

Le but de ce travail est l'étude phytochimique, les activités biologiques et l'effet thérapeutique des truffes brunes (truffes) prélevées dans la région semi-aride steppique (Djelfa) afin de montrer son effet dans le traitement des infections oculaires.

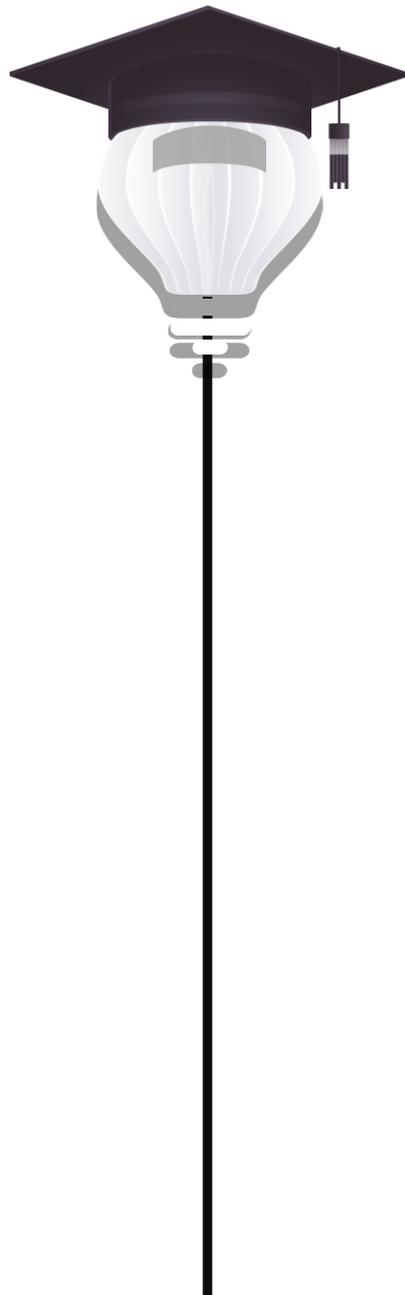
Les objectifs spécifiques étant : i) d'analyser qualitativement la composition phytochimique, ii) d'évaluer les activités biologiques *in-vitro* et *in vivo* de l'effet thérapeutique dudit champignon.

Ce travail se divise en deux parties ; la première est une synthèse bibliographique qui regroupe deux chapitres, dont le premier concerne la phytothérapie et le champignon souterrain, la seconde porte sur l'œil humain et sa physiologie.

La deuxième partie est dédiée à la présentation du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction, la caractérisation de l'extrait, la recherche de l'activité antimicrobienne et des tests *in vivo*, suivie des résultats des différents tests effectués ainsi que leurs interprétations et une conclusion générale.



Partie bibliographique





Chapitre I

*Généralités sur le champignon
médicinal souterrain*



1. Généralités sur les truffes

La truffe, également appelée diamant noire (**Tang et al., 2008**) est un champignon souterrain classé dans la catégorie des ascomycètes hypogés et mycorrhiziens, elle pousse en symbiose avec les racines des plantes annuelles de la famille des Cistacées et plus particulièrement avec des Hélianthèmes (**Liu et al., 2008**), nécessitant des conditions bien particulières pour se développer : un terrain calcaire sec, un climat bien marqué ainsi qu'une bonne exposition au soleil (**Tableau 1**)

Tableau 1 : Diversité des espèces du genre *Helianthemum*, plantes hôtes des terfez.

Pays	Plante-hôte	Références
Algérie	<i>Helianthemumguttatum</i> , <i>H. lippii</i> , <i>H. aegyptiacum</i> , <i>H. salicifolium</i>	Fortas, (1990) ; Fortas et Chevalier, (1992b).
Koweït	<i>H. ledifolium</i> , <i>H. salicifolium</i>	Awameh et Alsheikh., (1979b); Alsheikh et Trapp., (1983).
Tunisie	<i>H. salicifolium</i> , <i>H. lippii</i> var.	Slamaet al., (2006).
Maroc	<i>H. apertum</i> , <i>H. guttatum</i> , <i>H. hirtum</i> , <i>H. lippii</i> , <i>H. Macrosepalum</i>	Khabar et al., (2001); Khabar, (2002); Khabaret Nadjim, (2004).

En ce que concerne les caractéristiques physique, les truffes ont une forme d'un tubercule globuleux, un peu irrégulier, en raison de la conformité du terrain qui l'arbite (**Riousset et al., 2001**), rugueux au toucher tandis que l'aspect intérieur est compact et plus molle, dont la grosseur varie de la taille de celle d'une noisette à celle du poing.

Le premier terme utilisé pour désigner la truffe est le mot terraetufule, ce terme provient de la similarité physique entre la truffe et le tuf qui est une pierre poreuse typique de l'Italie centrale. Par la suite, ce nom fut transformé en « tertufole » en Italie, « truffe » en France et «truffle» en Angleterre (**Bradai, 2014**), la plupart sont du genre *Tuber* (**Dennouni, 1996**).

En arabe, le terme de la truffe est connu sous le nom AI-Kamah ou AI-Fag'a (**Bokhary et al., 1987**). Le terme "Al-Faga'a" réfère au craquèlement du sol, alors que le nom "Al-Kamah" veut dire couvert ou caché (**Shavit, 2008**).

En Algérie, Maroc et Tunisie, ces diverses espèces sont appelées « Terfass, Terfez, Torfez et Kam'a » (**Kagan-Zur et al., 2013**), principalement sont du genre *Terfezia* et *Tirmania* (**Dennouni, 1996**). D'autres noms sont également attribués aux truffes du désert dans le moyen orient comme : « Nabat Al-Radh », « Asqal », « Bidat El-Ardh », « Afateeh », et « Banat Ober » (**Mandeel et Al-Laith, 2007**).

On distingue deux types de truffe :

1. Les truffes du genre *Tuber* (**Laessoe et Hansen, 2007**) qui se développent sous des climats tempérés qui présentent une alternance de saisons (**Bradai, 2014**).
2. Les truffes du désert des genres : *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa* (**Fortas, 1990 ; Fortas et Chevalier, 1992 ; Zitouni-Haouar et al., 2015**), qui se développent dans les déserts chauds et se produisent après la chute des pluies qui annoncent la fin de l'hiver et le début de la saison chaudes (**Bradai et al., 2015**).

D'une part, les truffes sont très appréciées comme l'une des formes les plus anciennes de la nourriture (**Abdul Majid et al., 2016**).

Selon (**Abdul Majid et al., 2016 ; Hamza et al., 2013**), les truffes sont utilisées comme un substitut de viande et consommées en grandes quantités en raison de leur valeur nutritionnelle, de leur arôme et saveur musqués et de leur goût très savoureux. Elles ont un profil nutritionnel unique d'acide gras insaturé, des vitamines, des minéraux et des protéines (**Abdul Majid et al., 2016**).

2. Répartition géographique des truffes

Les champignons souterrains vivent dans plusieurs continents où ils jouent un rôle de partenaires mycorhizes des plantes. La spécificité vis-à-vis de l'hôte symbiotique et le pH (acide ou basique) du sol sont deux facteurs qui jouent un rôle clé dans les répartitions géographiques et la différenciation des espèces de ces champignons (**Diez et al., 2002**).

2.1. Distribution géographique mondiale

Les champignons souterrains sont répartis essentiellement sur le pourtour du Bassin méditerranéen et dans les zones arides sèches du Moyen Orient : en Afrique du Nord

(Maghreb...), dans le sud de l'Europe (France, Portugal...), approximativement entre le 28^{ème} et le 45^{ème} degré de latitude Nord (**Sadat, 1994**).

Certaines espèces se trouvent dans d'autres régions du monde telles que les États-Unis, la Chine, le Japon, l'Afrique du Sud et le Mexique (**Trappe et al., 2008, 2010 ; Kovacs et al., 2008 ; Kagan-Zur et Roth-Bejerno, 2008 ; Vazquez Garcia et al., 2002**).

2.2. Distribution géographique en Algérie

En Algérie, on trouve le champignon souterrain poussant dans trois régions (**Alsheikh et Trappe, 1983 ; Alsheikh, 1994 ; Fortas, 1990**) :

- Dans les régions semi –arides du littoral : Mostaganem, Annaba, Taref.
- Dans les régions semi- arides steppiques : Batna, Msila, Biskra, Djelfa, El- Aricha, Saida, Naama, El-Bayadh.
- Dans les régions sahariennes : Bechar, Tindouf, Ouargla, Tamanrasset, Timimoun, Touggourt.

3. Anatomie structurale du champignon souterrain

Il est composé de deux parties qui sont :

3.1. Partie reproductrice

Ce champignon souterrain est de fructification hypogée appelée ascocarpe ou ascome qui présente la partie comestible et la forme sexuée de ce champignon. Les ascocarpes sont de forme arrondie ou irrégulière selon les espèces et la dureté du sol, et de couleur qui varie du blanc jaune au brun foncé jusqu'à noir (**Trappe et al., 2010**).

- Ils contiennent une masse interne ou gléba (chaire), c'est la partie centrale de texture spongieuse à solide. Elle présente des îlots fertiles arrondis en forme de nodules séparés par des veines stériles dessinant un réseau contenant dans les poches fertiles des petits sacs appelés asques qui renferment de quatre, six ou huit ascospores par asque (**Janex-Favre et al., 1988 ; Trappe et al., 2010 ; Bradai et al., 2014**).

Le gléba est protégé à l'extérieur par une enveloppe rigide appelé périidium qui lui assure la protection contre la dessiccation et lui donne une excellente résistance à la sécheresse (**Callot et al., 1999 ; Ricard et al., 2003**).

3.2. Partie végétative ou mycélium

C'est la partie non comestible, très discrète et c'est elle qui forme des mycorhizes avec les racines de la plante hôte (**Ricard et al., 2003**). Elle est formée de l'ensemble des filaments, appelés hyphes, constituant un même organisme les filaments mycéliens s'organisent pour constituer des structures plus complexes ; Mycorhize, stroma et ascocarpe (**Ricard et al., 2003**).

4. Valeurs nutritionnelles et thérapeutiques

4.1. Composition chimique

Les compositions chimiques d'une même espèce de champignon souterrain diffèrent selon leur région de récolte. Cette diversité est probablement due aux nombreux facteurs environnementaux tels que la quantité de pluie, le temps, les types de sols et les changements climatiques.

En général, les champignons souterrains représentent une source nutritive non négligeable par leur richesse en glucides, en acides gras et en protéines, avec un contenu important d'acides aminés, notamment la méthionine, la cystéine et la lysine (**Kagan-Zur et Roth-Bejerano., 2008**). Ils contiennent 70 % d'eau, 16-22 % de fibres et des vitamines (2-5 % d'acide ascorbique) (**Hussain et Al-Ruqaie, 1999 ; Khabar, 2002 ; Khabar et al., 2004 ; Shavit, 2008**). Ils sont également riches en minéraux tels que le phosphore, le calcium, le magnésium, le potassium, le sodium, le fer, le zinc, le soufre, le chlore et le silicium (**Dundar et al., 2012**) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Composition chimique des champignons souterrains.

Composé chimique	Quantité	Références
Eau	70% (de matière fraîche)	Saritha et al., (2016)
Protéines	20-27% (de matière sèche)	Kagan-Zur et Roth-Bejerano, (2008)
Lipides totaux	3-7,5% (de matière sèche)	
Glucides totaux	60-66% (de matière sèche)	

Fibres	16-22 % (de matière sèche)	Morte et al., (2008)
--------	----------------------------	-----------------------------

Ainsi que, ces constituants chimiques de ce champignon sont considérés comme responsables de leur arôme et leur goût typique (**Costa et al., 2014**).

4.2. Activités biologiques

Outre leur valeur nutritive, les champignons souterrains sont utilisés depuis longtemps en médecine traditionnelle par les populations autochtones d’Afrique du Nord et du Moyen Orient (**Shavit et Shavit, 2014**) en particulier les bédouins et les nomades du désert qui les emploient pour traiter les infections oculaires, les rhumes, les affections respiratoires, l’arthrite ou le rhumatisme (**Volpato et al., 2013**).

Pendant de nombreux siècles, les champignons médicinaux ont été considérés comme une source traditionnelle de composés bioactifs naturels et ont été ciblés comme agents hypoglycémiantes et antidiabétiques potentiels.

C’est ainsi que de nombreux chercheurs se sont intéressés aux activités biologiques de ces champignons. Différents travaux ont montré que les extraits de ces champignons possèdent une activité antibactérienne sur diverses bactéries pathogènes Gram- et Gram+ (**Mohamed-Benkada, 1999 ; Janakat et al., 2004 ; 2005 ; Neggaz, 2010**).

Les champignons souterrains présentent des caractéristiques biologiques inhabituelles (**Kagan-Zur et Roht-Bejerano, 2008**), et sont utilisés comme des médicaments (**El Enshasy et al., 2013**) grâce à la présence des principaux types de composés bioactifs qui possèdent un large éventail d’effets thérapeutique (**Badalyan, 2012**).

Les champignons souterrains contiennent des antioxydants, ces derniers protègent le corps humain des dommages du stress oxydatif induit par la formation des radicaux libres (**Dahham et al., 2016**). D’autres travaux ont également montré que les extraits de ces champignons ont des propriétés hépato protectrices (**Janakat et Nassar, 2010**), anticancéreuses (**Mekawey, 2015 ; Dahham et al., 2016**) et aphrodisiaques (**Khojasteh et al., 2013 ; AL-Damegh, 2014**).

حَدَّثَنَا أَبُو نُعَيْمٍ حَدَّثَنَا سُفْيَانُ عَنْ عَبْدِ الْمَلِكِ عَنْ عَمْرِو بْنِ حُرَيْثٍ عَنْ سَعِيدِ بْنِ زَيْدٍ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ قَالَ قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ: الْكُمَاةُ مِنَ الْمَنِّ وَمَاؤُهَا شِفَاءٌ لِلْعَيْنِ.

وروى الترمذي عن أبي هريرة أن أناس من أصحاب النبي صلى الله عليه وسلم قالوا: الكمأة جذري الأرض، فقال النبي صلى الله عليه وسلم الكمأة من المن وماءها شفاء للعين والعجوة من الجنة وهي شفاء من السم). وهو حديث حسن. وقد أخرج الترمذي في جامعه بسند صحيح أن أبا هريرة قال: (أخذت ثلاثة أكمؤ أو خمسا أو سبعا فعصرتهن فجعلت ماءهن في قارورة فكلت بها جارية لي فبرئت).

Chapitre II

*L'œil humain et sa
physiologie*



1. Généralités sur le globe oculaire

1.1. Introduction

L'œil est l'un des organes les plus développés du corps humain. C'est le principal organe du système visuel, capable de transformer les rayons lumineux au niveau de la rétine en influx nerveux, qui sont transmis au cortex visuel par des voies optiques. La vision humaine est la plus importante source d'informations du cerveau sur le monde extérieur : environ 70 % des informations proviennent de la vision (**Semaha, 2020**).

1.2. Anatomie de l'œil

1.2.1. Enveloppes

L'œil est constitué de trois membranes (**Figure 01**).

1) **Membrane externe ou coque cornéo sclérale** ; constituée de :

- a) **Cornée** : c'est la partie externe transparente du globe oculaire. En forme de lentille, il dépasse légèrement et est le premier organe à réfracter la lumière (**Semaha, 2020**).
- b) **Sclère** : également appelée lesclérotique, correspond au « blanc » de l'œil. C'est un capuchon fibreux riche en collagène qui soutient la structure de l'œil (**Crotti, 2011**).

2) **Membrane intermédiaire : Uvée** ; constituée de :

- a) **Iris** : correspond à la partie colorée de l'œil, c'est une membrane vascularisée (**Crotti, 2011**) en forme de disque perforé en son centre d'un orifice circulaire (la pupille) (**Coquerel, 2013**). Il joue le rôle d'un diaphragme qui réagit aux variations d'intensité lumineuse (**Crotti, 2011**).
- b) **Corps ciliaire** : représente la partie intermédiaire épaisse de l'uvée sous la forme d'un anneau saillant à l'intérieur de l'œil (**Vermuso, 2018**). Sa longueur antéropostérieure est de 4,6 mm à 5,2 mm en nasal et de 5,6 à 6,3 mm en temporal (**Hairston et al., 1997 ; Aiello et al., 1992 ; Vermuso, 2018**).
- c) **Choroïde** : c'est une couche conjonctive épaisse appartient à l'uvée se situe sous la sclérotique (**Semaha, 2020**) (**Figure 07**). Elle agit comme un système vasculaire et nerveux très dense, riche en cellules pigmentées (**Regatieri et al., 2012 ; Decoste, 2022**) sa fonction principale est d'alimenter la couche externe de la rétine (**Crotti, 2011**).

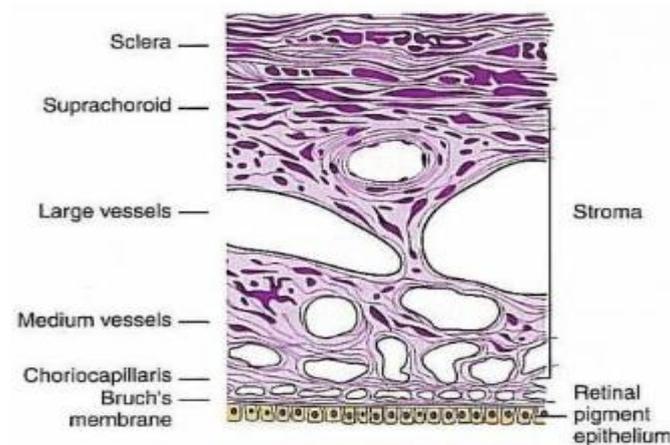


Figure 01. Schéma des couches de la choroïde (Nickla et Wallman, 2010).

3) Membrane interne : Rétine

→ **Rétine** : La tunique profonde de l'œil, la rétine qui est la partie sensorielle du globe oculaire (Crotti, 2011), composée de l'épithélium pigmentaire rétinien en face externe et de la rétine neurosensorielle en face interne (Coquerel, 2013). Elle est composée de six types de cellules nerveuses hautement spécialisées, parmi ces cellules : les photorécepteurs (Crotti, 2011) qui sont destinées à recevoir les stimulations lumineuses et à les transmettre au cerveau par l'intermédiaire du nerf optique (Bernard, 1997 ; Coquerel, 2013).

1.2.2. Milieux transparents

Trois membranes renferment trois milieux transparents formant une lentille convergente.

a) Humeur aqueuse : c'est un liquide transparent à faible viscosité (Crotti, 2011) qui amène oxygène et nutriments au cristallin et à la cornée (Coquerel, 2013). Elle remplit la chambre postérieure puis gagne la chambre antérieure, l'espace entre la cornée et le cristallin (Semaha, 2020).

b) Cristallin : Lentille transparente biconvexe non vascularisé (Figure 02) située derrière l'iris et contrôlée par le muscle ciliaire (Crotti, 2011). Sa structure lui permet de détourner les rayons

lumineux vers la rétine. Sa partie antérieure est en contact direct avec l'humeur aqueuse, et sa partie postérieure est en contact avec l'humeur vitrée (Semaha, 2020).



Figure 02. Photographie d'un cristallin humain sain (Crotti, 2011).

c) **Humeur vitrée** : on l'appelle aussi le corps vitré, est de consistance gélatineuse transparente, située entre la partie postérieure du cristallin et la rétine (Bévalot, 2014). Le vitré remplit le globe oculaire et représente 90 % du volume de l'œil (Coquerel, 2013), le corps vitré contribue le maintien de la rétine en place ainsi que la forme sphérique et la rigidité du globe oculaire (Semaha, 2020).

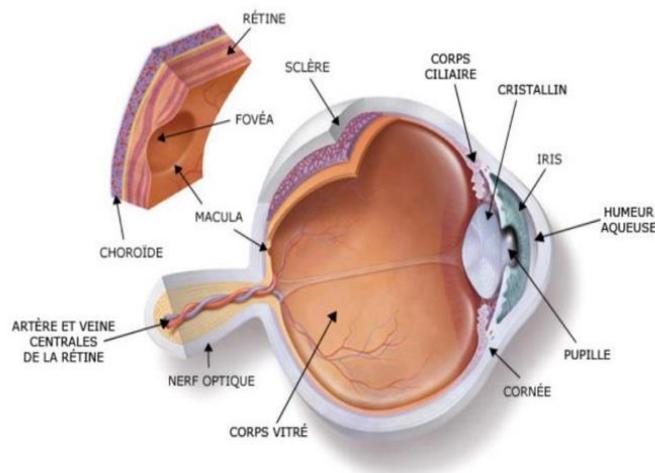


Figure 03. Schéma en coupe de l'œil humain (Semaha, 2020).

2. Anatomophysiologie de la cornée

2.1. Introduction

La cornée et la sclérotique constituent l'enveloppe externe du globe oculaire. La cornée est un tissu transparent, avasculaire, située sur la partie antérieure de l'œil, agissant comme une barrière structurelle et protégeant l'œil contre les infections. Avec le film lacrymal, il fournit une surface réfractive antérieure appropriée pour l'œil et contribue aux deux tiers du pouvoir de réfraction de l'œil (**Partha H, Brinda Haren S, 2021**).

Elle est irrégulièrement asphérique avec une portion nasale plus plate que la portion temporale, et mesure 11- 12 mm horizontalement et 10-11mm verticalement (**Chiambaretta F et al., 2000**) (**Figure 04**). Sa partie antérieure est lisse et convexe, et sa face postérieure est concave. Cette dernière baigne dans l'humeur aqueuse et représente la paroi antérieure de la chambre antérieure de l'œil. La courbure de la cornée varie en fonction de la localisation car en effet le rayon de 8 courbures est inférieur au centre qu'à la périphérie. Son épaisseur varie également en fonction de la localisation : elle mesure environ 550 m d'épaisseur en son centre et augmente vers la périphérie à environ 700 m. L'épaisseur cornéenne est mesurée par la pachymétrie optique ou ultrasonique. Elle est recouverte par le film lacrymal qui est en contact avec l'environnement extérieur.

En périphérie de celle-ci, se trouve un tissu très vascularisé et riche en cellules souches : le limbe (**Horacio M, María Fernanda Suárez, 2019**).

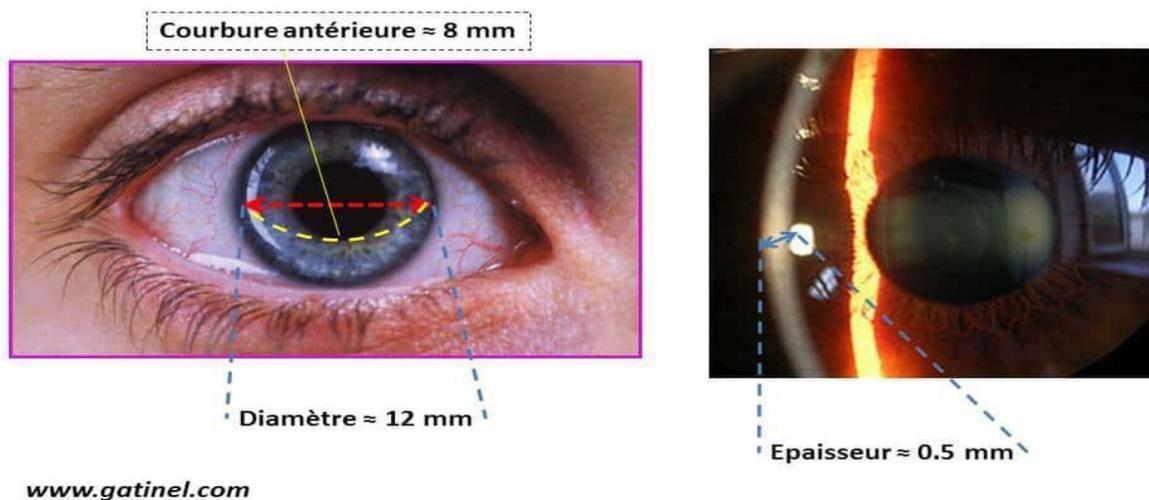


Figure 04. Présentation de la cornée de l'oeil humain

2.2. Anatomie de la cornée

La cornée se compose de cinq strates qui sont, de la plus externe à la plus interne : L'épithélium pavimenteux, la couche de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet et les cellules endothéliales (**Muraine M, Gueudry J, 2015**) (**Figure 05**).

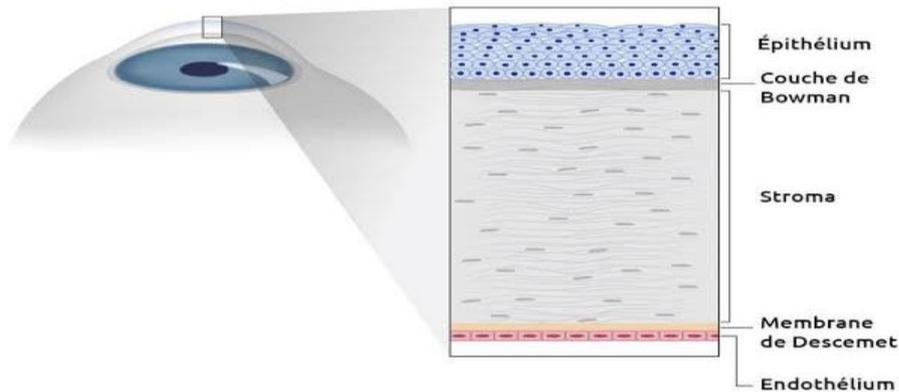


Figure 05. Structure de la cornée (**Damien G, 2014**)

2.3. Physiologie de la cornée

2.3.1. Innervation cornéenne

La cornée, le tissu le plus richement innervé du corps humain (**Muraine et al., 2015**), est innervée de façon sensitive par la branche ophtalmique afférente du ganglion trigéminal à travers les nerfs ciliaires longs et courts (**Rocher Frédéric, 2016**).

Elle comporte environ 70 à 80 faisceaux nerveux qui contiennent 900 à 1500 axones, avec des terminaisons nerveuses sensibles situées dans toutes les couches de l'épithélium et au niveau stroma antérieur et moyen au contact des kératocytes (**Rocher Frédéric, 2016**).

Cette innervation permet de déclencher le réflexe cornéopalpébral qui assure une fonction trophique sur l'épithélium. Les récepteurs sensitifs cornéens sont principalement des nocicepteurs polymodaux (70%) qui répondent à des stimulations mécaniques, thermiques ou chimiques (**Steen et al., 1993**).

Cependant, il existe également deux autres types de récepteurs : les mécanonocicepteurs (20%) qui déclenchent une sensation douloureuse après stimulation mécanique de la cornée

(Belmonte et al., 1981), et les récepteurs au froid (10%) qui sont impliqués dans le réflexe de clignement spontané déclenché par le refroidissement lié à l'évaporation du film lacrymal **(Acosta et al., 2001)**.

En ce qui concerne l'innervation sympathique adrénergique, elle dépend du ganglion cervical supérieur homolatéral et s'intègre aux nerfs ciliaires (courts et longs) ainsi qu'au nerf nasociliaire. La stimulation sympathique inhibe la cicatrisation épithéliale **(Rocher Frédéric, 2016)**.

2.3.2. Nutrition cornéenne

La cornée est dépourvue de vaisseaux sanguins, elle reçoit son apport nutritif de l'humeur aqueuse, du limbe et des larmes.

Le glucose et la plupart des nutriments sont apportés essentiellement par l'humeur aqueuse et accessoirement par le film lacrymal et les vaisseaux limbiques. On parle de voie transendothéliale pour le passage des éléments à partir de l'humeur aqueuse **(V. Borderie et al., 2005)**.

En revanche l'oxygène provient essentiellement du film lacrymal et secondairement des vaisseaux limbiques et de l'humeur aqueuse. Ici on parle donc de voie transépithélial **(Allouch-Nahmias et al., 2011)**.

2.3.3. Transparence cornéenne

Les mécanismes de régulation de l'hydratation cornéenne sont nécessaires pour permettre le maintien de sa transparence, ce sont des mécanismes complexes et qui reposent en partie sur l'endothélium qui permet le maintien du stroma dans un état de déshydratation relative. Les autres facteurs jouant sur l'hydratation sont la pression intraoculaire, la pression de gonflement du stroma et des fonctions de barrière et de pompe de l'épithélium (rôle modeste). Un rôle relatif est aussi attribué à l'évaporation du film lacrymal dans la fonction de déturgescence, en effet, l'épaisseur cornéenne est plus faible de 5% le jour que la nuit **(Rocher Frédéric, 2016)**.

3. Maladies cornéennes

La perception qu'au nôtre œil du milieu extérieur commence par la pénétration de la lumière à travers la cornée. Donc toute anomalie de sa structure, de sa forme et de son renouvellement va influencer notre qualité de perception car les pathologies cornéennes sont multiples et d'origines diverses, comprennent notamment :

3.1. Kératite

La kératite est le nom donné à une maladie ophtalmologique se présentant sous la forme d'une inflammation de la cornée. Au quotidien, l'œil peut être fragilisé par des poussières ou des objets. La membrane qui protège l'œil de ces poussières et objets, la cornée, est alors soumise aux risques d'infection. Provoquée par tout un tas de causes, la kératite est très souvent associée à une conjonctivite. Dans la plupart des cas aigus, l'inflammation peut parfois devenir chronique (Melvin I, 2022).

3.1.1. Kératite bactérienne

La kératite bactérienne définit un premier type de kératite causé par une ou plusieurs bactéries (d'où son appellation). Le port de lentilles de contact constitue le principal facteur de risque de la kératite bactérienne (Marazzi, 2023) (Figure 06).



Figure 06. Kératite bactérienne (Rachwalik et al.,2015).

3.1.2. Kératite herpétique

La kératite herpétique est une infection virale causée par le virus de l'herpès. Ce virus peut être de deux types : type I qu'il est le plus commun et affecte principalement le visage et cause

une infection oculaire et le type II qui se transmet sexuellement et infecte les organes génitaux (Bharathi JM, Srinivasan M, Ramakrishnan R, et al., 2007) (Figure 07).

Il existe deux types de kératites herpétiques :

- 1) **La Kératite herpétique épithéliale (Kérato Conjonctivite herpétique)**: est une infection qui affecte habituellement la surface cornéenne mais touche parfois le stroma cornéen ou la surface cornéenne interne (endothélium) (Ibrahim Y, Boase D, 2009).



Figure 07. Kératite épithéliale herpétique (Dr P. Marazzi, 2023).

2) La kératite stromale :

- ❖ **La Kératite stromale immune** : c'est une réaction inflammatoire des couches les plus profondes de la cornée. Elle peut apparaître après un certain temps après un épisode d'infection herpétique active (Goldschmidt et al., 2009) (Belin et al., 2002) (Figure 08).
- ❖ **La Kératite stromale nécrosante** : dans ce type, le virus détruit le tissu cornéen et provoque une réaction inflammatoire, donc c'est le type le plus grave (Saeed A, et al., 2009).

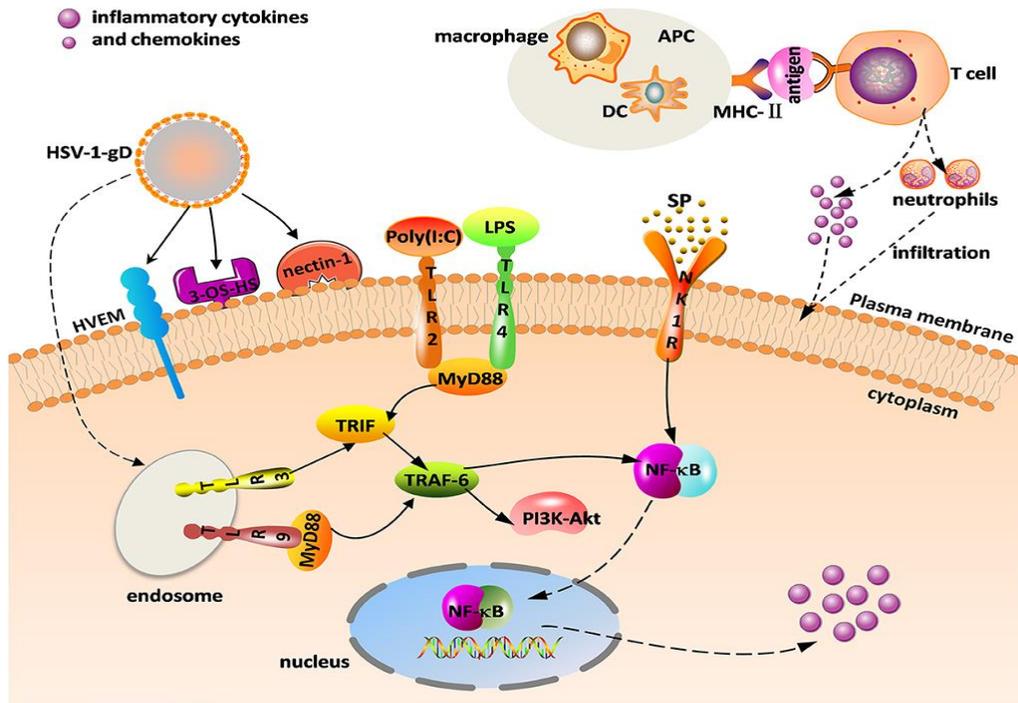


Figure 08. Pathogénèse de la kératite herpétique stromale : réponse inflammatoire immunitaire médiée par des régulateurs inflammatoires.

Parmi les symptômes habituels qui peuvent être associés à la kératite herpétique on trouve:(Heilman et al., 2007).

- Sensibilité plus élevée à la lumière avec éblouissement.
- Diminution significative de l'acuité visuelle.
- Inflammation des paupières.

3.2. Ulcère cornéen

L'ulcère de cornée, aussi appelé kératite ulcéreuse, est une blessure ouverte de la cornée ou atteinte de la cornée à la surface de l'œil, au niveau des couches transparentes nécessaires à la vision (Melvin I, 2022) (Figure 09).

Les ulcères cornéens, ainsi que l'extrême sécheresse oculaire et d'autres troubles oculaires, surviennent en raison d'infections oculaires (lorsqu'il y a une perte de tissu on dit qu'il y a une lésion au niveau de la cornée) (Jésus Cardenas, 2015).

Le diagnostic repose sur l'examen à la lampe à fente avec test à la fluorescéine et sur les examens microbiologiques en cas d'infection (**Melvin I, 2022**).

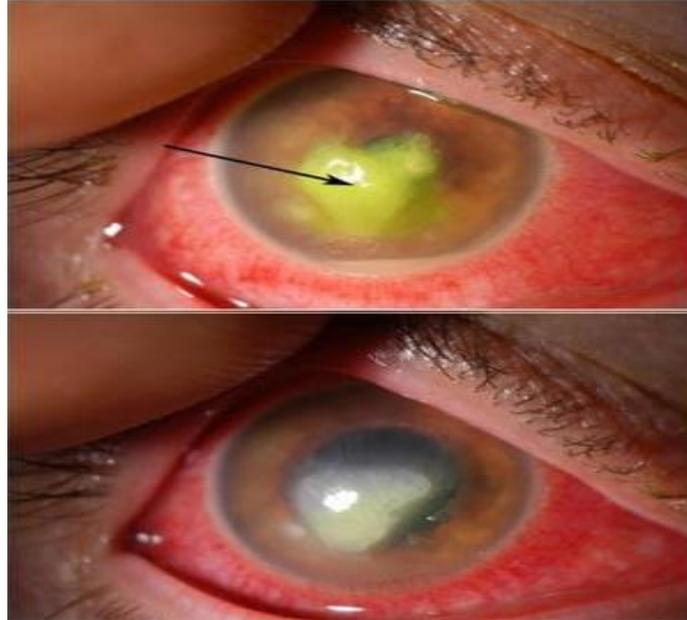


Figure 09. Un ulcère cornéen bactérien opaque (**Dr Sadeer Hannush, 2022**).

3.3. Syndrome de cogan

Le syndrome de cogan est une maladie auto immune rare, de cause inconnue, dirigée contre un antigène cornéen, caractérisée par une atteinte inflammatoire oculaire et audio vestibulaire (essentiellement surdité de perception de survenue brutale), cette maladie touche beaucoup plus les gens entre 14 ans et 47 ans (**Melvin, 2022**), (**Hallaji, 2021**), (**Crohns, 2011**)

3.4. Glaucome

Le glaucome est une neuropathie progressive où le nerf optique peut être touché et qui est liée à l'augmentation de la pression à l'intérieur de l'œil (PIO), qui comprime et endommage les fibres du nerf optique et de la rétine (**Klouche, 2016**). On définit habituellement deux grands types de glaucome qui entraîne l'altération de la vue:

- ❖ Le glaucome chronique à angle ouvert où le trabéculum a perdu sa perméabilité, et qui se forme lentement.

❖ Le glaucome aigu par fermeture d'angle où l'accès au trabéculum est perturbé, voire impossible, et qui se développe rapidement et constitue une urgence ophtalmique.

Dans d'autres cas, malgré une PIO normale, une circulation sanguine inadéquate entraîne la mort (nécrose) des cellules du nerf optique et de la rétine. La perte de vision associée au glaucome est permanente et irréversible. Sans traitement, cette maladie peut mener jusqu'à la cécité.

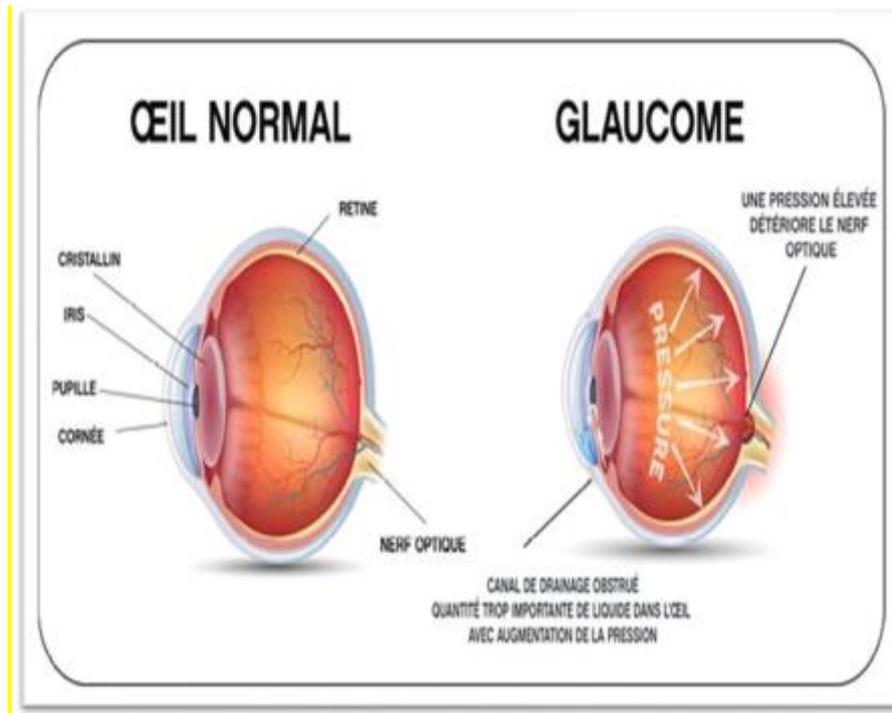


Figure 10. Différence entre un œil normal et un œil atteint de glaucome

(<https://www.nei.nih.gov/>)

3.5. Conjonctivite

La conjonctivite correspond à une inflammation ou une irritation de la conjonctive de l'œil, (la membrane qui recouvre le blanc de l'œil et le dessous des paupières). Elle peut être d'origine virale, bactérienne, allergique ou irritative. La conjonctivite survient pour de nombreuses raisons, qui sont :

- ❖ Conjonctivite bactérienne : causée par un staphylocoque, un streptocoque.
- ❖ Conjonctivite virale : causée par des adénovirus (virus bénins), l'herpès, la rougeole ou la varicelle.

- ❖ Conjonctivite allergique : causée par des allergènes tels que la salive et les produits de nettoyage.
- ❖ Conjonctivite traumatique : causée par un corps étranger ou un traumatisme.
- ❖ Conjonctivite toxique : en cas de contact avec des produits chimiques

Les conjonctivites bactériennes et virales sont très contagieuses et se transmettent facilement par des sécrétions lacrymales infectées ou des objets contaminés. (Shekhawat, Shtein, Blachley, Stein, 2017)

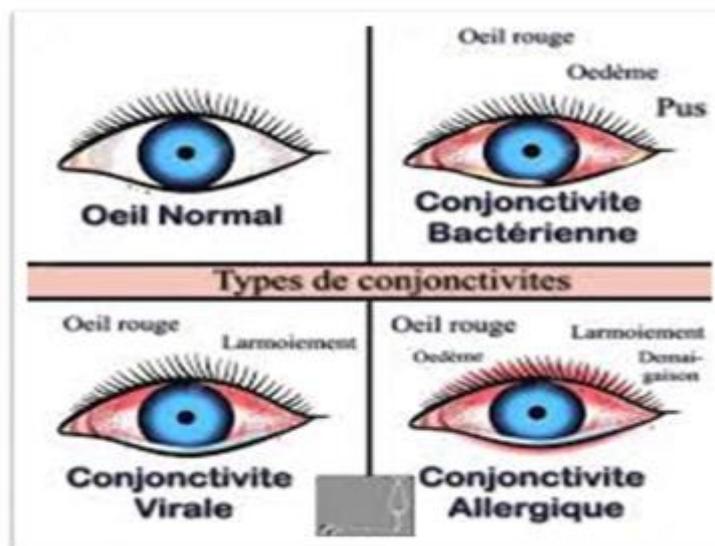


Figure 11. Les types de conjonctivite. (<https://www.allaboutvision.com/>)



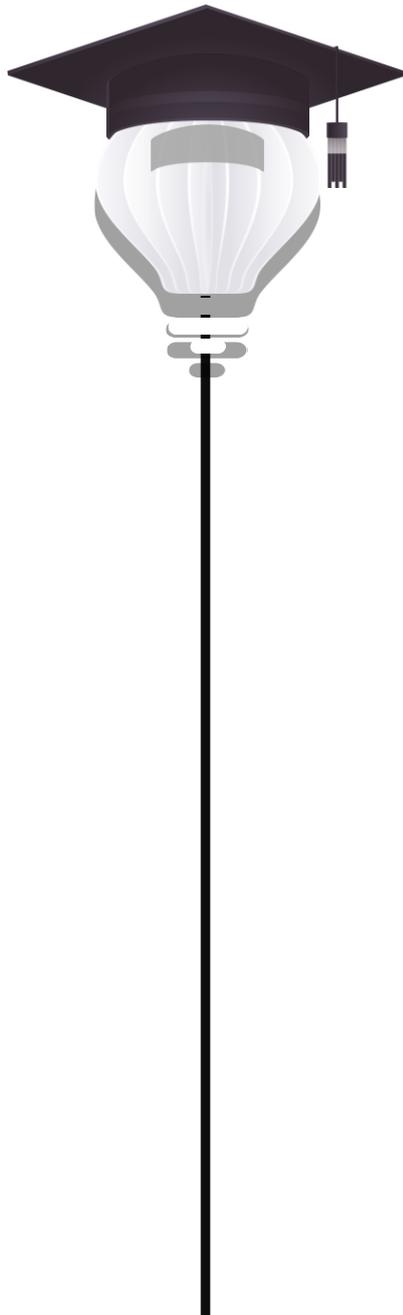
Partie expérimentale





Chapitre I

Matériel et méthodes



1. Echantillonnage

En Algérie, la récolte des champignons à lieu de décembre à janvier dans les zones arides, et de fin février à avril, dans les zones semi-arides (Fortas, 1990 ; Zitouni, 2010).

Nos échantillons frais de champignons souterrains ont été récoltés en mars 2023 dans la région semi- aride steppique, plus précisément dans la wilaya de Djelfa. L'identification a été effectuée par des botanistes.

Les champignons souterrains sont soigneusement nettoyés pour éliminer les particules de terre, puis ils sont mis à sécher dans un endroit sec et bien aéré ou à l'étuve, à température 40 °C, jusqu'à atteindre 20 jours. Une fois complètement séchés, ils sont broyés pendant 1-minute à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtenir une poudre fine. Cette poudre est ensuite stockée jusqu'à son utilisation ultérieure (Figure 12).

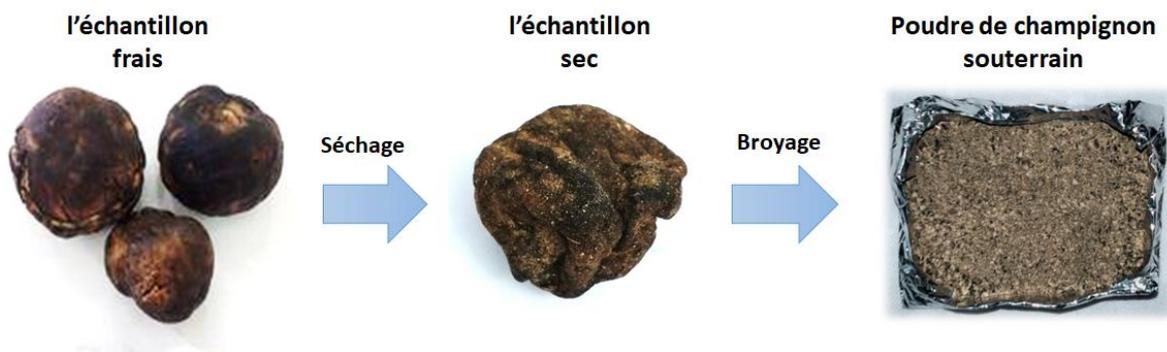


Figure 12. Différentes étapes de la préparation du matériel végétal (original).

2. Préparation de l'extrait

2.1. Extraction à froid par macération

a) Principe

La macération est une méthode qui implique de laisser la matière végétale séjourner dans le (méthanol/eau) à température ambiante pendant quelques heures ou jours afin d'extraire les composés solubles.

b) Mode opératoire

La méthode consiste à mélanger 10 g de poudre de champignon souterrain avec 100 mL d'un solvant d'extraction méthanol-eau (80% V/V) dans un erlenmeyer. Le mélange est ensuite agité en continu pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. Une fois cette étape terminée, l'extrait brut est filtré à l'aide de papier Whatman. Ensuite, la solution hydro-méthanolique est évaporée et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi R-210 à une température de 40 °C afin d'éliminer toute trace de solvant. L'extrait sec est ensuite gratté et transféré dans un flacon, puis conservé au réfrigérateur, à l'obscurité, jusqu'à son utilisation ultérieure (**Figure 13**).

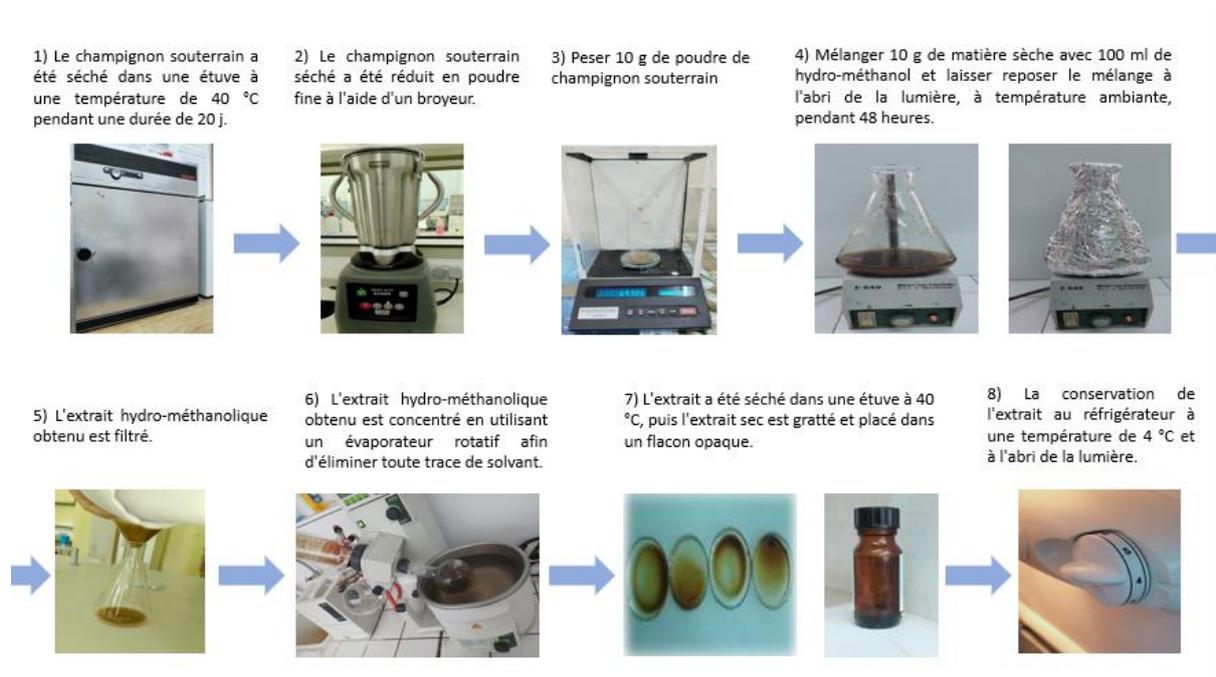


Figure 13. Protocole d'extraction par macération dans le méthanol-eau (Neggaz, 2016).

2.2. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante: (Falleh et al., 2008)

$$R (\%) = (M \text{ extrait} / M \text{ échantillon}) \times 100$$

- **R** : est le rendement en %.
- **M_{extrait}** : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.
- **M_{échantillon}** : la masse sèche de l'échantillon végétal en g.

3. Analyse qualitative par screening phytochimique des métabolites secondaires

Le screening phytochimique est un ensemble des tests simples qualitatifs, il constitue la première étape dans la recherche des molécules à activités biologiques et thérapeutiques, et basé sur des essais de solubilité, de réactions de coloration et de précipitation.

Ce criblage permet de mettre en évidence la présence ou l'absence de quelques composants chimiques appelés les métabolites secondaires existant dans la plante étudiée. Dans cette étude le screening phytochimique a été fait selon le protocole de **Cavé, (1993)**.

3.1. Recherche des flavonoïdes

La présence des flavonoïdes est mise en évidence en effectuant le test suivant : 2 ml d'extrait sont mélangés avec 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré, puis 0,5 g de tournure de magnésium sont ajoutés lentement. Au cours de cette expérience, une réaction exothermique se produit, suivie de l'apparition d'une coloration rose orangée ou rouge. Cette coloration indique la présence des flavonoïdes.

3.2. Recherche des coumarines

Dans un tube à essai, 1 ml d'extrait est mélangé avec quelques gouttes d'eau distillée. Ensuite, le tube est fermé avec un papier imbibé de NaOH dilué à 10% et porté à ébullition.

On observe une fluorescence jaune sous une lumière ultraviolette à une longueur d'onde de 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube indique la présence de coumarines.

3.3. Recherche des stérols et stéroïdes

La présence des stérols et stéroïdes est révélée par une évaporation de 5 ml d'extrait à sec puis en ajoutant 5 ml de chloroforme anhydre et 5 ml d'anhydride acétique. Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sont ajoutées, le mélange est agité et laissé reposer. L'apparition d'une coloration violacée virant au vert indique la présence des stérols et stéroïdes.

3.4. Recherche des tanins

Pour détecter la présence des tanins, ajouter quelques gouttes de FeCl₃ (1 %) à 1 ml de l'extrait. Si une coloration bleu-noire apparaît, cela indique la présence de tanins galliques. De plus, une coloration verte ou bleue témoigne de la présence des tanins catéchiques.

3.5. Recherche des triterpènes

Les triterpènes ont été détectés par l'évaporation de 5 ml des extraits, suivie de leur dissolution dans un mélange d'anhydride acétique/chloroforme (5/5 ; V/V). Par la suite, quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées. L'apparition d'une coloration

verte indique la présence d'hétérosides stéroïdiques, tandis que l'apparition d'une coloration verte violette révèle la présence des triterpènes.

3.6. Recherche des composés réducteurs

Dans un tube, 1 ml de l'extrait a été mélangé avec 1 ml d'eau distillée. Ensuite, vingt gouttes de la liqueur de Fehling ont été ajoutées au mélange, qui a été chauffé par la suite. La présence de composés réducteurs est révélée par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique.

3.7. Recherche des saponosides

La mise en évidence de la présence des saponosides repose sur leur capacité à former une mousse. La détection des saponosides a été réalisée en mettant 2 ml de l'extrait dans 10 ml d'eau distillée. Ensuite, Dans une série de dix tubes à essai, sont préparé selon le tableau suivant (Tableau 3).

Tableau 3. Volumes d'eau et d'extraits utilisés pour le test des saponosides.

Extrait (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L'eau (ml)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

Chaque tube est agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur.

Après un repos de 3 min, la hauteur de la mousse est mesurée.

- L'absence de mousse confirme l'absence de saponosides donc test négatif.
- La hauteur de mousse de moins de 1 cm témoigne d'une faible teneur des saponosides.
- La hauteur de mousse comprise entre 1 et 2 cm témoigne d'une bonne quantité de saponosides donc test positif.
- La hauteur de mousse de plus de 2 cm implique un test très positif.

3.8. Recherche des alcaloïdes

La détection des alcaloïdes se fait en préparant un mélange de 5 ml de chaque extrait et 1 ml de H₂SO₄ dilué (1/2). Deux tubes sont utilisés, l'un contenant le réactif de Mayer et l'autre le réactif de Wagner. Après un temps d'incubation de 15 minutes, l'apparition d'une turbidité ou d'un précipité indique la présence des alcaloïdes.

4. Evaluation *in vitro* des activités biologiques des métabolites secondaires de champignon souterrain

4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide de l'extrait hydro-méthanolique de champignon souterrain selon le protocole de **Biondi et al.,1993**.

4.1.1. Méthode de diffusion sur milieu solide

- **Principe**

Le principe de ce test repose sur la diffusion de différents agents antibactériens à des concentrations variées dans un milieu solide. Après un certain temps de contact entre les composés antibactériens et la souche bactérienne, l'effet du produit antibactérien se manifeste par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque. Le diamètre de cette zone d'inhibition permet de classer la souche bactérienne comme sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

- **Les souches bactériennes**

Les souches bactériennes utilisées dans l'étude sont des souches de référence ATCC obtenues auprès du département de Microbiologie de l'université Constantine 1. Les souches testées sont mentionnées dans le tableau suivant (**Tableau 4**).

Tableau 4. Différentes souches bactériennes utilisées dans l'activité antibactérienne.

	Souches bactériennes	ATCC
Gram négative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Escherichia coli</i>	25922
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923

- **Préparation du milieu de culture**

La gélose Muller-Hinton (MH) stérile est bouillie dans un bain-marie pendant environ 1 h jusqu'à sa dissolution complète. Une fois le milieu de culture préparé, il est coulé dans des boîtes de Pétri à une épaisseur de 4 à 5 mm, puis laisser refroidir.

- **Stérilisation du matériel**

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes ainsi que les disques en papier Whatman N°1 (6 mm de diamètre) ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 à 60 minutes.

- **Préparation des dilutions des extraits de champignon souterrain**

Pour préparer les dilutions successives avec des différentes concentrations, 200 mg de l'extrait est dissout dans 1ml de diméthylesulfoxyde (DMSO), 500 µl de cette solution mère sont mélangés avec 500 µl du DMSO, pour arriver à une dilution $\frac{1}{2}$ et on répète cette opération jusqu'à arriver à la dilution $\frac{1}{8}$ (**Figure 22**).

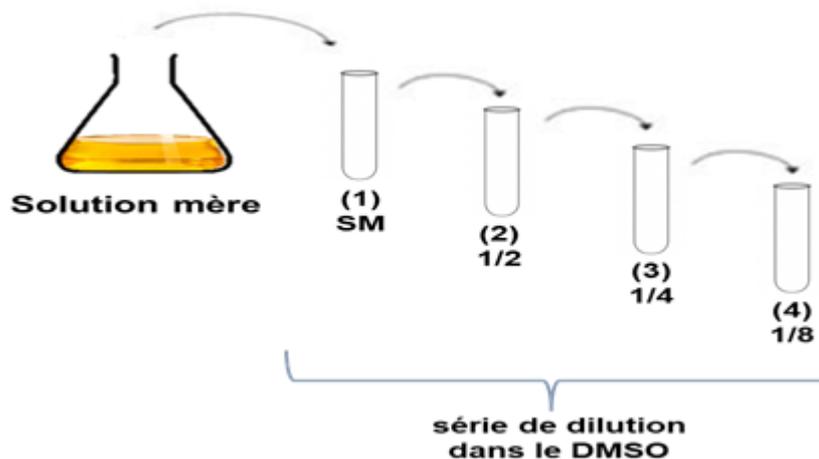


Figure 14. Préparation des dilutions de l'extrait dans le diméthylesulfoxyde

- **Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sont ensemencées sur la gélosé nutritive (GN). Après incubation de 24h à 37°C, on racle une colonie bien séparée de la boîte en utilisant l'anse de Platine et la transférer dans un tube de solution salée stérile (l'eau physiologique) afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de Mcfarland à 0,5 (10⁶ UFC/ml), ce qui correspond à une D.O = 0.08 à 0.1 / $\lambda = 625\text{nm}$). Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de solution saline stérile (Daouadji, 2010).

- **Ensemencement et dépôt des disques**

Les suspensions bactériennes sont étalées sur la surface de la gélose M.H à l'aide d'écouvillons. Ensuite, des disques imprégnés d'extraits (10 μl) sont délicatement déposés sur la gélose préalablement inoculée à l'aide d'une pince stérile. De la même manière, des antibiogrammes sont réalisés avec des disques contenant des témoins positifs afin de comparer les résultats des extraits testés, ainsi que des disques imprégnés de DMSO (témoin négatif). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 heures. Cette expérience est répétée trois fois pour chaque extrait et chaque espèce bactérienne (Figure 23).



Figure 15. L'ensemencement des souches bactériennes dans la gélose MH (Original).

- **L'antibiotique utilisé**

L'antibiotique qui a été utilisé comme contrôle positif est le **CIP** (Ciprofloxacine 5 μg).

- **Lecture**

La lecture des antibiogrammes a été réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques à l'aide d'une règle.

Les résultats sont exprimés en fonction du diamètre de la zone d'inhibition, comme indiqué par **Hamidi, (2013)**.

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm

5. Évaluation *in vivo* de l'effet des métabolites secondaires de l'extrait de champignon souterrain

Cette étude consiste à évaluer l'effet thérapeutique de l'extrait de champignon souterrain sur les yeux des souris infectées par des souches bactériennes.

5.1. Animaux et les conditions d'hébergement

Les animaux d'expérience sont des souris mâles de variété *swiss albinos*, âgés de 8-10 semaines, et pesant entre 30-40 g, l'élevage des animaux a eu lieu au sein de l'animalerie de l'université Constantine 1. Tous les animaux sont traités et manipulés selon les normes présentées dans le guide de l'OCDE 423. Ces animaux ont un accès illimité à l'eau du robinet et à la nourriture.

Les souris ont été soumises à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie ; à une température constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et un cycle de lumière/obscurité de 12/12h.

5.2. Produits utilisés

- Extrait aqueux de champignon souterrain : 200 mg de l'extrait brut sec de champignon souterrain ont été mélangés dans 1 ml de l'eau distillée.
- CILOXAN® 0,3 % : (CIPROFLOXACINE) produit commercial, a été acheté d'une pharmacie privée, utilisé pour traiter les infections bactériennes de l'œil (conjonctivite grave, kératite, ulcère ou abcès de la cornée).

5.3. Mode opératoire

Les souris ont été divisées en 4 groupes de 6 souris chacune et ont été gardées dans les mêmes conditions.

Groupe 1 : Contrôle ou témoin sain (CRL), qui reçoit quotidiennement (2 fois/J) par voie topique quelques gouttes d'eau distillée pendant 15 jours.

Groupe 2 : Témoin infecté, les souris reçoivent chaque jour (2 fois/J) par voie topique quelques gouttes d'eau distillée pendant 15 jours.

Groupe 3 : Infecté + extrait de la plante, ces animaux reçoivent quotidiennement (2 fois/J) par voie topique quelques gouttes de l'extrait de la plante pendant 15 jours.

Groupe 4 : Infecté + CILOXAN®, ces souris reçoivent chaque jour (2 fois/J) par voie topique quelques gouttes de CIPROFLOXACINE pendant 15 jours.

5.4. Préparation de la suspension bactérienne

La souche bactérienne : *staphylococcus aureus* (ATCC 25923) à été cultivée pendant une nuit (24h) dans des boîtes de gélose nutritive à 37°C.

Des colonies bactériennes individuelles isolées ont été prélevées et mises en suspension dans une solution saline stérile à une concentration de $1 \text{ à } 5 \times 10^6$ UFC / ml.

5.5. Infection oculaire

- L'essai préclinique a été réalisé conformément à la technique décrite par **Mingyue Cui et al, (2021)**.
- Les souris ont été anesthésiées par une injection intra péritonéale de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) et une goutte de chlorhydrate de lidocaïne à 1% (**Figure 16, 17**) à été appliquée localement sous forme d'anesthésie instillée avant la blessure cornéenne. L'épithélium cornéen a ensuite été gratté à l'aide d'une aiguille de calibre stérile pour créer une plaie superficielle sans endommager le stroma (**Figure 18**). Puis, la cornée a été irriguée avec une solution saline stérile pour éliminer tous les débris et les agents anesthésiques topiques résiduels.
- Ensuite, 15µl de la suspension bactérienne ont été appliqués localement sur la surface cornéenne (**Figure 19**).



Figure 16. Anesthésie locale par une injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) (**original**).

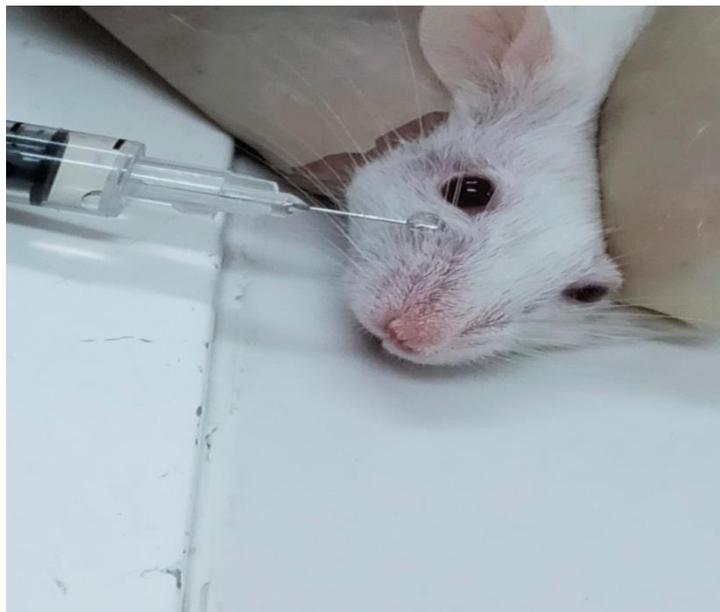


Figure 17. Anesthésie locale par une injection S/C de quelques gouttes de lidocaïne à 1% (**original**).



Figure 18. Blessure cornéenne et le grattage à l'aide d'une aiguille de calibre stérile (original).



Figure 19. Application locale de la suspension bactérienne sur la surface cornéenne (original)

5.6. Système de notation pour l'infection cornéenne bactérienne

Le système de notation présenté dans le **tableau 5** traite les caractéristiques de l'apparence générale de l'infection cornéenne. Dans ce système, l'infection est classée et notée de 0 à 4, en fonction de la taille de l'infection cornéenne. Une note de 0 représente un œil identique à l'œil controlatéral non infecté ; grade 1, faible opacité recouvrant partiellement la pupille ; grade 2, opacité dense recouvrant la pupille ; grade 3, opacité dense couvrant tout le segment antérieur ; et grade 4, perforation de la cornée (**Beisel et al,1983**).

Tableau 5. Système de notation pour les infections cornéennes bactériennes.

Grade					
0		1	2	3	4
Densité D'opacité	Clair	Légère nébulosité, Détails de la Pupille et de l'iris perceptibles	Nuageux, mais le Contour de L'iris et la Pupille reste visible	Nuageux, opacité non uniforme	opacité uniforme
Régularité de la surface	Lisse	Légère irrégularité de la surface	Surface rugueuse, quelque gonflement	Gonflement important, formation de cratère	Perforation ou descémétocèle grave

5.7. Traitement

- 24 heures après l'infection, les souris ont été traitées par voie topique avec quelques gouttes de l'extrait aqueux de champignon souterrain et de ciprofloxacine, deux fois par jour, pendant 15 jours, avec un intervalle de 3 heures entre chaque application. Les yeux des souris ont ensuite été examinés quotidiennement à l'aide d'un microscope optique (**Figure 20**).



Figure 20. Traitement des souris par voie topique avec quelques gouttes de l'extrait aqueux de champignon souterrain (**original**).



Chapitre II

Résultats et discussion



1. Résultats d'extraction des substances bioactives par macération dans le méthanol-eau

Le choix de la méthode d'extraction est très important avant d'effectuer *in vitro* les tests biologiques. Il dépend de plusieurs facteurs tels que la nature des composés à étudier, le solvant utilisé, la température et le rapport entre la quantité de matière et le volume du solvant.

Dans la plupart des cas, les solvants d'extraction utilisés sont des alcools, tels que le méthanol, comme dans notre étude. Cependant, pour extraire efficacement certains composés très polaires, tels que les composés phénoliques, qui ne peuvent pas être complètement extraits avec des solvants organiques purs, il est recommandé d'utiliser des mélanges d'alcool et d'eau (Naczk et Shahidi, 2004).

Le rendement d'extraction a été déterminé à partir du rapport du poids de l'extrait sur le poids de la poudre sèche utilisée. Il est calculé par la formule donnée par Falleh et al., (2008).

Les résultats du calcul du rendement, l'aspect ainsi que la couleur de l'extrait obtenu sont regroupés dans la **Figure 21** et le **Tableau 6**.



Figure 21. L'aspect de l'extrait obtenu par l'extraction par macération (**Original**).

Tableau 6. Rendement, aspect et couleur de l'extrait hydro-méthanolique de ce champignon obtenu par macération.

L'extrait	Poids (g)	Rendement (%)	Aspect	Couleur
Macération	1,51	15,1	Visqueux	Marron

La macération est une méthode d'extraction liquide-solide qui s'effectue à température ambiante. En général, c'est une méthode traditionnelle qui permet d'extraire le maximum de composés phénoliques et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hydro-méthanolique de champignon souterrain représente un rendement plus élevé (**15,1%**), par rapport au poids total du matériel biologique. Cet extrait est de couleur marron, d'aspect visqueux et dégage une forte odeur. Des résultats analogues sont rapportés dans de nombreux travaux (**Dennouni, 1996 ; Neggaz, 2010 ; Dib-Bellahouel et Portas, 2011 ; Dib-Bellahouel, 2012 ; Neggaz et Portas, 2013**).

Il a été rapporté dans la littérature que la combinaison méthanol-eau dans les proportions 80 : 20 en volume donne le meilleur rendement d'une macération par rapport à d'autres solvants dont éthanol-eau, acétone-eau et eau distillée (**Mohammedi et Atik, 2011**).

2. Analyse qualitative par le Screening phytochimique

La mise en évidence de différentes classes de métabolites secondaires et de métabolites primaires constituant une plante ou d'un champignon nous permet d'avoir une bonne idée de la phytochimie de cette matière biologique. Pour cela, nous avons réalisé des tests phytochimiques sur notre champignon souterrain.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques de notre extrait mentionné dans le **Tableau 7**, montrent la présence ou l'absence de certains groupes chimiques. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, de turbidité ou de coloration, qui sont proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

Selon les résultats du **Tableau 7**, une présence totale et forte des flavonoïdes, des saponosides et des composés réducteurs dans le champignon étudié, avec une moyenne présence des coumarines.

Pour les alcaloïdes sont fortement présents dans l'extrait qui révèle un test positif avec le Réactif de Mayer et de Wagner ;

Concernant les tanins, ils sont présents en faible quantité dans l'extrait hydro-méthanolique de champignon souterrain avec une coloration verte qui révèle l'existence des tanins catéchiques.

Cependant les Triterpènes, les Stérols et stéroïdes sont totalement absents de cet extrait.

Tableau 7: Résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait de champignon souterrain

Phyto-constituants	Méthodes/ Réactifs	Modification/résultats	Extrait méthanolique
Flavonoïdes	Tournure de magnésium	Rose orangée/ rouge	+++
Tanins	FeCl ₃	Bleu/vert	+
Alcaloïdes	Mayer/Wagner	Précipité	+++
Saponosides	Formation de mousse	Mousse persistante < 2cm	+++
Coumarines	Hydroxyde de sodium	Fluorescence jaune	++
Triterpènes	Acide sulfurique	Vert violacé	-
Composés réducteurs	Liqueur de Fehling	Précipité rouge brique	+++
Stérols et stéroïdes	Acide sulfurique	Vert	-

+++ : Réaction très positive.

++ : Réaction moyennement positive.

+ : Réaction faiblement positive.

- : Réaction négative.

Ces tests confirment la richesse de notre champignon souterrain en substances bioactives « Coumarines, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, Saponosides, Composés réducteurs ».

Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Alghazeer et al., 2012** qui ont révélé une forte présence d'alcaloïdes et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de quelques espèces de champignons souterrains, avec un test modéré pour les tanins, coumarines et les saponosides. On suggère que les tests phytochimiques sont des tests qualitatifs variables en fonction du mode d'extraction, le solvant utilisé et la partie de la plante étudiée.

3. Etude *in vitro* de l'activité antimicrobienne de l'extrait de champignon souterrain

3.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique

L'activité antibactérienne a été évaluée *in vitro* sur trois souches bactériennes (deux à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et une à Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques).

Djenane et al (2012) ont supposé que chaque diamètre (\emptyset) d'une zone d'inhibition a une signification ; $\emptyset < 8$ mm : bactérie non sensible ; $9 < \emptyset < 14$ mm : bactérie sensible ; $15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible et $\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible. L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puits contenant l'extrait de champignon souterrain. Les résultats des différents tests présentés dans la **Figure 22** et illustrés par les **Figure 23** à **25**.

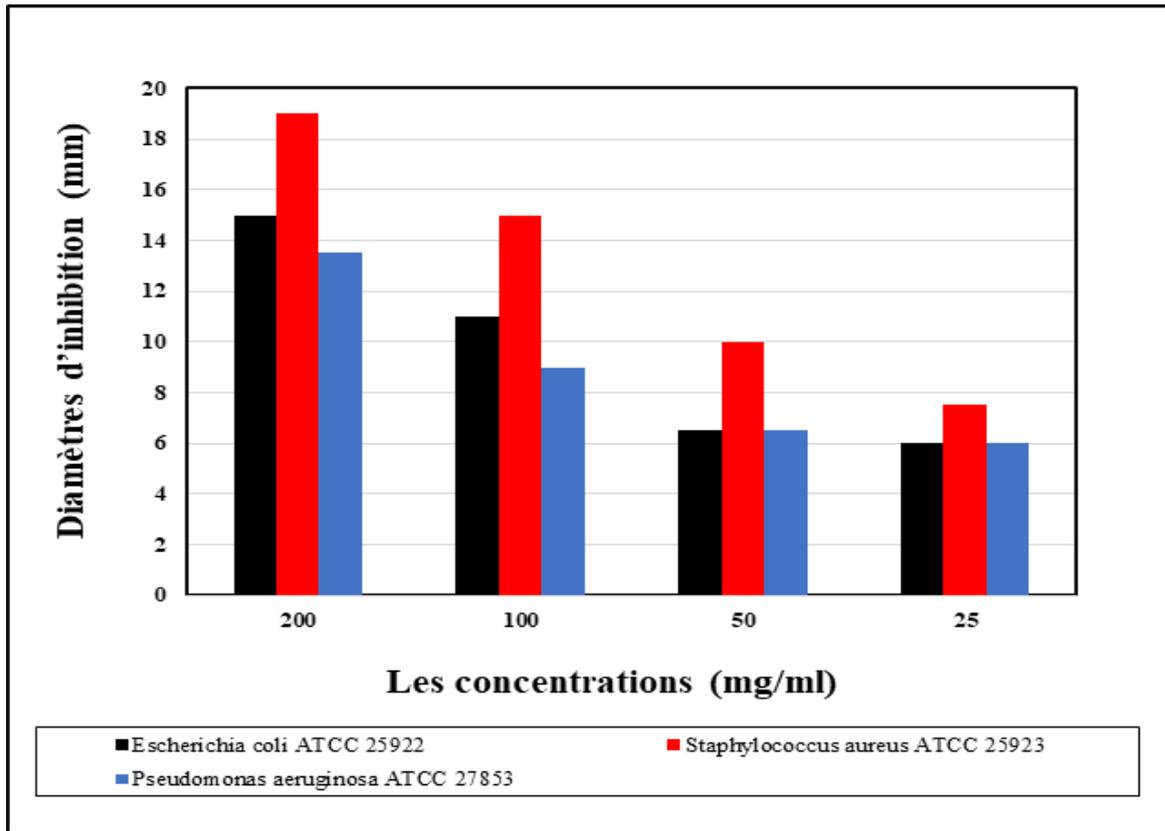


Figure 22. Histogramme représentant les diamètres d'inhibitions de l'activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait brut obtenu par méthode de macération.



Figure 23. Diamètres d'inhibition de l'extrait de champignon souterrain sur *Escherichia coli* ATCC 25922.

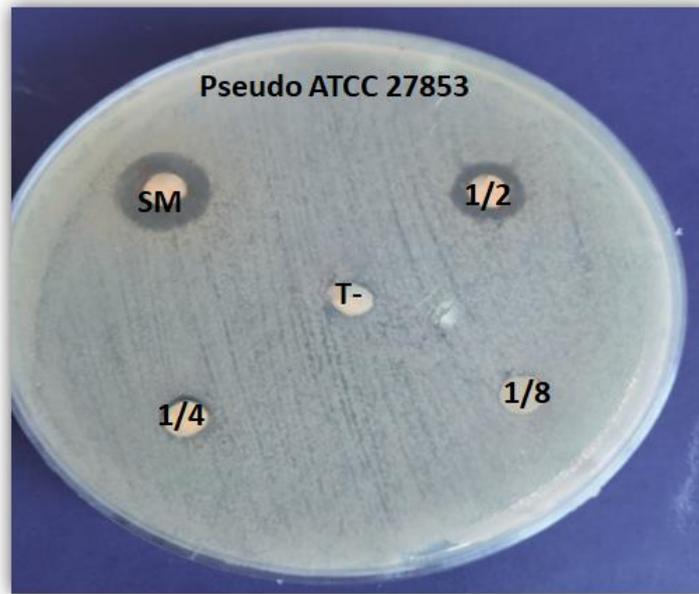


Figure 24. Diamètres d'inhibition de l'extrait de champignon souterrain sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

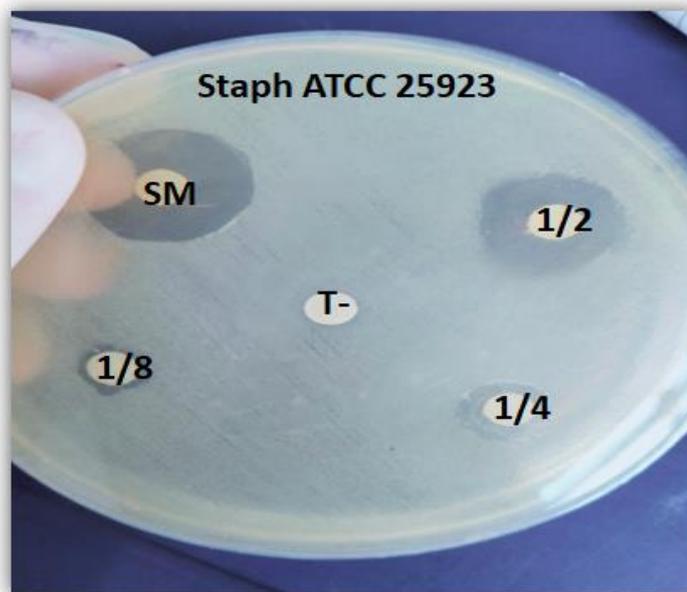


Figure 25. Diamètres d'inhibition de l'extrait de champignon souterrain sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

À travers les résultats obtenus, l'extrait brut de champignon souterrain présente une activité antibactérienne très intéressante pour les concentrations de 100 et 200 mg/ml. Où nous avons remarqué une augmentation progressive de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes examinées, sauf pour la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pour laquelle nous constatons une forte activité antibactérienne pour les concentrations de (50, 100 et 200 mg/ml) et une légère activité anti bactérienne pour la concentration de 25 mg/ml. Le diamètre d'inhibition peut atteindre jusqu'à 19 mm pour la concentration de 200 mg/ml de l'extrait brut.

En ce qui concerne les concentrations de 25 et 50 mg/ml de l'extrait brut, aucune activité antibactérienne n'est observée vis-à-vis des souches suivantes : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

Dans la présente étude, les résultats montrent que l'extrait a une activité antibactérienne de degrés variables contre les différentes souches examinées. La souche *staphylococcus* était la plus sensible avec un diamètre d'inhibition 19 mm. Selon Neggaz (2016) l'extrait de champignon souterrain a un pouvoir inhibiteur contre l'ensemble des souches testées.

Les résultats obtenus ont révélé la présence d'agents antibactériens dans l'extrait testé et ont également démontré une corrélation positive entre la présence des métabolites secondaires et l'effet inhibiteur.

Nos résultats obtenus presque rejoignent ceux de Benattia et Messaoudi (2018), qui ont travaillé sur quelques espèces de champignons souterrains. Ils ont testé l'effet antibactérien de l'extrait de ces champignons, collectés à Saïda, contre cinq bactéries : deux bactéries à Gram positif, *Enterococcus faecalis* ATCC 61299 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ainsi que trois bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23853 et *Salmonella enterica* ATCC 14028. Ils ont observé que cet extrait avait un effet inhibiteur sur la croissance des différentes souches examinées.

3.2. Résultats de l'activité de l'antibiotique avec trois souches bactériennes

L'activité de l'antibiotique CIP (Ciprofloxacine 5 µg) a été évaluée *in vitro* sur trois souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922), par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats des différents tests sont présentés dans le **tableau 8** et comparés avec les résultats de l'activité antibactérienne l'extrait brut de champignon souterrain (200 mg/ml).

Tableau 8. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique comme témoin positif et de l'extrait brut de champignon souterrain (200 mg/ml).

Les antibiotiques	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 23853
CIP (Ciprofloxacine)	21	30	27
L'extrait brut de champignon souterrain (200 mg/ml)	15	19	13

L'antibiotique utilisé présente une activité très intéressante pour toutes les bactéries testées, nos résultats révèlent que la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est extrêmement sensible à cet antibiotique avec un diamètre d'inhibition 30 mm.

Dans la présente étude, les résultats *in vitro* ont montré une zone d'inhibition plus élevée pour le collyre de ciprofloxacine à 0,3% par rapport à l'extrait brut de champignon souterrain (200 mg/ml).

4. Etude *in vivo* de l'efficacité de l'extrait de champignon souterrain chez les souris

L'évaluation de l'effet thérapeutique de l'extrait aqueux de champignon souterrain sur les yeux des souris infectées par la kératite, comparativement à un médicament de référence (CILOXAN®) est représentée dans les résultats suivants.

4.1. Résultats de provocation de la kératite bactérienne

Pour décrire l'évolution de l'infection à *S. aureus* dans la cornée, une kératite bactérienne a été évaluée sur une période de 24 heures dans un modèle murin (**Figure 26**). On a constaté que *S. aureus* se trouvait principalement en surface du tissu cornéen au début. Toutefois, la bactérie a rapidement proliféré dans l'épithélium, causant une destruction de la structure cornéenne dans les 24 heures suivant l'inoculation.



Figure 26. L'œil de souris infecté par la souche *Staphylococcus aureus* (24h après l'infection) (original).

4.2. Résultats de l'instillation de l'extrait aqueux de champignon souterrain et la ciprofloxacine.

Le **tableau 9** illustre l'évolution des attributs de l'infection cornéenne observés après une instillation de différents produits. Ces attributs sont enregistrés pendant les 15 jours de traitement (**Figure 27**).

Tableau 9. Effet de l'extrait aqueux de champignon souterrain sur l'évolution des attributs de la kératite induite par *Staphylococcus aureus*.

Nombre de jours après infection		Groupe 1 Contrôle (+)	Groupe 2 kératite + eau distillée	Groupe 3 kératite + l'extrait aqueux de champignon souterrain	Groupe 4 kératite + ciprofloxacine
1 jour	Densité d'Opacité	0	2	4	4
	Régularité de surface	0	1	3	3
5 jour	Densité d'Opacité	0	2	3	3
	Régularité de surface	0	1	2	2
10 jour	Densité d'Opacité	0	2	1	2
	Régularité de surface	0	1	1	1
15 jour	Densité d'Opacité	0	2	0	1
	Régularité de surface	0	1	0	1

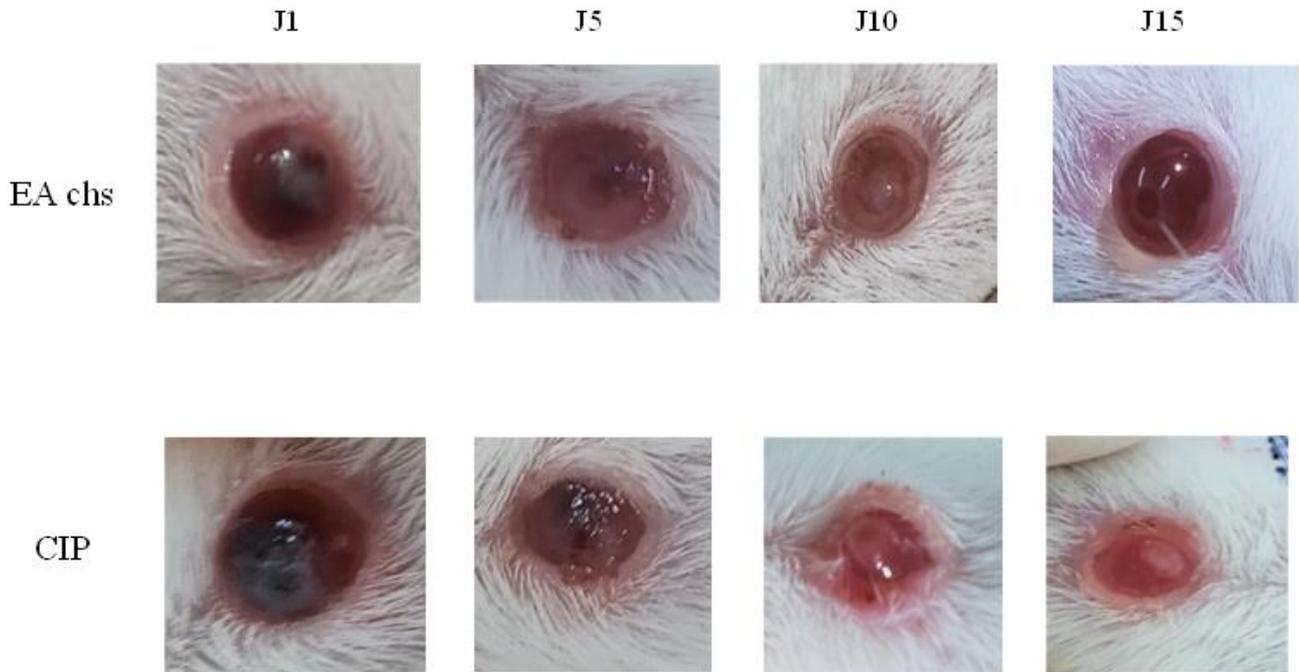


Figure 27. Chronologie de l'évolution de la kératite traitée avec l'extrait aqueux de champignon souterrain et le médicament de référence (**Original**).

CIP : CILOXAN® 0,3 % (Ciprofloxacine), **EA chs :** Extrait aqueux de champignon souterrain

D'après les résultats, nous ne remarquons aucun changement de la densité d'opacité et la régularité de la surface de la cornée chez les deux premiers groupes.

En revanche, on note une amélioration très significative de la densité d'opacité et la régularité de la surface de la cornée des souris traitées avec l'extrait aqueux de champignon souterrain par rapport aux souris traitées avec le médicament de référence du 1er au 15ème jour (**Figure 27**). Il ressort aussi de nos résultats que notre extrait aqueux avait un effet thérapeutique plus important sur les souris infectées que la ciprofloxacine. Ces résultats montrent que l'extrait aqueux de notre champignon souterrain était efficace dans le traitement de la kératite bactérienne causée par la souche *Staphylococcus aureus*.



*Conclusion générale
et perspectives*



De nos jours, l'utilisation des champignons médicinaux en phytothérapie suscite un grand intérêt dans le domaine de la recherche biomédicale. Ce regain d'intérêt découle d'une part de la considération que ces matières biologiques représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs, et d'autre part du besoin d'une médication plus douce, dépourvue d'effets secondaires.

Dans le but de rechercher de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique, nous nous sommes intéressés à valoriser les vertus d'un champignon souterrain, par une étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques *in-vitro* et *in-vivo*.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu que le screening phytochimique de l'extrait testé du champignon étudié, a fait ressortir une richesse en flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, composés réducteurs, coumarines et tanins.

Concernant l'analyse de l'activité antibactérienne *in vitro* de l'extrait de champignon souterrain, elle a montré que cet extrait a un pouvoir inhibiteur important sur la croissance des différentes souches examinées.

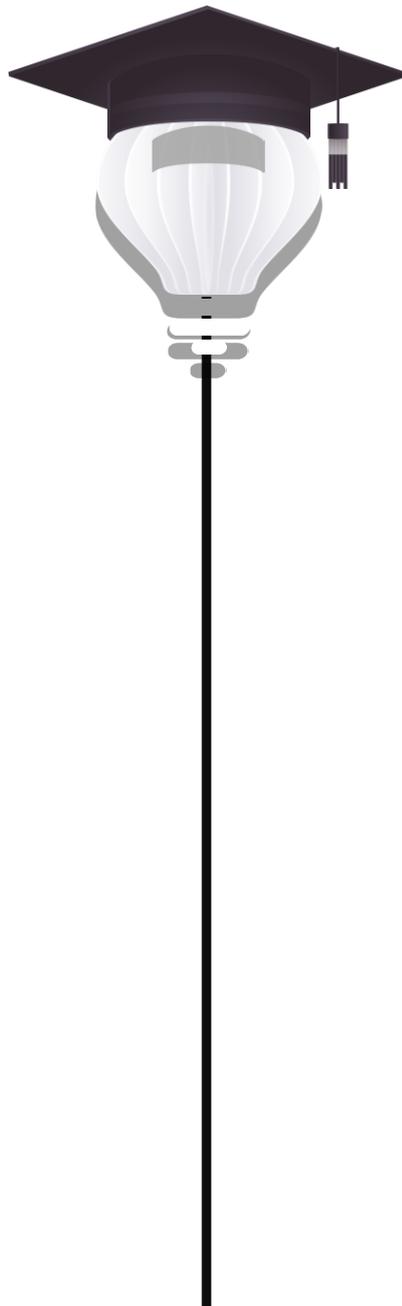
Le test de l'évaluation de l'efficacité de l'extrait de champignon souterrain réalisé sur des souris, a révélé que cet extrait présente un effet thérapeutique significatif, induisant une amélioration notable de la densité d'opacité et de la régularité de la surface de la cornée.

Cette étude ouvre des perspectives expérimentales qui devraient nous agréer d'avancer vers une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires participant dans les effets biologiques observés :

- ✓ Séparation et purification de l'extrait de champignon souterrain afin d'identifier les molécules à l'origine des effets pharmacologiques
- ✓ Caractérisation des molécules majoritaires par RMN
- ✓ Effectuer des tests antifongiques et antioxydants



Références bibliographiques



A

- **Abdul Majid S., Dahham S., AL-Rawi S., Ibrahim A., Abdul Majid A.** 2016- Antioxydant, anticancer, apoptose propriétés et composition chimique de truffe Terfezia clavaryi.
- **Acosta M.C., Tan M.E., Belmonte C.** 2001 Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci. 42:2063–7.
- **Aiello, A.L., Tran, V.T., Rao, N.A.** 1992 Postnatal development of the ciliary body and pars plana. A morphometric study in childhood. Arch Ophthalmol Chic Ill 1960 ;110(6) :802– 5.
- **Allouch-Nahmias, C., Goldschmit, P., Borderie, V., Touzeau, O., Gaujoux, T., Laroche, L., Goemaere, I., Rault, J.** 2011 Anatomie de la cornée. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Ophtalmologie, 21-003-A-10.
- **Alsheikh, A.M., Trappe, J.M.** 1983. Desert truffles: The genus Tirmania. Trans. Br. Mycol. Soc., 8 (1): 83-90.
- **Awwad, S.T., Heilman, M., Hogan, R.N.** 2007 Severe reactive ischemic posterior segment inflammation in acanthamoeba keratitis : a new potentially blinding syndrome. Ophthalmology; 114 : 313-20.

B

- **Belmonte, C., Giraldez, F.** Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. J Physiol. 1981;321:355–68.
- **Benattia, Z., Messaoudi, S.** 2018. Etude de Les activités antimicrobiennes et dosage des composés phénoliques des extraits de terfez (Terfezia arenaria. Chatin), Diplôme de Master académique, Département Sciences de la nature et de la vie, Université mohamed boudiaf M'sila, Alger. pp.6-7.
- **Bennouchenne, Dj.** 2021. Le sapin d'Algérie (Abies numidica de Lannoy ex Carrière): étude phytochimique des métabolites secondaires et évaluation in vitro, in vivo et in silico des activités biologiques de ses composés. Thèse en vue de l'obtention de grade Doctorat, université Constantine 1, 191p
- **Bernard, C.** 1997. Conseil ophtalmologique à l'officine. Thèse de Pharmacie, Université de Paris.

- **Bévalot, F.** 2014. Intérêts et limites de la bile et de l'humeur vitrée comme matrices alternatives en toxicologie médico-légale. Toxicologie. Université Claude Bernard - Lyon I, Français.
- **Bharathi, J.M., Srinivasan, M., Ramakrishnan, R.** 2007 study of the spectrum of Acanthamoeba keratitis : a three-year study at a tertiary eye care referral center in South India. Indian J Ophthalmol; 55 : 37-42.
- **Bokhary, H.A.** 1987- Desert truffles "Al-Kemah" of the Kingdom of Saudi Arabia.1.
- **Bradai, I.** 2014- inventaire et bioécologie des terfez dans quelques régions du Sahara 72 septentrional (Oued M'ya, Oued Righ et Ghardaïa). Thèse en vue d'obtention de grade Doctorat, université d'Ouargla, 124p.

C

- **Callot, G.** 1999. La truffe, la terre, la vie. Ed. INRA., Paris, 209 p.
- **Chiambaretta, F., Pilon, F., Rigal, D., Gerard, M.** 2000, EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Ophtalmologie, 21-200-A-10.
- **Coquerel, B.** 2013. L'ophtalmologie à l'officine. Sciences pharmaceutiques
- **Costa, R., Fanali, C., Pennazza, G., Tedone, L., Dugo, L., Santonico, M., Sciarrone, D., Cacciola, F., Cucchiari, L., Dacha, M. et Mondello, L.** 2014- Screening of volatile compound composition of white truffle during storage by GCxGC (FID/MS) and gas sensor array analyses. LWT - Food Science and Technology, vol : 1-9.
- **Crotti, C.,** 2011. Chirurgie du segment antérieur de l'œil et traitement du glaucome par laser femtosec-onde et imagerie de tomographie par cohérence optique. Optique [physics. Optics]. École Polytechnique X, Français.

D

- **DAOUDJI.** 2010. Etude des huiles essentielles de la plante Mentha piperita et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusions, Mémoire de Master. Université de Constantine 1, 61 p
- **Decoste, L.** 2022. Analyse de l'épaisseur choroïdienne du myope fort atteint de glaucome primitif à angle ouvert. Médecine humaine et pathologie.
- **Dennouni, N.** 1996.- Mise en évidence des activités antibactériennes et Antifongiques chez deux espèces de Terfez d'Algérie (Tirmania nivea et Tirmania pinoyi). Thèse en vue d'obtention de grade Magister, université de Tlemcen, 115p.

- **Diez, J., Manjon, J.L., Martin, F.** 2002. Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia*, 94 (2):247-259
- **Partha Haradhan** Chowdhury and Brinda Haren Shah. "Basics of Anatomy and Physiology of Cornea". *Acta Scientific Ophthalmology* 4.5
- **Damien Gatinel**, *Ophtalmologie - Chirurgie de la cataracte, Chirurgie réfractive - Optique clinique*, 2014.
- **Dundar, A., Faruk Yesil, O., Acay, H., Okumus, V., Ozdemir, S., Yildiz, A.**, 2012.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C.** 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331 : 372- 379.

E

- **Egbuna, Ch., Ifemeje, C. J., Kryeziu, L.T., Mukherjee, M., SHAH, H., Rao, G.M.N., Francis, L. J. J., Gido, and Tijjani, H.** 2018. Introduction to Phytochemistry. Chapter 1. 1, 1-35

F

- **Fortas, Z.**, 1990. Etude de trois espèces de terfez : caractères cultureux et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Thèse de Doctorat d'état, Univ. d'Oran Es-sénia (Algérie), INRA de Clermont-Ferrand (France), 166 p.
- **Fortas, Z., Chevalier, G.**, 1992a. Caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe, récoltée en Algérie. *Cryptogamie, Mycol.*, 13: 21-29.
- **Frédéric Rocher.** *Chirurgie de la cataracte : étude comparative de la tension oculaire et de l'ouverture de l'angle iridocornéen.* Médecine humaine et pathologie. 2016.

G

- **Goldschmidt, P., Degorge, S., Ben Allaoua, D.** 2009. New tool for the simultaneous detection of 10 different genotypes of *Acanthamoeba* available from the American Type Culture Collection. *Br J Ophthalmol* ; 93 : 1096-100.
- **Govindappa, M.** 2015. A Review on Role of Plant(s) Extracts and its Phytochemicals for the Management of Diabetes. *Journal of Diabetes and Metabolism*, 6(7), 1-38.

H

- **Hairston, R.J., Maguire, A.M., Vitale, S., Green, W.R.** 1997 .Morphometric analysis of pars plana development in humans. *Retina Phila Pa.* 17(2) :135–8.
- **HAMIDI, A.** Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Thèse de Magister. Ouargla : Université KASDI MERBAH, 2013, 86p.
- **Hamza, A., Zouari, N, ZouariI, S., Jdir, H., ZaidiS., GtariI, M., Neffati, M.** 2013- Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *TerfeziaboudieriChatin*, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 1878- 5352.
- **Horacio, M., Serra., María Fernanda Suárez.** 1997 .in *Handbook of Nutrition, Diet, and the Eye (Second Edition)*◆.
- <https://www.doctissimo.fr/equipe/les-experts-de-doctissimo/jesus-cardenas>
- **Hussain, G., Al-Ruqaie, I.M.**1999. Occurrence, chemical composition and nutritional value.

I

- **Ibrahim, Y.W., Boase, D.L., Cree, I.A.** 2009 .Epidemiologic characteristics, predisposing factors and microbiological profile of infectious corneal ulcers : the Portsmouth corneal ulcer study. *Br J Ophthalmol* . 93 : 1319-24.

J

- **Janakat, S., Nassar, M.** 2010. Hepatoprotective Activity of Desert Truffle (*Terfezia clavaryi*).

K

- **Kagan-Zur, V., Zaretsky, M., Sitrit, Y., Roth-Bejerano, N.** 2008. Hypogeous pezizaceae.
- **Karimi, A., Maedeh, M., and Mahmoud, Rafieian, K.** 2015. « Herbal versus Synthetic ; Beliefs and Facts ».
- **Khabar, L.** 2002. Etudes pluridisciplinaires des truffes du Maroc et perspectives pour
- **Khabar, L., Najim, L.** 2004. Truffes du désert du Maroc.

L

-
- **Laessoe, T., Hansen, K.** 2007. Truffle trouble: what happened to the Tuberales?
 - **Liu, R. S., Li, D.S., LI, H. M et Tang Y. J.** 2008- Response surface modeling the significance of nitrogen source on the cell growth and Tuber polysaccharides production by submerged cultivation of Chinese truffle Tuber sinense. Process Biochemistry, vol.43:868–876.

M

-
- **Belin, M.W .** Elevated intraocular pressure-induced interlamellar stromal keratitis . Ophthalmology.(2002)
 - **Mandeel, Q.A., Al-Laith, A.** 2007. Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain.Journal of Ethnopharmacology, 110: 118-129.
 - **Mekawey, A.** 2015. Terfezia boudieri as sources of antitumor and antiviral agent. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 4 (5): 294-315.
 - **Melvin, I. Roat., MD.** 2022.Sidney Kimmel Medical College at Thomas Jefferson University.
 - **Mingyue, Cui., Mengji Zheng., Christian Wiraja., Sharon Wan Ting Chew., Arti Mishra., Venkatesh Mayandi., Rajamani Lakshminarayanan., and Chenjie Xu.,**2021.Ocular Delivery of Predatory Bacterial with Cryomicroneedles Against Eye Infection, 9, 2102327.

- **Mohammedi, Z. et Atik, F.** (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2 (1) : 609-615.
- **Morte A., Zamora M., Gutiérrez A., Honrubia M.,** 2009. Desert Truffle Cultivation.
- **Muraine M, Gueudry J.** Rapport SFO 2015 - Surface oculaire [Internet]. 2015.

N

- **Nacz M, Shahidi F.,** (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 : 95-111
- **Neggaz S.,** 2010. Analyses chromatographiques et spectroscopiques des composés
- **Neggaz S.,** 2016. Etude des activités antimicrobiennes et antioxydantes des truffes du désert d'Algérie et criblage chimique de leurs substances bioactives.
- **Nickla DL, Wallman J.** 2010. The multifunctional. *Prog Retin Eye Res.* 29(2):144-68.

R

- **Regatieri, C.V., Branchini, L., Fujimoto, J.G., Duker, J.S.** 2012. Choroidal imaging using spectral-domain optical coherence tomography . *Retina Phila Pa.*32(5) :865-76.
- **Ricard J.M.,** 2003. La Truffe Guide technique de trufficulture. *Ctifl.*33, 48, 49, 50.
- **Riousset G., Riousset L., Chevalier G., Bradet M.C.,** 2001. Truffes d'Europe et de Chine. Ed. INRA, Paris, 179 p.

S

- **Sadat G.,** 1994. Contribution à l'étude de l'association symbiotiques entre le genre *Terfezia* sp. et les espèces *Helianthemum*, *Pinus halepensis* et *Pinus canariensis*, *Men .Ing .Agr. I.N.A .EL-HARACH .Alger* ,57 p.
- **Saeed A, D'Arcy F, Stack J,** Risk factors, microbiological findings, and clinical outcomes in cases of microbial keratitis admitted to a tertiary referral center in Ireland. *Cornea* 2009 ; 28 : 285-92.
- **Semaha S.,** 2020. Les kératites infectieuses : manifestations CLINIQUES ET PRISE EN CHARGE. FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE.

- **Shavit E.**, 2008. Medicinal mushrooms: Truffles roasting in the evening fires, Pages from the history of desert truffles.
- **Shavit E.**, 2008-Truffles Roasting in the Evening Fires: Pages from the History of Desert Truffles. Medicinal mushrooms, vol. 3 (1): 18-23.
- **Steen KH, Reeh PW.** Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett.* 1993;154:113–6.

T

- **Taleb-Toudert k**, 2015. Extraction et caractérisation des huiles de dix plantes aromatiques prouvent de la région de Kabylie (nord algérien).évaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *callosobruchus maculatus* (coléoptère : bruchidae), Thèse de doctorat, UN de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Pl
- **Tang Y. J., Zhu L. L., Liu R. S., Li H. M., Li D. S. et Mi Z. Y.**, 2008.- Quantitative response of cell growth and Tuber polysaccharides biosynthesis by medicinal mushroom Chinese truffle *Tuber sinense* to metal ion in culture medium. *Bioresource Technology*, vol. 99:7606–7615.
- **Trappe J.M., 1979.** The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives) “*Clelandia arenacea*, *Dingleya verrucosa*, *Choiromyces aboriginum*, *Peziza stuntzii*”, new taxa, *Fungi. Mycotaxon* (9), 297–340 p.

V

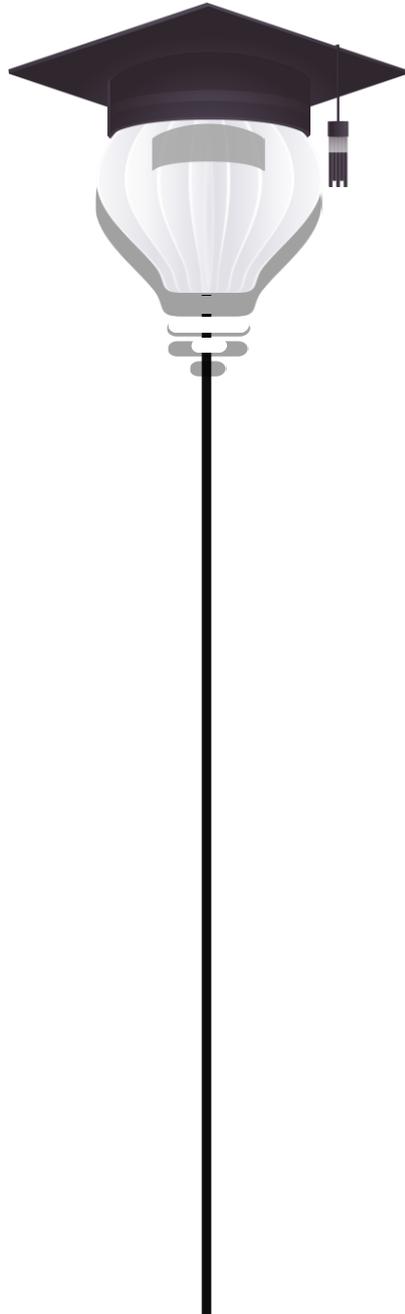
- **V. Borderie.** Physiologie de la cornée EMC- Ophtalmologie, 2005.
- **Vermuso L., 2018.** Traitement de glaucomes réfractaires par endocyclophotocoagulation : résultats à 9 mois d’une série de 58 cas au CHU de Rouen.
- **Volpato G., Rossi D., Dentoni D.**, 2013. A Reward for Patience and Suffering.

Z

- **Zitouni-Haouar F.E.H., Alvarado P., Sbissi I., Boudabous A., Fortas Z., Moreno G., Manjon J.L., Gtari M.**, 2015. Contrasted Genetic Diversity, Relevance of Climate and Host Plants, and Comments on the Taxonomic Problems of the Genus *Picoa*.



Annexes



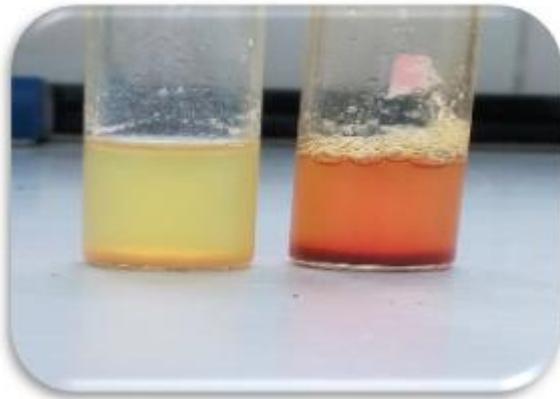
Annexe 01. Les préparations des solutions aqueuses**➤ La préparation de la solution FeCl₃ à (1%)**

La préparation de la solution de FeCl₃ à 1% se déroule de la manière suivante : On place 1 g de FeCl₃ dans un bécher contenant un petit volume d'eau distillée. Puis, le tout est agité doucement pour faciliter la dissolution du solide. Ensuite, on ajoute de l'eau distillée pour compléter le volume total à 100 ml.

➤ La préparation de la solution NaOH à (10%)

La préparation de la solution NaOH à 10% se déroule de la manière suivante : On pèse 10 g de NaOH et on les ajoute à un bécher contenant une petite quantité d'eau distillée. En agitant lentement et avec précaution en raison de la réaction exothermique qui se produit, on permet au NaOH de se dissoudre complètement dans l'eau. Ensuite, on ajoute de l'eau distillée progressivement tout en continuant d'agiter jusqu'à ce que le volume total atteigne 100 ml.

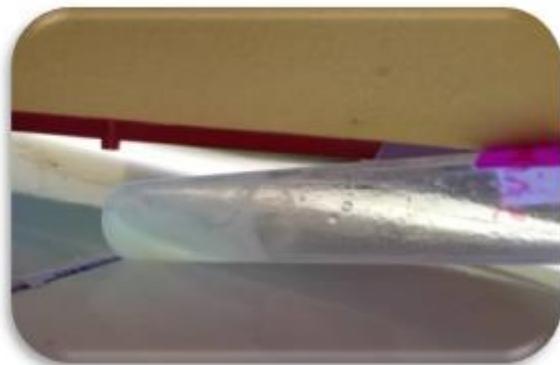
Annexe 02. Les résultats de screening phytochimique



Alcaloïdes



Saponosides



Coumarines



Flavonoïdes



Tanins



Triterpènes



Composés réducteurs



Stérols et stéroïdes

Annexe 03. La répartition des souris





Résumé



Résumé

Cette étude vise à valoriser les vertus d'un champignon souterrain, par une étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques *in-vitro* et *in-vivo*. Le screening phytochimique de l'extrait testé a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires : les flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, composés réducteurs, coumarines et tanins.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), selon la méthode de diffusion de disque, et elle a montré que cet extrait a un pouvoir inhibiteur important sur la croissance des différentes souches examinées.

L'évaluation de l'efficacité de l'extrait de champignon souterrain sur la souris a révélé que cet extrait a un effet thérapeutique important, provoquant une amélioration significative de la densité d'opacité et de la régularité de la surface cornée.

Mots clés: Champignon souterrain ; Activité antibactérienne ; métabolites secondaires ; cornée.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تعزيز مزايا "الفطر الجذري" من خلال وصف كيميائي نباتي وتقييم الأنشطة البيولوجية في المختبر وفي الجسم الحي. الاختبارات الفيتو كيميائية للمستخلص المجرب تسمح لنا بتسليط الضوء على وجود المستقلبات tanins. الثانوية: الفلافونويدات، القلويدات، السابونوسيدات، المركبات المختزلة، الكومارينات و تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على ثلاث سلالات بكتيرية (المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية و الزائفة الزنجارية) باستخدام طريقة انتشار القرص، وأظهرت أن هذا الاستخراج لديه تأثير مثبط مهم على نمو السلالات المختلفة المدروسة. تم تقييم فعالية استخراج الفطر الجذري على الفئران وأظهر أن له تأثير علاجي مهم، مما أدى إلى تحسين كبير في كثافة التعقيم وانتظام سطح القرنية.

كلمات مفتاحية: الفطر الجذري، نشاط مضاد للبكتيريا، مركبات ثانوية، قرنية.

Abstract

This study aims to enhance the virtues of an " underground fungus" by a phytochemical characterization and an evaluation of the biological activities *in vitro* and *in vivo*. The phytochemical screening on the extract tested has made it possible to highlight the presence of the secondary metabolites: flavonoids, alkaloids, saponins, reducing compositions, coumarins and tannins.

The antibacterial activity was determined on three bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*), according to the disk diffusion method. and it showed that this extract has a significant inhibitory effect on the growth of the studied strains. The therapeutic effectiveness of the extract was evaluated in mice and demonstrated a significant therapeutic effect, leading to a significant improvement in corneal density and regularity.

Keywords: underground fungus, antimicrobial activity, secondary compounds, cornea.

Année universitaire : 2022/2023

Présentée par : BEKKOUCHE Abir
GUENNICHE Amira
SALHI Maroua

**Mémoire présenté dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275
En vue de l'obtention du diplôme de Master
et diplôme startup –diplôme brevet
Option : Biochimie /Biochimie Appliquée**

Thème : Production d'un collyre naturel « Bio Care Eye Drops »

Résumé

Cette étude vise à valoriser les vertus d'un champignon souterrain, par une étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques *in-vitro* et *in-vivo*. Le screening phytochimique de l'extrait testé a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires : les flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, composés réducteurs, coumarines et tanins.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), selon la méthode de diffusion de disque, et elle a montré que cet extrait a un pouvoir inhibiteur important sur la croissance des différentes souches examinées.

L'évaluation de l'efficacité de l'extrait de champignon souterrain sur la souris a révélé que cet extrait a un effet thérapeutique important, provoquant une amélioration significative de la densité d'opacité et de la régularité de la surface cornée.

Mots clés : Champignon souterrain ; Activité antibactérienne ; métabolites secondaires ; cornée.

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université Frères Mentouri Constantine 1

Mots clés : Champignon souterrain ; Activité antibactérienne ; métabolites secondaires ; cornée.

Jury d'évaluation :

Encadreur :	BELLIL Ines	(Prof – UFMC1).
Président :	MOSBAH Asma	(Prof - UFMC1).
Examineur :	BENOUCHENNE Djamila	(MCB - ENSB de Constantine).
Incubateur :	KASSAH LAOUAR Mounia	(MCB - UFMC1).
Cati :	BETINA Soumeya	(MCB - UFMC1).
Sécateur Socioéconomique :	ABABSA Zine El Abidine	(GMP Pharma).

Annexe Guide

Guide du projet

**Pour obtenir un diplôme/startup
Dans le cadre de l'Arrêté Ministériel 1275**

**Décembre
2022**



Carte d'information

1- L'équipe d'encadrement

Encadrant principal : Professeur BELLIL Ines	Spécialité : Biochimie et Biotechnologie
---	---

2- L'équipe de projet

Équipe de projet	Faculté	Spécialité
BEKKOUCHE Abir	Sciences de la Nature et de la Vie	Biochimie Appliquée
GUENNICHE Amira	Sciences de la Nature et de la Vie	Biochimie
BELLIL Ines	Sciences de la Nature et de la Vie	Biochimie et Biotechnologie



Premier axe: Présentation
du projet

Premier axe : Présentation du projet

1. L'idée de projet (solution proposée)

- ✓ La production d'un collyre naturel « **Bio Care Eye Drops** ».
- ✓ Notre projet appartient au domaine pharmaceutique, en raison de :
 - Son objectif médicale parce que les collyres sont des produits pharmaceutiques qui sont spécialement formulés pour être administrés dans les yeux et pour traiter les problèmes oculaires tels que : les infections, les allergies, la sécheresse et la kératite.
 - L'impératif de respecter les normes de l'industrie pharmaceutique pour la production et la commercialisation efficace et sécuritaire de ce collyre.
- ✓ L'idée du projet a émergé suite à une étude qui a révélé que la kératite est l'une des affections ophtalmologiques les plus courantes. Les personnes atteintes de la kératite peuvent souffrir des douleurs oculaires ainsi que la perte temporaire ou partielle de la vision, ce qui a un impact négatif sur leur bien-être. Sur le plan sociopsychologique, cela peut entraîner l'isolement social, le stress, l'anxiété et une baisse de la qualité de vie globale. Cependant, les traitements couramment prescrits, tels que les collyres antibiotiques, peuvent présenter des effets secondaires indésirables comme l'augmentation de la pression intraoculaire, l'irritation, la rougeur et les démangeaisons oculaires.

Ces données suggèrent la nécessité de trouver une alternative naturelle offrant un soulagement de cette maladie avec des effets secondaires réduits. Le produit en question est un collyre à base de champignon médicinale qui grâce à sa richesse en métabolites secondaires, en agents antibactériens, en agents antioxydant, en agents antidiabétique, en glucides, en acides gras, en protéines, en vitamines et en l'eau agit comme un antibiotique naturel.

- ✓ Cela se fait par la construction d'une unité de production équipé des installations nécessaires. Pour assurer la qualité du produit et répondre à la demande du marché, il est nécessaire d'installer des équipements adaptés pour le mélange des ingrédients, le conditionnement du produit, le contrôle de la qualité et éventuellement la stérilisation. Toutes ces étapes doivent être réalisées en respectant scrupuleusement les normes de fabrication afin de garantir la conformité et la fiabilité des collyres.

- ✓ Le choix de la zone industrielle de Ibn Badis comme lieu d'implantation à proximité d'autres unités de production vise à tirer parti des avantages liés aux synergies industrielles et à l'accès aux marchés existants. Cela favorisera la collaboration, les échanges de connaissances et de ressources, ainsi que les opportunités de partenariats commerciaux. De plus, cette localisation facilitera l'accès aux fournisseurs et à la chaîne d'approvisionnement partagée, ce qui permettra de réduire les coûts et les délais de livraison.

2. Les valeurs proposées :

Les valeurs proposées pour le projet de collyre naturel sont les suivantes :

- ✓ Produit naturel et respectueux de l'environnement : En développant un collyre à base de champignon souterrain médicinale et durable, on contribue à la préservation de l'environnement en évitant les produits chimiques agressifs.
- ✓ Produit efficace à effet thérapeutique : La combinaison d'ingrédients bio actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques permet d'offrir des bienfaits pour les yeux tels que la réduction de la pression intraoculaire, l'apaisement des irritations et des démangeaisons oculaires.
- ✓ Produit 100% Bio pour améliorer la puissance de la vision et préserver la santé des yeux.
- ✓ Produit local et de qualité.
- ✓ Confiance des consommateurs : En répondant à la demande croissante des consommateurs en matière de collyres naturels, on gagne la confiance des personnes soucieuses de leur santé et de l'environnement.
- ✓ Prix abordable avec une efficacité élevée : Le collyre naturel est proposé à un prix abordable tout en offrant une excellente efficacité, ce qui la rend accessible à un large public.

3. Équipe de travail

L'équipe de travail est formée de :

Équipe de projet	Faculté	Spécialité
1/ BEKKOUCHE Abir	Sciences de la Nature et de la Vie	Biochimie Appliquée
2/ GUENNICHE Amira	Sciences de la Nature et de la Vie	Biochimie
3/ BELLIL Ines	Sciences de la Nature et de la Vie	Biochimie et Biotechnologie
Les formations	<ul style="list-style-type: none">- Rédaction d'un brevet d'invention et droit d'auteur- Formation sur le business model et le business plan- Journée d'illustration à propos des types de soutenances (BMC, Brevet)- Un atelier de rédaction et de collecte de brevets, applications et services protégés par le droit d'auteur- Un atelier de dessin thinkig	
Les compétences	La communication. La maîtrise des outils informatiques. La maîtrise des langues étrangères.	
Les tâches	M1 : <ul style="list-style-type: none">✓ Organisation et planification des activités de production.✓ Gestion des ressources humaines de son organisation. M2 : <ul style="list-style-type: none">✓ Elaborer une stratégie de marketing.	

4. Objectifs du projet :

- ✓ Projet humain : L'objectif est d'aider à traiter les personnes souffrant de problèmes oculaires.

- ✓ Améliorer l'industrie pharmaceutique : L'objectif est de substituer les collyres chimiques par des collyres naturels à base des champignons souterrains médicinaux.
- ✓ Pénétrer le marché : L'objectif est de réussir l'entrée sur le marché en établissant le collyre comme un produit efficace et en suscitant la demande des consommateurs.
- ✓ Augmenter les ventes des collyres naturels : L'objectif est d'accroître progressivement les ventes du collyre en attirant de nouveaux clients et en fidélisant ceux déjà existants.
- ✓ Établir une part de marché : L'objectif est de se positionner en tant que leader sur le marché des collyres naturels à effets thérapeutiques, en conquérant une part significative du marché (35%).
- ✓ Notre marché initial se concentre dans la wilaya de Constantine, puis nous prévoyons de nous étendre progressivement à toutes les autres wilayas.
- ✓ Améliorer l'image du marché algérien : L'objectif est de créer une image du marché solide et valorisante, en mettant en avant les valeurs de naturalité, d'efficacité et de respect de l'environnement. Cela favorisera la confiance des consommateurs et la fidélisation de la clientèle (algérienne et étrangère).

5. Calendrier de réalisation du projet :

Semaine	1	2	3	4	5	6	7
Choix de lieu d'implantation et préparation des documents nécessaires	✓	✓					
Commande des équipements		✓	✓				
Construction d'un siège de production		✓	✓	✓			
Installation des équipements			✓	✓	✓		
Achats de matières premières						✓	
Réalisation du prototype							✓



Deuxième axe:
Aspects innovants

Deuxième axe : Aspects innovants

1. Nature des innovations :

Notre projet est une innovation radicale et innovation de marché.

Une innovation radicale consister en l'utilisation de nouvelles substances naturelles pour traiter des affections oculaires de manière plus efficace et durable, tout en minimisant les effets secondaires et en offrant des solutions plus efficaces, personnalisées et respectueuses de l'environnement. Il s'agit aussi d'un nouveau produit dans le marché algérien relatif aux collyres biologiques naturels.

2. Domaines d'innovation :

- **Nouveaux processus :** Le collyre naturel est principalement formulé à partir d'extrait de champignon souterrain médicinal obtenu par la technique de macération à froid, ce qui la distingue des autres collyres qui utilisent des produits chimiques. De plus, le collyre naturel est réalisé en utilisant une nouvelle technique d'extraction afin de préserver les propriétés thérapeutiques de ce champignon (Après le refroidissement puis le chauffage de ce champignon, la phase aqueuse est récupérée pour une utilisation ultérieure). Le processus de récupération des métabolites actifs des champignons souterrains a été choisi afin de préserver les effets thérapeutiques ces extraits, ce qui confère une plus grande efficacité de collyre.
- Le collyre "Bio Care Eye Drops" est un produit qui n'est pas prescrit uniquement comme une thérapie pour la kératite mais il est aussi considéré comme produit de prévention.
- Ce qui est nouveau pour notre projet c'est que notre produit a été formulé et fabriqué à base de champignons naturelles ce qui donne un produit 100% naturel qui a moins d'effet secondaires.
- Réduction de la pollution : Les fabricants de collyres peuvent adopter des pratiques de production plus durables pour réduire la pollution et minimiser les risques pour l'environnement.



Troisième axe:
Analyse stratégique du
marché

Troisième axe : Analyse stratégique du marché

1. Le segment du marché :

✓ Le marché cible et le marché potentiel :

Marché cible	Marché potentiel
<ul style="list-style-type: none">- Les personnes qui souffrent de troubles oculaires tels que la kératite, glaucome...- Les travailleurs dans des zones de pollution.- Les grossistes de parapharmacie.- Les centres de la phytothérapie.	<ul style="list-style-type: none">- Les personnes recherchant des produits naturels et bios pour améliorer la puissance de la vision et préserver la santé des yeux.- Les personnes qui cherchent à prévenir les affections oculaires.- Les professionnels de la santé tels que les médecins et les ophtalmologistes.- Les hôpitaux.

✓ Les contrats d'achat :

Concernant les contrats d'achat, on a trouvé que le meilleur moyen pour avoir des marchés d'approvisionnement que ce soit avec des institutions étatiques dans le cadre des marchés publics ou bien avec le secteur privé (entreprises et individus) c'est de faire d'abord des conventions avec des périodes d'essais des échantillons de notre produit. Ces périodes peuvent être trimestrielles ou semestrielles avec des différents types d'institutions (cités dans le tableau de marché cible et le marché potentiel) et après une période d'essai réussie et avoir des résultats positifs on passe aux contrats de vente- achat.

2. Mesure de l'intensité de la concurrence :

Pour notre produit « Bio Care Eye Drops » et après une étude analytique du marché on a pu désigner les plus importants concurrents sur le marché algérien comme suit :

✓ **Le groupe Biocare :**

Biocare, laboratoire pharmaceutique algérien, est un groupe industriel et commercial qui a investi au début de l'année 1998 dans le secteur pharmaceutique et qui dispose aujourd'hui d'une unité de production aux normes internationales et d'un réseau de distribution aux grossistes et aux pharmacies.

Les points forts et les points faibles du concurrent : le groupe **Biocare** est spécialisé dans la production et la commercialisation des produits pharmaceutiques, donc on parle toujours des effets secondaires non désirables par rapport à la composition chimique, en outre, notre produit est composé de produits naturels à 100 %.

✓ **Genericlab :** est l'un des premiers laboratoires pharmaceutiques privés algériens, producteur de médicaments génériques en Algérie. Il a été fondé pour répondre au besoin d'asseoir une industrie pharmaceutique locale à même de garantir la disponibilité des médicaments et améliorer l'accès des citoyens aux traitements.

Les points faibles du concurrent : **Genericlab** est spécialisé dans la production pharmaceutique ce qui fait que leurs produits contiennent des composants chimiques. Les points forts : citons leur ancienneté sur le marché algérien et la force de leur marque.

Produit	Points fortes	Ponts faibles
CIPROTEK	<ul style="list-style-type: none"> - Efficace. - Ancien. - Produit de qualité. 	<ul style="list-style-type: none"> - Chimique. - Liées à des effets indésirables à long termes. - Dysgueusie.
OBRAx	<ul style="list-style-type: none"> - Ancien. - La force de leur marque. 	<ul style="list-style-type: none"> - Produit à base des composées chimique. - liées à des effets indésirables tel que l'augmentation de la sécrétion lacrymale.
GATIFLOXACINE GL	<ul style="list-style-type: none"> - Remboursable. - Locale. - Ancien. 	<ul style="list-style-type: none"> - L'utilisation prolongée peut causer des effets indésirables graves.

3. La stratégie marketing :

✓ **Stratégie de visibilité :**

- Marketing numérique par les réseaux sociaux et stratégie des publicité payants ciblées pour promouvoir nos offres spéciales.
- Participation à des salons et évènements de santé ou des campagnes de sensibilisation à la kératite pour éduquer le public sur cette affection oculaire et les solutions naturelles disponibles.
- Collaboration avec des experts de santé et des influenceurs.
- Établissement de partenariats avec des pharmacies locales et des magasins de produit de santé.
- Site de la marque “Bio Care Eye Drops” contient toutes les informations utiles concernant notre collyre naturel.
- Organisation des sessions de formation.

✓ **Stratégie de distribution :**

- Réseaux de distribution avec les pharmacies et les cliniques ophtalmologiques.
- Logistique efficace et garde un inventaire adéquat pour répondre à la demande et éviter les ruptures de stock.
- Distribution en ligne pour toucher un public plus large.
- Des entreprises de livraison (Yalidine.....).

✓ **Stratégie de prix (vente) :**

- Analyse complète des coûts de production pour déterminer nos prix.
- Détermination du positionnement de nos collyres sur le marché (des collyres à hauts de gamme avec des caractéristiques uniques).
- Analyse complète des besoins de la clientèle cible et des prix pratiqués par nos concurrents directs.
- Possession du brevet qui confère à nos collyres un avantage concurrentiel.

✓ **Positionner notre marque :** C'est la plus importante stratégie pour rendre le collyre naturel concret au niveau du marché cible.

• **Le nom de marque ou le nom commercial du produit :**

Notre produit est un collyre naturel de marque "**Bio Care Eye Drops**" pour présente plusieurs aspects positifs :

1. **Pertinence :** Le nom fait directement référence au collyre naturel, ce qui est clair et précis en termes de communication.
2. **Mémorabilité :** "Bio Care Eye Drops" est facile à retenir et à prononcer, ce qui est important pour créer une marque reconnaissable.
3. **Sonorité :** Le nom a une sonorité dynamique et percutante, ce qui peut attirer l'attention des consommateurs.
4. **Association positive :** Le terme "Bio Care" suggère que le collyre peut traiter ou soulager les symptômes de la kératite et les affections oculaires, ce qui peut être attractif pour les personnes concernées.

• **Packaging attrayant et étiquetage clair :**

Dans le domaine des produits du traitement de l'œil. Le vert, le blanc et le bleu peuvent transmettre différentes significations :

- **Le Vert et le bleu :** sont souvent associés à la nature, à la fraîcheur et à la santé. Lorsqu'ils sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique des collyres, il peut évoquer l'idée de produits naturels, biologiques et respectueux de l'environnement. Cela peut attirer les consommateurs soucieux de la composition des produits qu'ils utilisent sur leur œil. Le bleu et le vert sont également considérés comme des couleurs apaisantes et calmantes.
- **Le Blanc :** est souvent associé à la pureté, à la propreté et à la clarté. Dans le domaine des produits du traitement de l'œil, il peut suggérer que le produit est pur, sans additifs nocifs, et qu'il vise à restaurer la santé de l'œil.

Le prototype





Quatrième axe: Plan de
production et d'organisation

Quatrième axe : Plan de production et d'organisation

1. Le processus de production :

Le processus de production est l'ensemble des étapes nécessaires à la conception et réalisation d'un collyre naturel fini.

Les étapes du processus de production d'un collyre naturel « Bio Care Eye Drops » sont les suivantes :

- ✓ L'achats des champignons souterrains.
- ✓ Le tri et le nettoyage des champignons souterrains.
- ✓ Le séchage de ces champignons à l'étuve, à température 40°C, pendant 20 jours.
- ✓ Le broyage de ces champignons pendant 1min à l'aide un broyeur électrique jusqu'à obtenir une poudre fine.
- ✓ L'extraction de métabolites actifs par macération dans le solvant méthanol (80%).
- ✓ L'évaporation de l'extrait hydro-méthanolique obtenu (concentration).
- ✓ Le Grattage de l'extrait brut sec.
- ✓ La préparation d'un mélange (l'eau distillée + l'extrait brut sec).
- ✓ L'agitation et l'homogénéisation de la solution.
- ✓ Le remplissage des flacons par le collyre.
- ✓ Le processus de conditionnement des collyres.



Distribution

- ✓ Les Consommateurs.

2. L'approvisionnement :

✓ Les principaux fournisseurs :

Matière première	Fournisseur	Cordonnés	Délai de livraison
Champignon souterrain	Centre Abou Arwa	Collo, Skikda 0555102592 0670120677	5 jours
L'eau distillée	Chettir Frères,SNC	Quartier Hamana BP 70F 10200 Lakhdaria, Alger 0550901855	3 jours
Emballage	Ideal flacon	Sidi yousef, Alger 0671928120	4 jours
	Alma produits	0665079735	2 jours

Equipement	Fournisseur	Cordonnés	Délai de livraison
Les matériels et les appareils	EURL SANTE MED PLUS	Cité 564 logt Ain El bey Bt 08 local 10- Constantine 031 69 00 00	15 jours

Les matières premières : (pour une quantité de 100 Flacons/J)

La matière première	Le prix (DA/Kg)	Les frais (DA/10Kg)	Le transport (DA/J)	Total (DA/J)
Les champignons souterrains	10000	100000	4000	104000

Le total du paiement dans l'année est de : 32.448.000 DA/ans

- La capacité de la ligne de production est (80 flacon/j -100 flacon/j), nous avons fixé le prix de vente (3500 DA/1flacon), et donc le chiffre d'affaires est égal à 93.600.000 DA/ans.
- Les jours de travail sur un mois sont 26 jours, (nous travaillons tous les jours sauf le vendredi).

Facture proforma des équipements

EURL SANTE MED-PLUS

Matériels de Laboratoires Médical, Réactifs et Consommables

Adresse: Cité 564 logt Ain El bey Bt 08 local 10 - Constantine

N° RC 25/00-0068736B10

Mat Fiscal 001025069020255

N° Article 25016498660

N° RIB 00100-8350300 000 079 / 61 BNA Agence El Khroub rccp 390 729/87

N° Nis 001025080024858

N° Tél / Fax 031 69 00 00

Facture Proforma N° : 111/2023

Constantine Le: 14/07/2023

Ref Article	Désignation	TVA	Qte	Prix HT	Montant HT
01	MELANGEUR	19%	01	6 100,00	6 100,00
02	RESERVOIR DE STOCKAGE	19%	01	6 000,00	6 000,00
03	SYSTEME DE FILTRATION	19%	01	5 750,00	5 750,00
04	SYSTEME DE REMPLISSAGE	19%	01	4 000,00	4 000,00
05	SYSTEME DE SOLLAGE	19%	01	7 700,00	7 700,00
06	ETIQUETEUSE	19%	01	9 400,00	9 400,00
07	SYSTEME DE CONTRÔLE QUALITE	19%	01	6 700,00	6 700,00
08	AGITATEUR	19%	01	15 200,00	15 200,00
09	ROTAVAPEUR	19%	01	25 000,00	25 000,00
10	DISTELATEUR	19%	01	45 600,00	45 600,00
11	REFRIGERATION	19%	01	35 000,00	35 000,00
12	BALANCE ELECTRONIQUE	19%	01	55 600,00	55 600,00
13	AUTOCLAVE 20 L	19%	01	100 000,00	100 000,00
14	ETLIVE 20L	19%	01	120 000,00	120 000,00
15	PH METRES	19%	01	1 600,00	1 600,00
16	BECHER 50 ML	19%	01	2 200,00	2 200,00
17	ERLENMEYER	19%	01	36 000,00	36 000,00
18	EPROUVETTE GRADUEE	19%	01	3 600,00	3 600,00
19	FISSETTE 500 ML	19%	01	600,00	600,00
20	TUBE A ESSAI + SUPPORT	19%	01	300,00	300,00
21	SPATULE	19%	01	48 400,00	48 400,00

TOTAL H.T	636 750,00
TOTAL T.V.A 19%	101 582,50
TOTAL T.T.C	636 732,50

Arrêtée la présente Facture à la Somme de :

Six Cent Trente-Huit Mille Sept Cent Trente Deux Dirhams Algérien Et 50 Centimes



✓ **Le type de paiement :**

Paiement à terme : Le paiement à terme est une méthode courante où nous convenez avec nos fournisseurs d'un délai de paiement après la réception des matières premières. Nous pouvons convenir de payer dans les 30 jours suivant la réception de la facture. Cela nous donne une certaine souplesse de trésorerie, mais il est important de respecter les délais de paiement convenus pour maintenir de bonnes relations avec vos fournisseurs.

3. La main d'œuvre :

✓ **3 salariés : (Ouvrier Professionnel niveau 1)**

- 1 Responsable du remplissage et conditionnement primaire.
- 2 Responsable de conditionnement secondaire et stockage.
- 1 agent de sucérite.

✓ **4 salariés :**

- Pharmacien chargé d'assurance qualité des matières premières et produit fini.
- Comptable pour élaboration des plans financier annuels de l'entreprise, analyse et évaluation des documents comptables, gestion des risques.
- Technicien de maintenance industrielle pour les pannes de la ligne.
- Chargé de marketing.

- ✓ Le montant du salaire est de 25.000 DA/ mois pour l'ouvrier professionnel niveau 1 et de 45.000 DA/mois pour les salariés diplômés.

Employeur	Totale en DA /mois
3 salariés (Ouvrier Professionnel niveau 1)	75.000
4 salariés	180.000

Le total du paiement des salariés dans l'année est de : 3.060.000 DA/ans.

4. Les Principaux partenaires :

Pour notre projet startup, on a un ensemble de partenaires qui affectent le processus de création et la mise en œuvre d'une façon directe ou indirecte. Dans cette partie on va citer les différents partenaires actuels et potentiels comme suit :

✓ **Les partenaires actuels :**

- Incubateur universitaire.
- Les laboratoires d'analyse.
- Les partenaires de distributions.
- Les partenaires de recherche.
- INAPI (L'Institut national algérien de la propriété industrielle).

✓ **Les partenaires potentiels :**

- ASF (Algerian Startup Fund).
- ANADE (l'Agence nationale d'appui et de développement de l'entrepreneuriat).
- Les sponsors.

BMC

Partenaires clés <ul style="list-style-type: none"> • Les partenaires de production pour fabriquer notre produit. • Les partenaires de distribution . • Les partenaires de recherche. • L'incubateur de l'université. • INAPI • Les sponsors. 	Activités Clés <ul style="list-style-type: none"> • Recherche et développement pour améliorer continuellement notre produit et développer de nouveaux produits. • Production et fabrication de notre produit. • Marketing et vente pour atteindre notre public cible. 	Propositions de valeur <ul style="list-style-type: none"> • Nouveau produit local. • Notre produit est un remède naturel innovant. • Produit est efficace, sans danger. • Produit respectueux de l'environnement 	Relation Client <ul style="list-style-type: none"> • Nous offrons un service client pour répondre aux questions des clients et des professionnels de la santé. • Les entreprises de livraison. • Les réseaux sociaux. • Téléphone. • Face à face. 	Clients <ul style="list-style-type: none"> • Les personnes souffrant de troubles oculaires. • Les personnes recherchant des produits naturels pour améliorer la santé des yeux. • Les personnes qui cherchent à prévenir les troubles oculaires. • Les travailleurs dans les zones de pollution. • Les professionnels de la santé tels que les médecins, les optométristes et les ophtalmologistes.
Ressources clés <ul style="list-style-type: none"> • L'équipe de recherche et développement. • Laboratoire équipé. • Local. • RH (resources humans). • Les partenaires de production. 		Canaux <ul style="list-style-type: none"> • site web. • Vente en gros. • Sensibilisation. 		
Coûts <ul style="list-style-type: none"> • Les coûts de recherche et développement. • Les coûts de production . • Les coûts de vente et de marketing. (Les coûts variables changent avec le changement de production)		Revenus <ul style="list-style-type: none"> • Vente directe aux consommateurs. • Vente en gros aux détaillants. • Vente en ligne via des Marketplace. 		