

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur et de

Master en sciences de la mer

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité : Biotechnologie Marine

Thème :

Préparation d'une variété d'émulsions à base de biomolécules marines aux propriétés pharmacologiques (cicatrisantes, anti-inflammatoires et antibactériennes).

Présenté par :

OULD RABAH Yasmine Djouher

SAHNOUN Alicia

Soutenu le 01/10/2022 devant le jury composé de :

M. REFES W.	Professeur	(ENSSMAL)	Président.
M. CHADER H.	Professeur	(Faculté de pharmacie d'Alger 1)	Promoteur.
Mme AMROUCHE L.	Maître assistante A	(ENSSMAL)	Co promotrice.
Mme DJAHNIT N.	Maître de conférences B	(ENSSMAL)	Examinatrice.
Mme BOUCHENAK F.	Maître assistante A	(Faculté de pharmacie d'Alger 1)	Examinatrice.

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

En tête de ces remerciements, nous rendons grâce à Dieu, qui nous a bénis dans ce travail et nous a donné la patience, la volonté et le succès pour réussir à y parvenir.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à Mme AMROUCHE Lynda et au professeur CHADER Henni, pour la qualité de leur encadrement exceptionnel, pour leur patience, rigueur et disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous tenons à témoigner toutes nos sincères reconnaissances aux personnes suivantes ; Mme GUERROUMI Houda ingénieure de laboratoire LBCM 2 à L'ENSSMAL, M. MATOUK Youcef, M. MEGARTSI Yacine ingénieur de laboratoire LBCM 3 à L'ENSSMAL, M. DJERRAI Noureddine ingénieur de laboratoire LBCM 1 à L'ENSSMAL, ainsi que, M. AIT KACI Malik, M. BENCHAAABANE Ahmed, et tout le personnel de l'ENSSMAL pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire.

Mme FELLAH Houda, pour son aide et son orientation lors de l'identification des espèces.

Mme BEN ABOU Amina, Mme AMMI Nassima, l'animalier, les résidentes et en particulier Soraya ainsi que tout le personnel de l'agence nationale des produits pharmaceutique.

M. BILT Ali de la pêcherie d'Alger pour nous avoir aidées lors de la collecte des échantillons des carapaces de crevettes, et des peaux de poissons.

Enfin, nous adressons nos remerciements aux personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui ont toujours été présents pour moi que ce travail soit accomplissement de vos vœux tant alléguez, et le fruit de votre soutien infaillible.

A mes sœurs Imane et Romaiïssa et à mon unique frère Samy.

A ma très chère grand-mère et à mes tantes en particulier Tata Zhor,

A mes oncles notamment Tonton Hakim

A mes amies, Leticia, Zohra en qui j'ai toujours trouvé soutien et confort

A ma binôme Yasmine merci de m'avoir accompagné durant cette aventure

A Tarik qui a toujours crus en moi et en mes capacités et qui m'a tant aidé durant mon cursus

A ma chère tante Djamila et à ses enfants que je considère comme une deuxième famille.

A Toutes la famille SAHNOUN

Et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SAHNOUN Alicia

Dédicace

Je dédie cet ouvrage

*A mes chers parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années
d'études.*

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A mes grand-mères qui ont partagé avec moi tous les moments
d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Elles m'ont
chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*

*A mes frères, mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines et à tous
mes proches qui me donnent de l'amour et de la vivacité.*

*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite
encore plus de succès.*

*A ma binôme Alicia de m'avoir accompagnée durant cette aventure et
de l'avoir rendue plus agréable.*

A tous ceux que j'aime.

*Et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation
de ce travail.*

OULD RABAH Yasmine Djouher

Table des matières

Remerciements	i
Liste des abréviations	ii
Listes des figures	iii
Liste des tableaux	v
Liste des annexes.....	vi
Introduction	1
Chapitre I. Étude Bibliographique	3
Partie A : Les bioressources marines et leurs exploitations biotechnologiques	
I.1. Le chitosane.....	4
I.1.1. Historique	4
I.1.2. Définition et structure chimique du chitosane	4
I.1.3. Propriétés du chitosane	5
I.1.3.1. Propriétés physico-chimiques	5
I.1.3.1.1. Le degré de désacetylation (DDA).....	6
I.1.3.1.2. La viscosité.....	6
I.1.3.1.3. Masse molaire	7
I.1.3.1.4. Solubilité	7
I.1.3.1.5. Caractère acido-basique	7
I.1.3.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques	8
I.2. Le collagène	8
I.2.1. Historique	8
I.2.2. Définition et structure du collagène.....	9
I.2.3. Caractéristiques physico-chimiques	11
I.2.4. Propriétés biologiques du collagène	11
I.2.5. Propriétés pharmacologiques et utilisations	11
I.3. Les huiles de poisson.....	12
I.4. Les extraits d'algues.....	12
I.4.1. Les polyphénols	13
I.4.1.1. Définition	13
I.4.1.2. Structure générale	14
I.4.1.3. Propriétés pharmacologiques	14

I.4.2. Les polysaccharides algaux	14
I.4.2.1. Définition	14
I.4.2.2. Propriétés pharmacologiques	15
I.4.3. L'extrait de <i>Codium bursa</i>	15
I.4.3.1. Intérêt pharmacologique	15
I.4.4. Les eaux d'algues	15
I.4.5. Les pigments	16
Partie B : Généralités sur les émulsions	
I.5. Les émulsions	17
I.5.1. Définition d'une émulsion	17
I.5.2. Compositions des émulsions	17
I.5.2.1. Stade lipophile	17
I.5.2.2. Stade hydrophile	17
I.5.3. Les types d'émulsions	17
I.5.3.1. Emulsion simple.....	18
I.5.3.2. Emulsion multiple	18
I.5.3.3. Les macro-émulsions	19
I.5.3.4. Les nano/mini-émulsions	19
I.5.3.5. Les microémulsions	19
I.5.4. Les émulsions cosmétiques et pharmaceutiques.....	19
I.5.4.1. Les pommades	19
I.5.4.2. Les crèmes	19
I.5.4.3. Les pâtes.....	20
I.5.4.4. Les laits	20
I.5.4.5. Les gels	20
I.5.5. Formulation d'une émulsion.....	20
I.5.6. Préparation d'une pommade	21
I.5.7. Procédé d'émulsification	22
Partie C : Histologie et physiologie de la peau	
I.6. Structure de la peau	23
I.6.1. L'épiderme.....	24
I.6.1.1. Les couches de l'épiderme	24
I.6.1.1.1. La couche basale	24

I.6.1.1.2. La couche épineuse	25
I.6.1.1.3. La couche granuleuse	25
I.6.1.1.4. La couche cornée.....	25
I.6.1.2. Les populations cellulaires.....	26
I.6.1.2.1. Les kératinocytes.....	26
I.6.1.2.2. Les mélanocytes	26
I.6.1.2.3. Les cellules de Langerhans	26
I.6.1.2.4. Les cellules de Merkel.....	26
I.6.2. La jonction dermo-épidermique	26
I.6.3. Le derme	27
I.6.3.1. Structure du derme	27
I.6.3.1.1. Derme papillaire	27
I.6.3.1.2. Derme réticulaire.....	27
I.6.3.2. La composition du derme.....	27
I.6.3.2.1. Les fibroblastes	27
I.6.3.2.2. Les autres cellules	28
I.6.3.2.3. La matrice extracellulaire.....	28
I.6.4. L'hypoderme	28
I.6.4.1. Population cellulaire	28
I.6.4.1.1. Les adipocytes	28
I.6.1.1.2. Les autres cellules	29
I.7. Les altérations de la peau	29
I.7.1. Les brûlures	29
I.7.1.1. Définition	29
I.7.1.2. Étiologie des brûlures	29
I.7.1.3. Physiopathologie des brûlures	30
I.8. L'inflammation.....	31
I.8.1. Les Anti-inflammatoires.....	31
I.8.1.1. Les anti-inflammatoires conventionnels	32
I.8.1.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	32
I.8.1.1.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)	32
I.8.1.1.3. Les anti-inflammatoire d'origine marine	32
I.9. La cicatrisation	32
I.9.1. Définition.....	33

I.9.2. Les différentes étapes de cicatrisation	33
I.9.2.1. La phase inflammatoire.....	33
a) Étape vasculaire.....	33
b) Étape inflammatoire	33
I.9.2.2. Phase proliférative.....	34
a) La formation d'un tissu de granulation	34
b) La ré-épithélialisation	34
I.9.2.3. La phase de remodelage	34
Chapitre II. Matériels et Méthodes.....	36
II.1. Matériel	37
II.1.1. Matériel biologique	37
II.1.2. Matériel non biologique	37
II.2. Echantillonnage.....	38
II.2.1. Collecte de la matière première.....	38
II.2.1. Identification de l'espèce de crevette	39
II.2.2. Prétraitement des carapaces de crustacés	39
II.3. Détermination de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes	39
II.3.1. Détermination de la teneur en eau	39
II.3.2. Détermination de la teneur et de la composition en matière minérale	40
II.3.2.1. Détermination de la teneur totale en matière minérale	40
II.3.3. Détermination de la teneur en protéine totales	41
II.3.4. Détermination de la teneur en lipides totaux	42
II.4. Extraction de la chitine et du chitosane	43
II.5. Caractérisation du chitosane produit.....	44
II.5.1. Rendement massique.....	44
II.5.2. Test de solubilité	44
II.5.3. Calcul du degré de déprotéinisation	44
II.5.4. Calcul du degré de déminéralisation	44
II.5.5. Calcul du degré de désacétylation	45
II.5.5.1. FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR)	45
II.6. Extraction d'eau d'algues	45
II.7. Extraction du collagène marin	46
II.7.1. Traitement des peaux.....	46
II.7.2. Méthode d'extraction du collagène marin.....	47

II.7.3. Mise en évidence du collagène extrait	48
II.7.3.1. Test de biuret	48
II.7.3.2. Test à la xanthoprotéine.....	49
II.7.4. Rendement massique du collagène marin	49
II.7.5. Détermination du poids moléculaire du collagène marin par SDS-PAGE	49
II.7.5.1. Principe de l'électrophorèse SDS-PAGE	50
II.7.5.2. Protocole de l'électrophorèse	51
II.8. Test de l'activité antibactérienne des principes actifs par la méthode de diffusion sur disques	53
II.9. Préparation des émulsions.....	54
II.9.1. Calcul et pesée des principes actifs et des excipients.....	55
II.9.2 Formulation des pommades.....	55
II.9.3. Préparation des pommades	56
II.9.4. Contrôle de qualité microbiologique des émulsions préparées	57
II.9.4.1. Dénombrement des germes aérobies totaux et des levures et moisissures totales DGAT et DMLT	57
II.9.4.2 Recherche de <i>Pseudomonas aeroginos</i> et de <i>staphylococcus aureus</i>	57
II.9.5. Détermination des propriétés pharmacologiques des différentes pommades préparées	57
II.9.5.1 Test de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	57
II.9.5.2 Test de l'activité cicatrisante <i>in vivo</i>	59
Chapitre III. Résultats et Discussion	64
III.1. Identification des espèces de crevettes	65
III.2. Composition biochimique globale des coproduits de crevettes.....	66
III.2.1. Taux d'humidité (teneur en eau).....	66
III.2.2. Teneur en matières minérale	66
III.2.2. Teneur en lipides	67
III.2.4. Teneur en protéines	67
III.3. composition minérale des coproduits de crevettes	68
III.4. Caractérisation du chitosane produit	69
III.4.1. Rendement massique.....	70
III.4.2. Solubilité.....	70
III.4.3. Caractérisation biochimique	71
III.4.4. Degré de désacétylation	72

III.4.4.1. Spectrophotométrie infrarouge (FTIR)	72
III.5. Mise en évidence du collagène extrait.....	73
III.5.1. Test du Biuret.....	73
III.5.2. Test à la xanthoprotéine	73
III.5.3. Rendement massique.....	74
III.5.4. Poids moléculaire du collagène déterminé Par SDS-PAGE.....	74
III.6. caractérisation spectrale des pigments hydrosolubles	75
III .7. Caractéristiques physico-chimiques des pommades préparées	76
III.7.1. Qualité microbiologique des produits fabriqués	78
III.8. Activité antibactérienne des principes actifs des pommades préparées	79
III.9. Activité anti-inflammatoire des pommades préparées	81
III.10. Activité cicatrisante des quatre pommades préparées	82
III.10.1. Étude comparative.....	85
Conclusion et Perspectives.....	89
Références bibliographiques	91
Annexes	102

Liste des abréviations

AGPI : Acide gras polyinsaturé ;

AMM : Autorisation de mise sur le marché ;

ANPP : Agence nationale des produits pharmaceutiques ;

BSA : bovine sérum albumine ;

CE : Conformité Européenne ;

CoTA : co-tensioactif ;

DA : Degré d'acétylation ;

DDA : Degré de désacétylation ;

DEM : Dose minimale érythémateuse ;

DHA : Acide docosahexaénoïque ;

DM : Degré de déminéralisation ;

DP : Degré de déprotéinisation ;

ENSSMAL : Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la mer et de l'Aménagement du Littoral ;

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier ;

H/E : Huile dans l'eau ;

pH : Potentiel d'hydrogène ;

PCA : Plate count agar ;

PEG : Polyéthylène glycol ;

PTA : Tensioactive ;

UV : Ultraviolets

Listes des figures

Chapitre I : Étude bibliographique

Figure I. 1 : Structure chimique du chitosane (Djelad, 2011).....	5
Figure I. 2 : structure du collagène marin (Ifremer, 2011).....	10
Figure I. 3 : La structure chimique du phénol (Manchado et Cheynier, 2006).....	14
Figure I. 4 : Les différents types d'émulsions. (Allouche, 2003).....	18
Figure I. 5 : Diagramme général du procédé de fabrication d'une émulsion (Dupasquier et <i>al.</i> , 2018).	23
Figure I. 6 : Schéma de la structure de la peau (Le dictionnaire visuel).	24
Figure I. 7 : Anatomie de la peau après brûlure de différents degrés (Claeyssen, 2009).....	31

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Figure II. 1 : Diagramme d'extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes	44
Figure II. 2 : Diagramme général extraction d'eau d'algue (Amrouche, 2021).....	46
Figure II. 3 : Diagramme général d'extraction du collagène marin à partir des peaux de poissons	48
Figure II. 4 : Diagramme de fabrication des pommades	56
Figure II. 5 : Diagramme détaillé du protocole du test anti-inflammatoire (Chader, 2019)	59
Figure II. 6 : Anesthésiant Kétamile et anxiolytique Midazolam utilisés dans cette étude	60
Figure II. 7 : Diagramme du protocole d'induction d'une brûlure de 3 ^{ème} degré.	61
Figure II. 8 : Traitement de référence (Madécassol)	62

Chapitre III : Résultats et discussions

Figure III. 1 : Espèces de crevettes identifiées.....	65
Figure III. 2 : Composition biochimique globale du mélange des coproduits de crevettes exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche (MS)	68
Figure III. 3 : Composition en matières minérales des carapaces de crevettes	69
Figure III. 4 : Pesée du chitosane produit à partir de 200 g des carapaces de crevettes.....	70
Figure III. 5 : Solubilisation du chitosane extrait de crevettes dans l'acide acétique à 1%	71
Figure III. 6 : Spectres FTIR du chitosane de crevettes produits.	72

Figure III. 7 : Mise en évidence de la présence du collagène avec la méthode de biuret	73
Figure III. 8 : Résultat du test à la xanthoprotéine	74
Figure III. 9 : Profil électrophorétique du collagène extrait en présence de dodécyl sulfate de sodium. Piste 1: marqueurs de haut poids moléculaire ; piste 2 : collagène extrait (échantillon).	75
Figure III. 10 : Activité antibactérienne des principes actifs des pommades préparées	80
Figure III. 11 : Potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) pour chaque traitement appliqué....	81
Figure III. 12 : Evolution des surfaces brûlées en cm ² durant 15 jours de traitement avec les quatre pommades préparées. Lot 1=pommade 1, lot 2=pommade 2, lot 3=pommade 3, lot 4=pommade 4, lot 5= témoin (+) (madécassol),	84
Figure III. 13 : Taux de réduction des surfaces brûlées après 15 jours de traitement avec les différentes pommades (témoin (+) = madécassol)	86

Liste des tableaux

Chapitre I : Étude bibliographique

Tableau I. 1 : Types de collagène (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005).	10
Tableau I. 2 : Les différents types d'émulsion simple (Dupasquier et al.2018).....	18

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Tableau II. 1 : Le matériel non biologique utilisé lors de cette étude	37
Tableau II. 2 : Formulation détaillée des pommades	55
Tableau II. 3 : Les traitements reçus par les différents lots de rats	62

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau III. 1 : Critères distinctifs des espèces identifiées (Fischer, 1987).....	65
Tableau III. 2 : Données comparatives de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes.....	66
Tableau III. 3 : Rendement massique du chitosane obtenu à partir des coproduits de crevettes rapportés dans la littérature	70
Tableau III. 4 : Degrés de déminéralisation et de déprotéinisation du chitosane produit.	71
Tableau III. 5 : degré de désacétylation du chitosane	73
Tableau III. 6 : Caractéristiques physico-chimiques des quatre pommades préparées.	76
Tableau III. 7 : Qualité microbiologique des pommades préparées.....	78
Tableau III. 8 : Activité antagoniste du chitosane, des polyphénols, des polysaccharides ainsi que des extraits méthanoïques de <i>Codium bursa</i> testée par la méthode de diffusion des disques sur gélose.....	79
Tableau III. 9 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème (PIO) des pommades.....	81
Tableau III. 10 : Descriptions macroscopiques des brûlures traitées avec les quatre pommades préparées ainsi que le madécassol durant 15jours (avec un intervalle de 5 jours).....	83

Liste des annexes

Annexe 1 : Prétraitement des peaux	102
Annexe 2 : Broyage et tamisage des carapaces de crevettes	102
Annexe 3 : Pesée des trois ballons contenant l'échantillon après leur passage par le rota vapeur	103
Annexe 4 : Pesée des principes actifs des pommades	103
Annexe 5 : Extracteur de Soxhlet.....	104
Annexe 6 : Incinération des échantillons dans le four à moufle	104
Annexe 7 : II – Composition des solutions de réactifs utilisées au cours de l'électrophorèse	104

Introduction

La biodiversité marine et la diversité chimique qui en découle mobilise un nombre croissant d'équipes de recherche dans le monde. En effet, avec plus de 25000 molécules décrites en plus de 40 ans de recherche, la mer a fourni six médicaments ainsi qu'une trentaine de molécules en phases d'essais cliniques et précliniques.

Le premier médicament d'origine marine a vu le jour en 1969: la cytarabine, également connue sous le nom d'Ara-C, Cytosar-U®, a été isolée à partir d'une éponge (*Cryptotheca crypta*); elle est indiquée dans le traitement des cancers hématologiques, notamment les leucémies aiguës. C'est une chimiothérapie utilisée par voie injectable bloquant la prolifération cellulaire par inhibition de l'ADN polymérase (l'enzyme principale de la réplication du génome).

Quelques années plus tard, en 1976, un autre médicament était encore tiré d'une éponge des Caraïbes (*Tethya crypta*), la vidarabine (Ara-A, Vira-A®). Il a été autorisé pour le traitement des infections par les virus de l'herpès. (Massiot, 2012)

Par la suite, le développement clinique des médicaments d'origine marine a connu moins de succès et s'est vu à l'arrêt pendant près de 30 ans faute de moyens d'extraction et d'exploitation des ressources marines.

Durant cette dernière décennie, la recherche pharmaceutique s'est outillée de la biotechnologie, ce qui a permis de reprendre et d'approfondir les recherches selon les exigences de l'industrie pharmaceutique. Cependant, l'exploitation irréfléchie des ressources marines fait frein à ce développement, de ce fait une nouvelle approche d'exploitation a été conçue, qui est la valorisation des coproduits marins ou des produits issus de l'aquaculture.

Les coproduits marins représentent une partie importante du poids du produit pêché. Seuls 50 % des produits de pêche sont directement consommés sous forme de filets ou de chair, et l'autre moitié qui est constituée de coproduit est rejetée, pourtant ces sous-produits regorgent de biomolécules à haute valeur ajoutée et aux nombreuses applications, ces molécules ont des caractéristiques exceptionnelles et sont souvent concentrées au niveau des carapaces, des écailles, des squelettes, des peaux et des coquilles.

Suivant une démarche d'économie bleue et de développement durable, la valorisation des coproduits permet d'optimiser les profits des entreprises de transformation, qui se spécialisent dans la production d'une matière première riche en biomolécules d'intérêt destinées aux secteurs de la santé, de la nutrition humaine et animale mais aussi en pharmaceutique, en

bien-être/ cosmétique, dépollution et énergie. La valorisation des coproduits marins constitue donc un véritable enjeu environnemental et économique.

Ainsi, l'objectif de ce travail est la préparation d'une variété d'émulsions à base de biomolécules marines aux propriétés pharmacologiques (cicatrisante, anti-inflammatoire et antibactérienne).

La présente étude fait suite à deux autres travaux antérieurs réalisés, dans le cadre de projets de fin d'études, par **Hamdi et Zidi (2020)** et par **Heddab et Kortbi (2020)**.

Le but est tout d'abord d'optimiser les rendements d'extraction des biomolécules bioactives (pigments, chitosane, collagène) à partir de différentes ressources marines.

Après la détermination de leurs propriétés pharmacologiques (activité antimicrobienne *in vitro* et activité anti-inflammatoire et cicatrisante *in vivo*), ces molécules ont été incorporées dans la préparation de diverses émulsions. Ces dernières sont testées à nouveau pour leurs activités pharmacologiques et comparées à celles existant dans le commerce.

Ce mémoire s'articule autour de trois volets :

- Dans le premier chapitre, une vision panoramique est donnée sur les différentes biomolécules marines issues de coproduits de crustacés et d'algues ainsi qu'un aperçu sur les émulsions et l'histologie de la peau.
- Le deuxième chapitre présente le matériel utilisé et décrit les protocoles expérimentaux adoptés pour l'évaluation de la composition chimique globale des coproduits, ainsi que les protocoles d'extractions et les méthodes de caractérisation des molécules extraites et les méthodes d'évaluation *in vivo* des activités anti-inflammatoires et cicatrisantes des pommades actives élaborées.
- Le troisième chapitre est consacré à l'interprétation des différents résultats obtenus.

Chapitre I. Étude Bibliographique

Partie A : Les bioressources marines et leurs exploitations biotechnologiques

Les océans pourraient bien être surnommés « la plus grande pharmacie du monde » : en effet, ils regorgent de molécules intéressantes d'un point de vue pharmacologique, dont certaines sont déjà sur le marché. La bioprospection, la pratique qui consiste à recenser toutes les espèces afin de les conserver mais aussi de les détourner à des fins utilitaires, est en plein essor dans les océans du globe. Parmi, les molécules à haute valeur ajoutée qui ont fait l'objet de cette étude, on peut citer :

I.1. Le chitosane

I.1.1. Historique

En 1811, le professeur Henri Braconnot, directeur du jardin botanique à Nancy (France), a été le premier à isoler une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée fongine. De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des plantes. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptères) et elle a été ensuite nommée chitine par Odier (chitine provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe).

Plus tard, la chitine fut extraite principalement des coproduits de pêche des crustacés qui en contiennent de 20-50% sur base sèche (**No et Meyers, 1999**).

En 1859, le professeur Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, ce n'est qu'en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler (**Jaouen, 1994**).

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau.

Aujourd'hui, il est acquis que la chitine et le chitosane se trouvent abondamment dans la nature et ces biomolécules sont des ressources renouvelables, non toxiques et surtout biodégradables. La production annuelle de chitine est estimée à 109-1010 tonnes et elle n'est pas très exploitée et commercialisée par rapport à la cellulose (**Peter, 2002**).

I.1.2. Définition et structure chimique du chitosane

Le terme chitosane, loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie, s'adresse à toute une famille de copolymères composés de N-acétyl D-glucosamine et de D-glucosamine en proportions variables (Felt, 1999).

Dans la nature, le chitosane est rare et n'est présent que dans les parois d'une classe particulière de champignons, les Zygomycètes (Rhizopus, Mucor, etc.) (Juang et al., 2002) et chez certains insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites (Seng, 1988).

Il est obtenu par désacétylation totale ou partielle de la chitine. On parlera de chitosane si le degré de désacétylation (D.D) est supérieur à 60% (David et al., 2004).

Le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6 respectivement (Figure I.1) Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés très intéressantes.

Ainsi, le chitosane est soluble dans les acides faibles, possède un fort potentiel en raison de son Caractère polycationique qui le distingue des autres polysaccharides et polymères naturels qui sont généralement anioniques (Djelad, 2011).

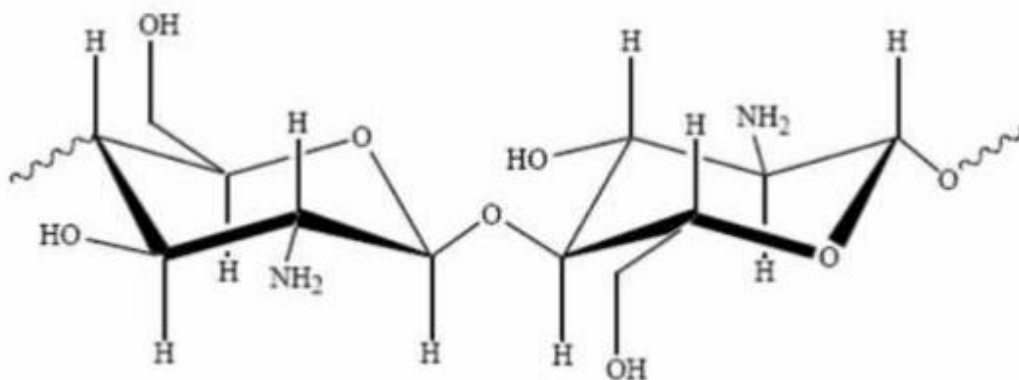


Figure I. 1 : Structure chimique du chitosane (Djelad, 2011).

I.1.3. Propriétés du chitosane

I.1.3.1. Propriétés physico-chimiques

Le chitosane est très stable en phase solide, avec une pression atmosphérique normale et un son taux d'humidité compris entre 10% et 14%. C'est un matériau non poreux aux formes physiquement modifiées. En raison de sa structure chimique particulière, le chitosane peut interférer avec quelques substances chimiques tels que, les ions et les macromolécules. Son comportement unique est lié :

- Au caractère hydrophile : en raison de la présence de groupes hydroxyle dans l'unité glucose qui peut former des ponts et des liaisons hydrogènes ou intramoléculaires ;
- Présence de groupes hydroxyles, acétamide et amines à forte réactivité ;
- Présence de structure flexible de la chaîne polymère (pH et température). Le chitosan a aussi un grand potentiel de rétention d'eau, chélation d'ions, complexation et adsorption des polymères ou des molécules (**Taouint, 2016**).

I.1.3.1.1. Le degré de désacétylation (DDA)

Suite au procédé de désacétylation, le chitosane devient riche en groupements amine hautement réactifs, ceci fait du degré de désacétylation un paramètre important qui influe sur les propriétés physico-chimiques telles que la masse moléculaire, la viscosité, la solubilité, la charge globale et la réactivité, les propriétés mécaniques comme l'élongation à la rupture, la résistance à la traction et les propriétés barrière. Il influe également sur les propriétés biologiques et donc détermine les applications du chitosane.

Le degré de désacétylation du chitosane varie de 56% à 99%, avec une moyenne 80 %, selon les espèces de crustacés et le mode d'extraction et de préparation (**Ben Dhieb, 2014**).

Le degré d'acétylation (DA) est défini comme la fraction molaire des unités Acétylées (unité acétylglucosamine). Degré de désacétylation ($DDA=1-DA$) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques.

On obtient le degré d'acétylation (DA) soit par titration volumique ou bien par méthodes spectroscopique comme l'Infrarouge IR proposée pour la première fois par Moore et Roberts en 1980 ou l'ultraviolet (**Taouint, 2016**).

I.1.3.1.2. La viscosité

La viscosité et le degré de désacétylation (DA) sont étroitement liés. En effet, plus le polymère est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et meilleure sera la viscosité (**Taouint, 2016**).

La viscosité dépend :

- De la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration),
- De la température (elle chute lorsque la température augmente)

- Du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire)
- Du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée).

I.1.3.1.3. Masse molaire

Le poids moléculaire du polymère est considéré comme l'une des propriétés les plus importantes affectant la fonction des polymères en question.

Parmi les différentes méthodes décrites dans la littérature, la chromatographie par perméation de gel, la plus couramment utilisée pour la détermination du poids moléculaire du chitosane.

Comme ses composants, le poids moléculaire du chitosane varie également en fonction de la source de la matière première et la méthode de préparation et d'extraction. D'une manière générale, une température élevée, des bases et acides forts entraîneront la dégradation du chitosane et la réduction de son poids moléculaire (**Taouint, 2016**).

I.1.3.1.4. Solubilité

Le chitosane est pratiquement insoluble dans l'eau et les solutions alcalines. Mais il est soluble dans une variété de solvants organiques, aqueux et légèrement acides. L'acide organique le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosane, est l'acide acétique dilué. En général, le chitosane se dissout complètement à pH 4 (**Taouint, 2016**).

I.1.3.1.5. Caractère acido-basique

Le chitosane est considéré comme une polyamine. La présence de la fonction amine primaire en position 2 du noyau glucopyranose lui confère des propriétés physico-chimiques remarquables. Ces propriétés dépendent fortement du pH du milieu et la présence ou l'absence de sel. En l'absence de ce dernier, le pH de la fonctionnalité amine est de 6,5. Cela voudrait dire qu'en dessous de cette valeur, le chitosane devient un polycation, ce qui le rend différent des autres polymères naturels qui sont généralement anioniques.

Les avantages du chitosane diffèrent de la plupart des polysaccharides. Il s'associe alors sélectivement aux espèces anioniques et constitue donc un excellent agent de floculation et ce qui permet de former des complexes polyanions-polycations.

A un pH supérieur à 6,5, le chitosane précipite. Il cède ses charges positives, et le doublet électronique de l'azote se libère. Ces doublets libres, ainsi que la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane, lui permettent de se comporter comme un excellent

complexant des métaux lourds. L'absence des groupements ionisés dans la chaîne macromoléculaire procure une bonne propriété chélatante aux polymères. Le chitosane est décomposé, sans fonte, à partir de 185°C. **(Taouint, 2016)**.

I.1.3.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour son utilisation thérapeutique potentielle. Elle est caractérisée principalement par trois propriétés : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité. Le chitosane présente l'avantage de réunir également d'autres propriétés très intéressantes, il agit comme un bactériostatique et un fongistatique **(Peh et al., 2006)**.

En effet, le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes, bactéries, virus, champignons, et levures **(Du et al., 2009)**. En général, les moisissures et les levures sont les plus sensibles au chitosane suivies des bactéries.

Le chitosane possède aussi des activités biologiques, notamment des activités anti-inflammatoire, antioxydante **(Ngo et al., 2009)**, antitumorale **(Wang et al., 2008)**, immunomodulatrice **(Lee et al., 2008)**, anti-ulcère **(Rasmussen et Morrissey, 2008)** ou encore hypocholestérolémiant et anti-hypertensive **(Kim et al, 2008)**. Le degré d'acétylation du chitosan a un rôle crucial dans sa bioactivité.

Par conséquent, le chitosane a plusieurs applications commerciales. Dans l'industrie alimentaire, il peut être utilisé comme bioadhésif, additif alimentaire. Il est, aussi, utilisé pour le traitement des eaux, dans l'agriculture, comme base cosmétique, dans le secteur pharmaceutique et nutraceutique **(Oulhiz, 2018)**.

I.2. Le collagène

I.2.1. Historique

A l'heure actuelle le principal tissu utilisé pour l'extraction du collagène est la peau de bœuf et de porc **(Portier, 2016)**, l'exploitation de cette matière se heurte à deux difficultés, d'une part la collecte de la peau ne s'effectue pas dans les meilleures conditions sanitaires, d'autre part un prétraitement de la peau est nécessaire afin d'éliminer les poils et les tissus pré-cutanés, ce travail est réalisé grâce à une installation et un atelier de transformation ; une telle infrastructure requière un investissement qui se répercute sur le coût du collagène obtenu.

La peau de bœuf fournit une faible quantité de collagène (pour 1kg de peau fraîche 12g de collagène est extrait).

Afin d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction, une nouvelle technologie dans le domaine d'extraction a vu le jour et grâce à la biotechnologie, l'idée d'extraction du collagène marin à partir de la peau du poisson plat tels que la sole et la raie s'est développée.

Cependant, cette extraction du collagène marin fait face à un problème de pigmentation de la peau qui engendre par la suite une extraction de biomatériau pigmenté impur. De ce fait la meilleure façon pour une extraction optimale du collagène marin est l'extraction à partir de la peau ventrale, qu'on retrouve en grande majorité chez les poissons plats disponibles en grandes quantités et pêchés de façon industrielle comme la sole, la raie, le barbeau et le turbot, dont la préparation des filets nécessite un pelage.

I.2.2. Définition et structure du collagène

Le collagène fait partie d'une famille de protéines dites structurales, le plus souvent présente sous forme fibrillaire. Il est présent dans la matrice extracellulaire des organismes animaux.

Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement et sont indispensables au processus de cicatrisation.

C'est la protéine la plus abondante du règne animal, représentant le quart environ de la masse protéique des mammifères. Il est présent dans les os, le cartilage, l'interstitium pulmonaire, les muscles et les parois des vaisseaux. Sécrété par les cellules des tissus conjonctifs, il a une masse moléculaire de 300 kDa.

Le collagène à l'état natif est constitué de trois chaînes polypeptidiques d'environ 1050 acides aminés associées en triple hélice. Le collagène comporte trois chaînes alpha (α_1 , α_2 et/ou α_3) associées en triple hélice, laquelle triple hélice de collagène est qualifiée de chaîne gamma (γ). S'il existe différents types de collagènes, le collagène de type I reste le plus abondant dans les organismes des vertébrés. Ce collagène de type I consiste en l'association en triple hélice de deux chaînes α_1 à une chaîne α_2 .

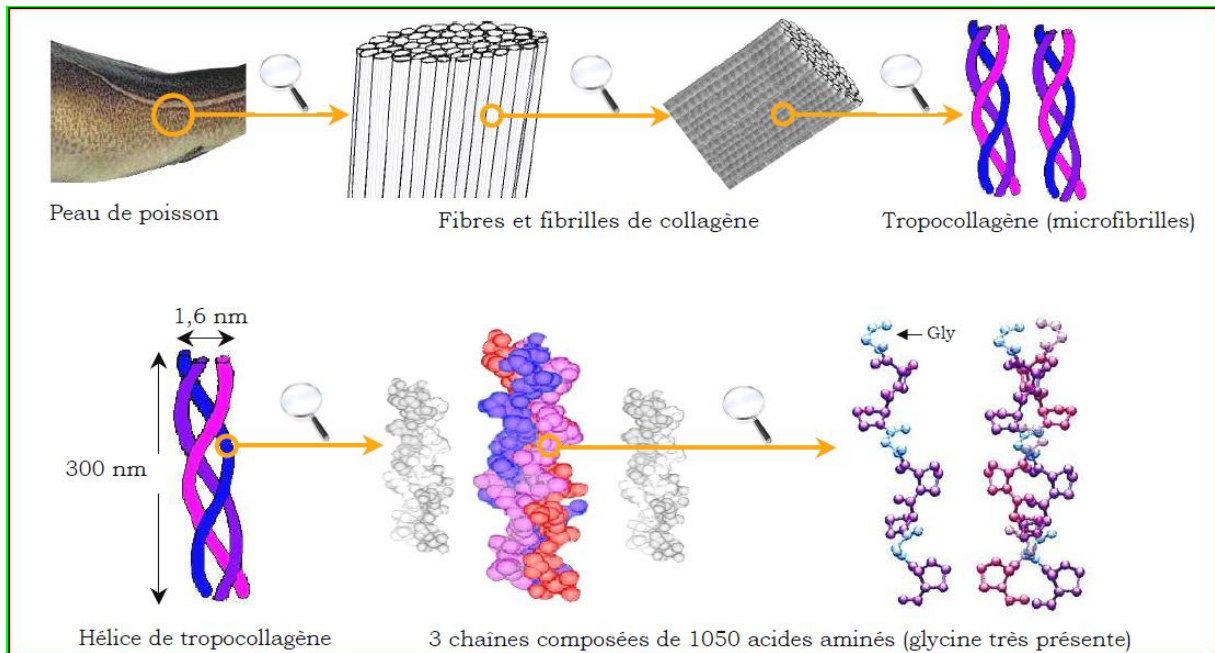


Figure I. 2 : structure du collagène marin (Ifremer, 2011)

- Le collagène marin est extrait de peaux, d'arêtes ou d'écaillés des poissons qui représentent 30% des coproduits issus de la transformation des produits de la mer (Uriarte-Montoya *et al.*, 2010 et Sionkowska *et al.*, 2015).

Il existe différents types. Ces derniers sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau I. 1 : Types de collagène (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005).

Types de collagène	Propriétés
Type I	Le plus abondants 90%, assure la résistance à la traction
Type II	Assure la résistance à la pression intermittente
Type III	Présent dans les organes où les échanges sont importants
Type IV	Support de filtration du tissu épithélial et endothélial

I.2.3. Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques sont résumées ci-après :

- Le contenu en substances minérales totales est déterminé par calcination jusqu'à poids constant ($\approx 0,35\%$)
- Le contenu en azote est déterminé par la méthode de Kjeldahl ($\approx 14\%$).
- Le point isoélectrique est déterminé par titrage acido-basique et par turbidimétrie ($\approx 7,8$).
- La masse molaire est déterminée par électrophorèse et chromatographie d'exclusion stérique (gel filtration ou encore perméation de gel) (≈ 300 kD).

I.2.4. Propriétés biologiques du collagène

Les principales propriétés du collagène sont les suivantes :

- Stimule le développement cellulaire et la régénération tissulaire
- Pouvoir hémostatique
- Très bonne biocompatibilité et biodégradabilité
- Support naturel conférant une meilleure biodisponibilité à de nombreux actifs.
- Capacité de rétention d'eau et propriétés filmogènes

I.2.5. Propriétés pharmacologiques et utilisations

Les principales utilisations du collagène marin sont :

- **En cosmétique**, il est utilisé comme hydratant et tenseur. Il est très proche de collagène néosynthétisé au sein du tissu dermique, il aide ainsi à :
 - La prévention de la déshydratation cutanée et effet de lissage
 - La lutte contre le vieillissement tissulaire
- **En biomédical pour :**
 - La réalisation d'éponges hémostatique pansements cicatrisants
 - La création de peaux artificielles

- L'obtention de matériaux de reconstitution osseuse

Les gels de collagène hydratés associés à de fibroblaste permettent d'obtenir un derme équivalent. Ce tissu est ensuite ensemencé par des cellules de l'épiderme pour devenir une peau équivalente.

Les matrices de collagènes ordonnées miment les hiérarchies structurales des tissus conjonctifs riches en collagène : derme, os ou tendon.

- **En alimentation et nutraceutique** pour la réalisation de capsules pour la protection de principes actifs et l'amélioration de leur biodisponibilité.

I.3. Les huiles de poisson

L'huile de la plupart des poissons, tout comme les fruits de mer et certaines algues, est une source d'acide eicosapentaénoïque (AEP) et d'acide docosahexaénoïque (ADH), 2 acides gras de type oméga-3. On les nomme les acides gras marins. Le corps humain peut fabriquer ces acides gras à longue chaîne à partir d'un oméga-3 d'origine végétale, l'acide alpha-linolénique (AAL), mais en très petites quantités.

L'AEP participe à l'élaboration d'eicosanoïdes de série 3, des substances qui jouent un rôle central dans les membranes cellulaires. Les eicosanoïdes de série 3 participent à de très nombreux processus biochimiques dans l'organisme : régulation de la tension artérielle, maintien de l'élasticité des vaisseaux sanguins, réactions immunitaires et anti-inflammatoires, agrégation des plaquettes sanguines, développement et fonctionnement du cerveau, etc.

Le DHA joue un rôle mineur au chapitre des eicosanoïdes, mais produit des substances appelées protectines et résolvines qui contribuent à la résolution des inflammations. Une grande partie de l'huile de poisson est un sous-produit de l'industrie de la pêche. Elle est tirée des restes de la transformation du poisson (filets, darnes, conserves, etc.) (**Turon, Villeneuve et Pina, 2004**).

I.4. Les extraits d'algues

Les algues jouent un rôle fondamental dans l'équilibre de la planète en contribuant à 50 % de la production d'oxygène et en fixant 40 % du gaz carbonique. Elles constituent également une source prometteuse de molécules originales pour des applications variées telles que la santé, l'alimentation humaine et animale, la cosmétique, l'énergie, l'ingénierie de l'environnement,

etc... En aquaculture, elles sont une source indispensable de nourriture pour de nombreux élevages.

Ceci se justifie par :

- Un fort taux d'humidité : Elles sont constituées à 90% d'eau, contenue essentiellement dans la vacuole de la cellule, ainsi que dans le cytoplasme et la paroi cellulaire.
- La présence d'une fraction minérale variée, bioassimilable et équilibrée qui constitue un apport important de macroéléments et oligoéléments,
- La présence de protéines en générale bien équilibrées en acides aminés et présentes en quantités non négligeables dans certaines espèces,
- Un contenu vitaminique varié,
- Une fraction lipidique faible mais cependant, dans certaines espèces riche en acides gras polyinsaturés et enfin par leur contenu en fibres ayant des structures variées et originales différentes des fibres des végétaux terrestres.

Néanmoins, la composition chimique des macroalgues marines varie suivant plusieurs facteurs : L'espèce, le stade de maturité, l'habitat naturel et les conditions environnementales (**Ortiz et al., 2006**).

I.4.1. Les polyphénols

I.4.1.1. Définition

Le terme «polyphénol» est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisations pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux, dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (**Macheix et al., 2005**).

Ce sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide et ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont, les flavonoïdes et les tannins (**Boizot et Charpenter, 2006**).

Les polyphénols marins, présents dans les macro-algues, sont appelés phlorotannins et sont différents des polyphénols terrestres. Ce sont des polymères de phloroglucinol (1,3,5-

trihydroxybenzene). Ils forment un groupe de molécules très varié en fonction de leur structure et de leur degré de polymérisation, ce qui leur confère des activités biologiques différentes.

I.4.1.2. Structure générale

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique (figure I.3.), et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants (**Salunkhe, 1990**).

Ils constituent l'un des groupes chimiques les plus nombreux et les plus répandus parmi le règne végétal, avec plus de 8000 structures connues actuellement. Les phénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques à des composés les plus généralement déclinés ont un poids moléculaire d'environ 5000 Da. Cependant des polymères de plus de 30000 Da ont déjà été décrits (**Bravo, 1998**).

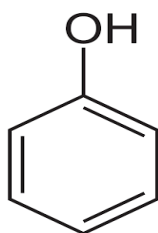


Figure I. 3 : La structure chimique du phénol (**Manchado et Cheynier, 2006**).

I.4.1.3. Propriétés pharmacologiques

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives, largement utilisés pour leurs vertus thérapeutiques comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, anti-radicalaires et antimicrobiens (**Bruneton, 1993**).

I.4.2. Les polysaccharides algaux

I.4.2.1. Définition

Les polysaccharides végétaux sont définis comme des biopolymères de haut poids moléculaire provenant principalement des plantes et des algues, ils sont constitués de longues chaînes d'unités mono-saccharidiques liées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ces chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées.

Le fort intérêt des macroalgues réside non seulement dans leur richesse en polysaccharides classiques, comme ceux trouvés dans des plantes supérieures (amidon, cellulose), mais surtout

dans leur richesse en polysaccharides très particuliers : les phycocolloïdes (18 à 45% de la masse sèche chez les algues brunes) (Person, 2010). Ces polysaccharides sont présentés par les alginates, les agars, les carraghénanes, les ulvanes et les fucoidiens.

I.4.2.2. Propriétés pharmacologiques

Les polysaccharides sont devenus aujourd'hui une source importante de composés naturels bioactifs responsables de plusieurs activités biologiques.

Ils montrent des activités antitumorales, anticoagulantes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antivirales (Lakhdar, 2018).

I.4.3. L'extrait de *Codium bursa*

Le *Codium* en boule, algue feutrée en boule ou « béret basque » (*Codium bursa*) est une espèce d'algues vertes de la famille des *Codiaceae*

- **Classification selon AlgaeBase**

Empire : Eukaryota

Règne : Plantae

Embranchement : Chlorophyta

Classe : Ulvophyceae

Ordre : Bryopsidales

Famille : Codiaceae

Genre : *Codium*

Espèce : *Codium bursa* (C. Agardh 1817)

I.4.3.1. Intérêt pharmacologique

Codium bursa regorge de polyphénols et de polysaccharides sulfatés dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire et antibactérienne ont été démontrées (Lakhdar, 2018) et suscitent un grand intérêt sur le plan pharmacologique.

I.4.4. Les eaux d'algues

Il s'agit d'un macérât d'algues dans de l'eau, jouant le rôle de solvant, afin d'extraire des principes actifs.

L'eau d'algue est un concentré de substances vitales dans lequel les molécules organiques actives et les sels minéraux sont en synergie. L'utilisation des eaux d'algues (nommée aussi suc natif ou la sève nutritive des algues) permet de redonner à la peau tous les éléments minéraux fondamentaux dont elle a besoin, sous une forme bioassimilables et équilibrées (Puspita *et al.*, 2020).

I.4.5. Les pigments

La couleur des algues est dû aux pigments qu'elles contiennent ou ne contiennent pas. Ainsi on peut découvrir des algues vertes, rouges, roses, jaunes, brunes, oranges, noires, des grises voire même des blanches, des violettes et des bleues. Certaines algues parasitent d'autres espèces et nous apparaissent blanches. Mais la majorité des algues possède des pigments qui les colorent. C'est ainsi que la chlorophylle (pigment à l'origine de la photosynthèse), nous apparait vert car les radiations vertes ne sont pas absorbés par la molécule.

Ainsi, la chlorophylle *a* est présente chez les végétaux terrestres et aquatiques. Sa présence est nécessaire au déroulement de la photosynthèse chez toutes les algues photosynthétiques. Chez les Chlorophytes et les Euglénophycées, elle est associée à de la chlorophylle *b*. Les algues brunes, les Diatomées, les Dinophytes, les Cryptophytes et les Haptophytes, renferment en plus de la chlorophylle *c* alors que les Cyanobactéries et les Rhodophycées contiennent de la chlorophylle *d*.

Les phycobiliprotéines sont des molécules hydrosolubles comportant une partie protéique liée de façon covalente à des chromophores ou bilines. Ces derniers sont composés de groupes tétrapyrroliques non cyclisés.

On distingue trois familles de phycobiliprotéines, les phycoérythrines (rouges), les phycocyanines (bleues) et les allophycocyanines (bleu turquoise) dont les chromophores sont respectivement les phycoérythrobilines, phycocyanobilines, et phycourobilines. Ces pigments peuvent coexister dans une même espèce, mais la phycoérythrine domine chez les Rhodophytes tandis que la phycocyanine est plus abondante et parfois seule présente chez les algues bleues (Cyanophytes). Localisés à la surface des thylacoïdes des algues rouges et bleues, ces pigments jouent le rôle d'antennes collectrices de photons. Leur rôle physiologique est de capter les photons de longueurs d'ondes différentes de ceux captés par les chlorophylles et de transférer cette énergie aux complexes chlorophylliens. La quantité de ces pigments varie en fonction de l'intensité lumineuse à laquelle sont exposées les cellules

(Dumay et Morançais, 2016).

Partie B : Généralités sur les émulsions

I.5. Les émulsions

I.5.1. Définition d'une émulsion

« Les émulsions sont des préparations généralement liquides, destinées à être administrées telles quelles ou à être utilisées comme excipient. » **Pharmacopée Française 1987.**

Une émulsion se définit comme la dispersion de deux phases liquides non miscibles. C'est un mélange de solutions lipophile et hydrophile se caractérisant par la présence de deux phases distinctes dont l'une est dispersée dans l'autre. On appelle phase dispersée ou phase discontinue, le liquide formant des gouttelettes, alors que l'on désigne le second fluide comme étant la phase dispersante ou la phase continue (**Stig Friberg et al., 2003**).

I.5.2. Compositions des émulsions

En général, une émulsion est composée de deux phases : une phase hydrophile et une phase lipophile. Il existe également d'autres appellations pour ces phases.

I.5.2.1. Stade lipophile

La phase lipophile, également appelée phase grasse, phase huileuse ou phase organique, est généralement constituée d'un mélange d'ingrédients d'origines diverses. Il peut s'agir d'huiles, de graisses et/ou de cires sous forme liquide, semi-solide et solide, respectivement, à température ambiante. Des substances synthétiques peuvent également être utilisées.

I.5.2.2. Stade hydrophile

La phase hydrophile, également appelée phase aqueuse, contient généralement de l'eau et des composés solubles appelés composés hydrosolubles dans la phase aqueuse. Selon le domaine d'application (alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique) et le type d'émulsion, différentes substances peuvent être ajoutées à la phase lipophile ou hydrophile pour conférer différentes propriétés au produit. Ces différents composants sont répartis entre les deux phases en fonction de leur solubilité.

I.5.3. Les types d'émulsions

On peut classer les émulsions suivant deux critères :

- Le premier critère est selon la nature de la phase dispersante

Il existe essentiellement deux types d'émulsions : les émulsions simples et les émulsions multiples (**Rosen et Kunjappu, 2012**)

I.5.3.1. Emulsion simple

Une émulsion simple est une émulsion composée d'une phase hydrophile, d'une phase lipophile et d'un émulsifiant, en fonction de la phase dispersante, il existe deux types d'émulsions simples : les émulsions huile dans eau (H/E) et les émulsions eau dans l'huile (E/H). (Tableau I.2) (**Djebbar, 2019**).

Tableau I. 2 : Les différents types d'émulsion simple (**Dupasquier et al.2018**).

Sens de l'émulsion	Phase dispersée	Phase dispersante	Symbole
Emulsion huile dans l'eau (Emulsion de type aqueuse)	Lipophile	Hydrophile	(huile/eau)H/E
Emulsion eau dans de l'huile (émulsion de type huileuse)	Hydrophile	Lipophile	(eau/huile)E/H

I.5.3.2. Emulsion multiple

C'est une émulsion simple dispersée à son tour dans une phase continue externe. Ces dernières sont de type E/H/E ou H/E/H. (Figure I.11) (**Rosen et Kunjappu, 2012**).

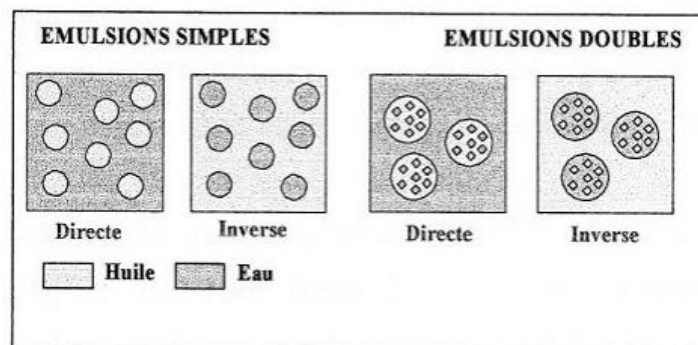


Figure I. 4 : Les différents types d'émulsions. (**Allouche, 2003**)

I.5.3.3. Les macro-émulsions

Ce sont des émulsions grossières dont le diamètre des gouttes est de 1 à 10 μm .

I.5.3.4. Les nano/mini-émulsions

Elles présentent des micro-domaines qui ne sont pas nécessairement sphériques, de petites dimensions, typiquement de l'ordre de 0,1 à 1 μm .

I.5.3.5. Les microémulsions

Elles sont décrites comme des systèmes biphasiques composés de gouttelettes très fines (10-200 nm) d'un liquide dispersés dans un autre liquide.

I.5.4. Les émulsions cosmétiques et pharmaceutiques

I.5.4.1. Les pommades

Selon l'académie nationale de pharmacie :

Une pommade est une : « *préparation semi-solide destinée à être appliquée le plus souvent sur la peau. Il existe aussi des pommades pour application sur les muqueuses, les phanères ou les yeux. Leur but est soit la libération locale ou transdermique de substances actives, soit une action émolliente ou protectrice. Selon la Pharmacopée européenne, les pommades sont des préparations faites d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dispersés des liquides et des solides* ».

On distingue : trois types de pommades dont :

- 1- Les pommades hydrophobes qui ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau.
- 2- Les pommades absorbant l'eau, capables de conduire à des émulsions après homogénéisation, en présence d'émulsifiants.
- 3- Les pommades hydrophiles, dont les excipients sont miscibles à l'eau (**Dupasquier et al., 2018**).

I.5.4.2. Les crèmes

Les crèmes ou émulsions épaissies sont des préparations multiphasiques. Elles sont en général constituées :

- d'une phase lipophile (huileuse...)
- d'une phase hydrophile (aqueuse...)

Pour stabiliser les deux phases, il est nécessaire d'ajouter :

- un ou plusieurs tensioactifs
- un agent épaississant ou viscosant (**Dupasquier et al., 2018**).

I.5.4.3. Les pâtes

Ce sont des préparations semi-solides contenant de fortes proportions de poudres (> 50%) finement dispersées dans l'excipient, on distingue 2 types de pâtes :

- Pâte lipophile ou hydrophobe : excipient = corps gras ou mélange de corps gras
- Pâte hydrophile : excipient à base d'eau + excipient miscible à l'eau

I.5.4.4. Les laits

Ceux sont des émulsions constituées majoritairement d'eau, mais contiennent aussi de nombreux nutriments, dont la matière grasse (environ 3,5 % pour le lait entier) qui se présente sous la forme de globules microscopiques. Ça correspond à de minuscules gouttelettes de matière grasse en suspension dans l'eau.

Cependant, cette émulsion n'est pas stable. Au bout d'un certain temps, on assiste à une séparation de phases : les globules gras se rapprochent les uns des autres puis s'agglutinent, tout en remontant vers la surface car ils sont plus légers que l'eau.

I.5.4.5. Les gels

Ce sont des préparations constituées par des liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés, il existe une variété de gels :

- **Oléo gels ou gels hydrophobes:**

Dont les excipients sont composés de: paraffine liquide + PE (polyéthylène), huiles grasses gélifiées par de la silice colloïdale ou savons d'aluminium ou de zinc.

- **Hydrogels ou gels hydrophiles** : dont les principaux composants sont les :

- solvant(s) hydrophile(s): eau, glycérol, propylène glycol
- agents épaississant et/ou gélifiants : gomme adragante, alginates, dérivés cellulosiques, polymères carboxyviniliques...) (**Dupasquier et al., 2018**).

I.5.5. Formulation d'une émulsion

Selon leurs différentes formes (crème, pommade, émulsion...), les produits semi-solides ont une composition à peu près identique :

➤ **Principe actif**

C'est une substance qui détermine l'activité spécifique de la préparation. Il peut s'agir d'huiles animales ou végétales, des extraits de plantes ou autres, ajoutés à faible dose.

➤ **L'excipient**

C'est une substance dont le rôle est de communiquer les principes actifs qu'elle contient, il agit sur les cellules qui exercent des effets thérapeutiques. Il se présente sous la forme galénique (comprimés, sirops, aérosols, injections, Pommade, etc...). Il est à noter que le volume de l'excipient est toujours bien supérieur à celui du principe actif.

Les pommades sont constituées d'excipients qui peuvent être des substances de sources naturelles ou synthétiques. Il est constitué de systèmes monophasés ou multiphasés, selon leur nature, les formulations peuvent être hydrophiles ou lipophiles.

L'excipient idéal doit répondre à de nombreux critères : il doit être facile à appliquer et à éliminer, non toxique, non irritant, non allergène, chimiquement stable et homogène.

➤ **Tensioactif**

En chimie le tensioactif est une molécule amphiphile, c'est-à-dire qu'il a à la fois une partie hydrophile polaire et une autre partie hydrophobe non polaire, donc il possède une double affinité avec les phases hydrophile et non hydrophile. Il est placé à l'interface de ces deux phases et permet de ce fait la chute de la tension inter-faciale. Ainsi, cela permet de dissoudre les deux phases initialement non miscibles.

Dans le cas des émulsions, les tensioactifs utilisés sont appelés émulsifiants ou émulsification. Il aura une affinité avec la phase hydrophile (eau) et la phase lipophile (grasse). Les tensioactifs sont essentiels dans les émulsions. En préparation, dans le cas des émulsions, l'étape d'agitation permet au tensioactif de faciliter la dispersion d'une phase dans une autre sous forme de gouttelettes. Ils assurent également une stabilité de l'émulsion dans le temps et ce en inhibant la coalescence des gouttelettes (**Dupasquier et al., 2018**).

I.5.6. Préparation d'une pommade

Selon la définition de la Pharmacopée, utiliser des préparations semi-solides à usage cutané doit être uniforme. Il faut donc préparer un produit crémeux et homogène facilement applicable, pour cela les composants solubles et insolubles sont mélangés jusqu'à ce qu'ils soient complètement dispersés et invisibles.

Les préparations s'effectuent en 2 étapes :

- Mélange des excipients pâteux qui s'effectue le plus souvent après liquéfaction des excipients en commençant soit par celui qui a le point de fusion le plus élevé, soit dans l'ordre des quantités croissantes.
- L'addition des principes actifs solides ou liquides qui s'effectue en fonction :
 - De la solubilité du principe actif dans les excipients utilisés
 - De l'insolubilité du principe actif : s'il est liquide, on pourra l'émulsionner et s'il est solide, on le dispersera dans une suspension après l'avoir réduit en poudres fines et tamisé pour éviter tout effet abrasif (**Aiache et al., 2004**)

I.5.7. Procédé d'émulsification

Le choix du procédé d'émulsification est une étape importante. En effet, selon le choix des différents paramètres du procédé, différents types d'émulsions (simple E/H, H/E, multiple, etc.) peuvent être obtenues à partir d'une même formulation.

Les variables de processus susceptibles de changer sont :

- L'ordre dans lequel les ingrédients sont ajoutés.
- La température.
- La vitesse et durée d'agitation.
- la géométrie du mélangeur

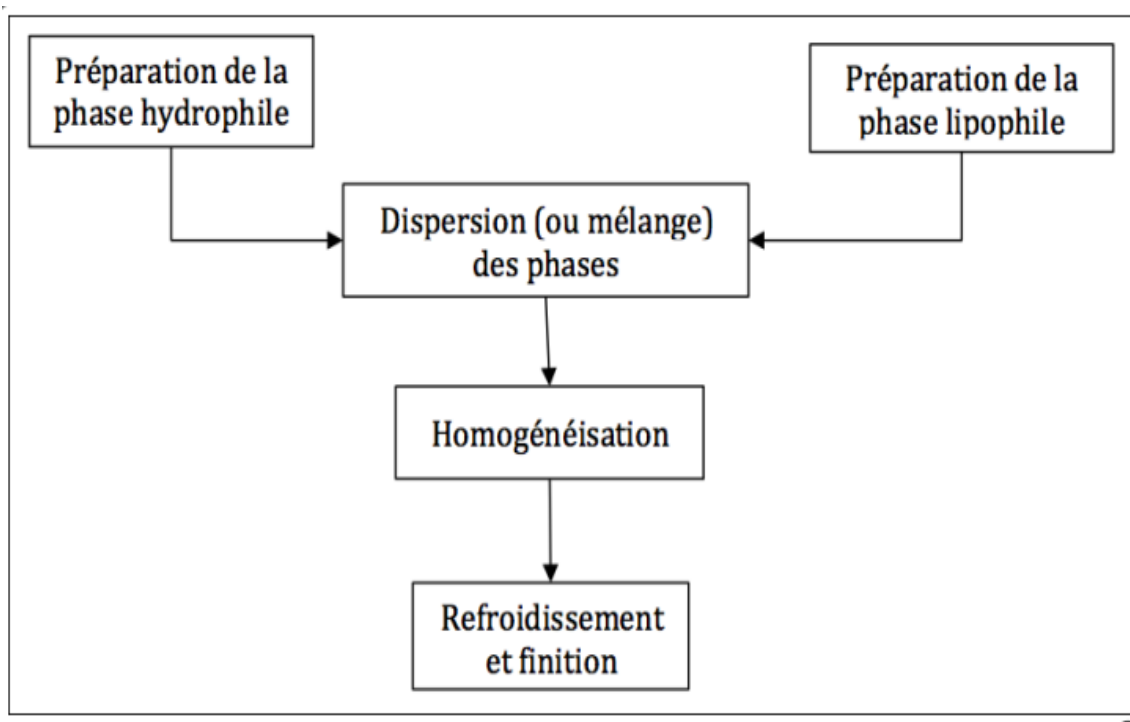


Figure I. 5 : Diagramme général du procédé de fabrication d'une émulsion (**Dupasquier et al., 2018**).

Partie C : Histologie et physiologie de la peau

I.6. Structure de la peau

La peau est un organe très complexe, elle a principalement 3 grandes couches ; l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Montagnat-Rentier, 2014**) (Figure I.13).

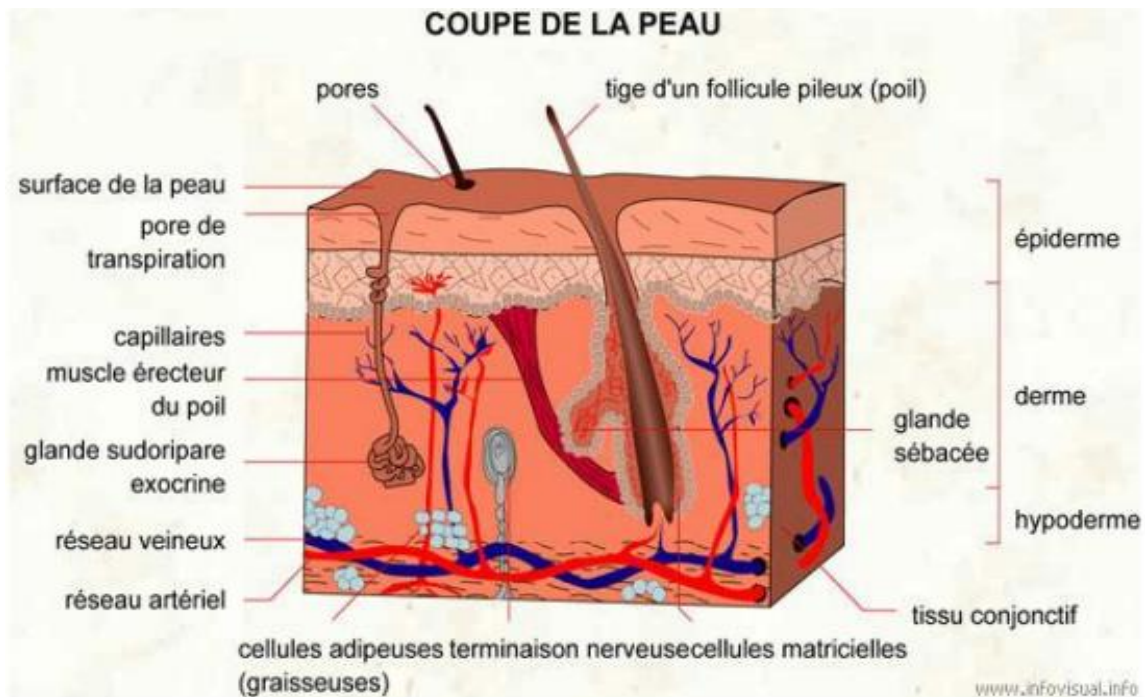


Figure I. 6 : Schéma de la structure de la peau (**Le dictionnaire visuel**).

I.6.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau, il n'est pas vascularisé (contrairement au derme) mais il est innervé. Il s'agit d'un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé constitué de 4 couches qui sont de la profondeur vers la surface : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Il est recouvert d'un film de surface, «le film hydrolipidique » constitué principalement de sueur, de lipides (sébum) et d'eau. Il a pour principale fonction la protection de la peau contre les agressions bactériennes. En somme, c'est la barrière protectrice externe. Il permet également à la peau de conserver souplesse et hydratation. En moyenne son épaisseur est d'environ 0.10 mm mais varie selon les zones du corps. On constate une variation de l'épaisseur de l'épiderme : de 0,05 mm au niveau des paupières jusqu'à 1,5 mm au niveau des paumes et des plantes. Enfin, on distingue dans l'épiderme quatre grands types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (**Marieb et al., 2010 et Méliopoulos et al., 2012**).

I.6.1.1. Les couches de l'épiderme

I.6.1.1.1. La couche basale

La couche basale ou couche germinative est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est constituée d'une seule assise cellulaire ondulée, perpendiculaire au derme, dans laquelle sont

contenues des kératinocytes jeunes de forme arrondie, des mélanocytes et des cellules de Merkel. Cette couche est le siège du renouvellement des kératinocytes. En effet, c'est à ce niveau qu'ont lieu de nombreuses divisions cellulaires.

Lorsqu'un kératinocyte entre en mitose pour donner deux cellules, l'une d'elle passe dans les couches supérieures pour évoluer vers un kératinocyte mature et la seconde reste dans la couche basale pour former le pool germinatif (Marieb et al., 2010 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.1.1.2. La couche épineuse

La couche épineuse ou couche du corps muqueux de Malpighi est située au-dessus de la couche germinative et elle est formée par la superposition de 5 à 10 couches de cellules. Elle est composée de kératinocytes contenant principalement des gros faisceaux de kératine. Localisées dans la partie inférieure de cette couche, ces cellules polyédriques ont tendance à s'étirer horizontalement dans la partie supérieure. Elles sont connectées par des points d'attache intercellulaires que sont les desmosomes, elles apparaissent hérissées en observation histologique (Marieb et al., 2010 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.1.1.3. La couche granuleuse

La couche granuleuse est constituée de 3 rangées de kératinocytes. C'est au niveau de cette couche que les kératinocytes subissent les plus grandes transformations au cours du processus de kératinisation. D'un point de vue morphologique, la cellule s'aplatit. Il existe deux types de granulations : des granules de kératohyalines et des granules lamellaires. Les granules de kératohyalines sont des îlots de fibres de kératine agglutinées et les granules lamellaires renferment des glycolipides. D'un point de vue biochimique, les organites cytoplasmiques de la cellule se désintègrent. Les corps lamellaires déversent leur contenu lipidique dans l'espace intercellulaire formant une barrière toujours plus dure et limitant la déperdition d'eau de la peau. De plus, c'est à son niveau que se marque l'arrêt des échanges avec les autres couches des niveaux supérieurs. En effet, la structure résistante formée empêche l'apport de nutriments depuis les capillaires du derme (Marieb et al., 2010 ; Martini, Marie-Claude, 2011 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.1.1.4. La couche cornée

La couche cornée est la couche de l'épiderme la plus superficielle. C'est la couche la plus importante, elle représente jusqu'au $\frac{3}{4}$ de l'épiderme. Elle est composée de 4 à 20 assises

cellulaires divisées en trois sous couches : la couche claire (*stratum lucidum*) qui n'existe qu'au niveau de la peau épaisse (plantes des pieds et paumes des mains), la couche compacte (*stratum compactum*) qui représente la couche cornée proprement dite et la couche desquamante (*stratum disjonctum*) qui correspond à la couche la plus externe. Cette couche cornée est composée de cornéocytes qui sont des kératinocytes complètement kératinisés et anucléés. Ces cellules mortes baignent au sein de la sous couche compacte dans les lipides extracellulaires formant une barrière dure et imperméable qui protège la peau des agressions externes et empêche sa déshydratation (**Martini et Marie-Claude, 2011 et Méliopoulos et al., 2012**).

I.6.1.2. Les populations cellulaires

I.6.1.2.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes sont les cellules qui composent 90% de l'épiderme et des phanères (ongles, cheveux). Ils synthétisent la kératine, une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau qui confère à la peau ses propriétés d'imperméabilité et de protection externe (**Poirier et Jacques, 1999 et Méliopoulos et al., 2012**).

I.6.1.2.2. Les mélanocytes

Les mélanocytes se trouvent dans la couche basale et représentent environ 3 à 5 % des cellules de l'épiderme. Elles sont responsables de la pigmentation de la peau en sécrétant de la mélanine (**Martini et Marie-Claude, 2011**).

I.6.1.2.3. Les cellules de Langerhans

Principalement situées au niveau de la couche germinative et de la couche épineuse, elles sont réparties sur l'ensemble de l'épiderme et elles assurent une fonction immunologique au sein de la peau. Ainsi, elles participent notamment à la réaction anticorps-antigène en permettant la reconnaissance des corps étrangers (**Méliopoulos et al., 2012**).

I.6.1.2.4. Les cellules de Merkel

Localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme et au niveau des follicules pileux, elles assurent la fonction sensorielle de la peau (**Marieb et al., 2010**).

I.6.2. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique marque la frontière entre le derme et l'épiderme. Celle-ci permet l'adhésion mécanique et les échanges entre l'épithélium épidermique et le mésenchyme dermique. En effet, l'épiderme ne possède pas de capillaires sanguins ; les nutriments qui lui sont nécessaires sont donc amenés à travers la lame basale via les capillaires sanguins du derme.

De plus, cette jonction contribue au comportement cellulaire et à l'orientation de la migration des kératinocytes. Elle est constituée de deux minces feuillets que sont, la lame basale composée de fibres de collagène type IV et de glycoprotéines et la lame réticulaire composée de collagène de type III (Martini et Marie-Claude, 2011 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.3. Le derme

C'est un tissu conjonctif qui est essentiellement composé d'une matrice extracellulaire produite par des fibroblastes, la principale population cellulaire dermique.

Le derme est d'une épaisseur moyenne de 1 à 2 mm ; il est plus épais au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds (3 à 4 mm) et plus fin au niveau des paupières et du prépuce (0.6 mm) (Marieb et al., 2010 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.3.1. Structure du derme

I.6.3.1.1. Derme papillaire

Le derme papillaire correspond à la partie supérieure du derme. Il est composé de fibres de collagène de type I et III et d'élastines orientées perpendiculairement au plan du derme. Le plexus sous-papillaire artériel et veineux est également présent et assure l'apport nutritif nécessaire au derme et au retour de ses métabolites (Marieb et al., 2010 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.3.1.2. Derme réticulaire

Le derme réticulaire représente la majeure partie du derme. Il correspond à la partie inférieure du derme situé à l'interface derme/hypoderme. Son organisation suivant l'axe horizontal est formée de l'entrelacement en vagues de fibres de collagène et de fibres élastiques donnant ainsi une allure ondulée au derme (Marieb et al., 2010 et Méliopoulos et al., 2012).

I.6.3.2. La composition du derme

I.6.3.2.1. Les fibroblastes

Les fibroblastes sont d'origine mésenchymateuse et constituent la catégorie cellulaire la plus nombreuse dans le derme normal. Ils sont plus nombreux et métaboliquement plus actifs dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire.

Les fibroblastes assurent une multitude de fonctions au sein du derme. Ils garantissent principalement l'équilibre fonctionnel en gérant les composants de la matrice extracellulaire (Stevens *et al.*, 2006 et Kühnel *et al.*, 2009).

I.6.3.2.2. Les autres cellules

On rencontre également d'autres cellules telles que des leucocytes, des cellules dendritiques dermiques, des mastocytes et des macrophages. Appartenant au système immunitaire, elles jouent un rôle dans la protection de la peau face aux éléments étrangers (Stevens *et al.*, 2006).

I.6.3.2.3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est formée par la combinaison de la substance fondamentale, de fibres de collagène, de fibres d'élastine et de glycoprotéines de structure.

La substance fondamentale forme un gel de remplissage pour la matrice à l'intérieur duquel baignent des métabolites. Elle est formée par des polysaccharides très hydratés dont des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes.

Les fibres de collagène et les fibres d'élastine possèdent des propriétés élastiques responsables de la souplesse de la peau et offrent une excellente résistance aux tensions (Stevens *et al.*, 2006 et Martini et Marie-Claude, 2011).

I.6.4. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Il est composé d'un tissu conjonctif adipeux très vascularisé. Les adipocytes représentent les cellules majoritaires de l'hypoderme. Son épaisseur varie en fonction de sa localisation et du sexe. Le tissu adipeux occupe entre 15% et 20% de notre poids corporel, voire beaucoup plus dans certains cas d'obésité (Mélissopoulos *et al.*, 2012).

I.6.4.1. Population cellulaire

I.6.4.1.1. Les adipocytes

Les adipocytes sont des cellules de forme arrondie. Elles sont de taille variable allant de 40 à 120µm de diamètre. De manière générale, elles possèdent la caractéristique de contenir une

unique gouttelette remplie de triglycérides occupant la majorité de leur cytoplasme. Leur fonction est capitale dans le maintien de l'homéostasie. En effet, elles garantissent le rôle d'isolant thermique de notre corps aux variations de température (chaud et froid) et elles ont la particularité de stocker et de libérer les triglycérides en fonction des besoins énergétiques. On note également leur rôle dans la production de certaines hormones, par exemple les œstrogènes, et dans la faculté à amortir les chocs physiques (**Kühnel et al., 2009 et Méliopoulos et al., 2012**).

I.6.1.1.2. Les autres cellules

Plusieurs autres cellules se trouvent au sein de ce tissu conjonctif formant la fraction stromavasculaire. Parmi ces cellules, il y a des cellules souches, des adipocytes immatures, des macrophages et des fibroblastes (**Kühnel et al., 2009 et Méliopoulos et al., 2012**).

I.7. Les altérations de la peau

L'altération de la peau se présente souvent sous forme de plaie qui est une condition pathologique provoquée par une lésion cellulaire, une destruction ou une rupture du tissu corporel qui est souvent associée à une perte de substance et à une limitation fonctionnelle.

Une peau altérée présente une barrière cutanée endommagée plus vulnérable aux agressions extérieures (**Claeyssen, 2009**).

Ces lésions peuvent avoir plusieurs origines ; la peau apparaît traumatisée par des facteurs extérieurs irritants comme le froid et la sécheresse, ou endommagée par des traumatismes ponctuels. C'est notamment le cas des brûlures, coupures, éraflures et piqûres.

I.7.1. Les brûlures

I.7.1.1. Définition

Les brûlures sont des lésions de la peau ou d'autres tissus engendrées par un contact thermique, chimique, électrique ou par des radiations. Elles peuvent être superficielles, intermédiaires, ou plus profondes et avoir une localisation généralisée ou particulière (**Carter, 2020**).

I.7.1.2. Étiologie des brûlures

Il existe plusieurs agents responsables de brûlure (**Claeyssen, 2009**).

a) Les brûlures thermiques (92%)

- **Contact avec un solide (fer chaud...)** : sont de taille limitées mais souvent profondes (tout dépend la température de l'objet et le temps de contact).
 - **Contact avec un liquide (eau bouillante...)** : sont généralement plus spacieuses et moins profondes que les précédentes.
- b) Les brûlures électriques (4%) :**
- **Par arc électrique** : ressemblent aux brûlures thermiques.
 - **Par contact direct avec le conducteur** : généralement, ces brûlures sont associées à des complications cardiaques, rénales, vasculaires et neurologiques.
- c) Les brûlures chimiques (3%) :** tout dépend de l'acide fort ou de la base forte.
- d) Les brûlures par radiations (1%) :** peuvent être nucléaires ou induits par les rayons X ou par les rayonnements ultraviolets A ou B (Claeyssen, 2009).

I.7.1.3. Physiopathologie des brûlures

Les brûlures sont classées en fonction de leur profondeur comme suit : (Figure I.14)

- **Brûlures du 1^{er} degré** : l'atteinte se présente au niveau de l'épiderme uniquement, elle est caractérisée par une douleur modérée et une rougeur sans formation de cloques en gardant les fonctions de la peau intactes. La guérison est rapide (prend généralement 3 à 6 jours) (Wassermann, 2002).
- **Brûlures du 2^{ème} degré superficiel** : ces brûlures présentent une destruction de l'épiderme avec atteinte de la membrane basale. Elles se caractérisent par de saignements, de cloques et de douleurs intenses. La guérison de ces brûlures peut prendre 10 à 15 jours sans laisser de cicatrices (Wassermann, 2002).
- **Brûlures du 2^{ème} degré profond** : ces brûlures détruisent l'épiderme, la membrane basale avec atteinte du derme réticulaire. Elles entraînent une suppression partielle des fonctions de la peau avec apparition de rougeur, cloques, œdèmes et une anesthésie partielle. En l'absence d'infection, ces brûlures guérissent en 21 à 35 jours en laissant des cicatrices (Wassermann, 2002).
- **Brûlures du 3^{ème} degré** : ces brûlures causent une destruction totale de la peau jusqu'à l'hypoderme entraînant ainsi une destruction quasi-totale des fonctions de la peau et la destruction des terminaisons nerveuses rend la région atteinte insensible à la douleur. La cicatrisation spontanée n'est pas possible due à la destruction complète des tissus (Wassermann, 2002).

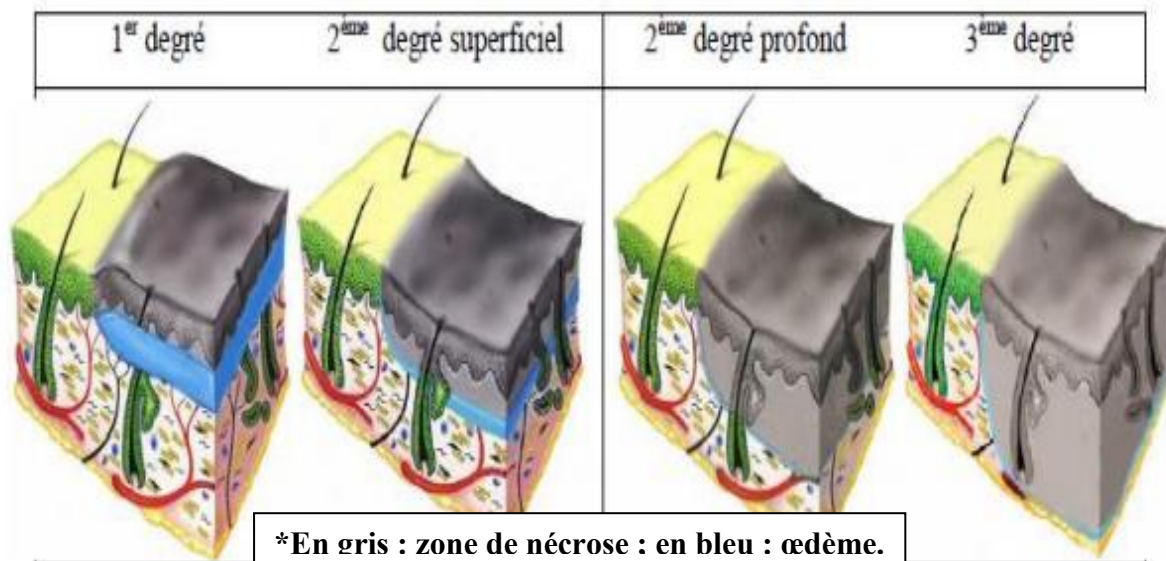


Figure I. 7 : Anatomie de la peau après brûlure de différents degrés (Claeyssen, 2009).

I.8. L'inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique ; son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore des régulations anormales du processus inflammatoire. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : Rougeur, chaleur, douleur, et lésion fonctionnelle.

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoires : une inflammation aiguë (immédiate et à courte durée, quelques jours à quelques semaines), elle se termine par l'élimination du stimulus nocif et par la réparation du tissu lésé, et une inflammation chronique (à longue durée, elle peut s'étaler sur des mois ou des années) (Ashley et al., 2012).

I.8.1. Les Anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèses du type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes), ce sont des médicaments largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique) (Das et al., 2011).

I.8.1.1. Les anti-inflammatoires conventionnels

I.8.1.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Sont des médicaments à la propriété antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Plusieurs classifications sont proposées, fondées soit sur la structure des AINS, la puissance, les modalités d'action et/ou la sélectivité anticyclo-oxygénase (**Cuvillon et Viel, 2002**). En effet, les AINS agissent tous en inhibant les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), diminuant ainsi la synthèse des prostaglandines E2 et du thromboxane A2 (**Risser et al., 2009**).

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont responsables des événements défavorables, en gênant ainsi l'agrégation plaquettaire et donc la coagulation du sang, ce qui peut prévenir la formation des caillots (thrombose), mais aggrave les hémorragies; en provoquant aussi des problèmes gastro-intestinaux (ulcères), rénaux et des réactions d'hypersensibilité (**Jick, 1994 et Risser et al., 2009**).

I.8.1.1.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Ils sont des dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immune (**Kessel et al., 2014**).

L'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables, le risque d'apparition de ces effets s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement, conduisant à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle et l'ulcères gastro-duodénaux (**Henzen, 2003**).

I.8.1.1.3. Les anti-inflammatoire d'origine marine

Les algues marines produisent une large gamme de biomolécules douées d'un potentiel anti-inflammatoire. La structure de ces composés est très variée, on retrouve les formes acycliques ainsi les formes polycycliques. Leur nature est aussi diversifiée (**Abad, 2013**).

La Chitine, le chitosane, ainsi que leur dérivés possèdent des propriétés biologiques importantes et intéressante en application médicale et pharmaceutique comme antioxydants (**Aytekin et al. 2011**), antiallergiques (**Vo et al., 2012**) et anti-inflammatoires (**Pangestuti et al., 2011**).

I.9. La cicatrisation

I.9.1. Définition

La cicatrisation est définie comme un ensemble de phénomènes physiologiques naturels aboutissant à la réparation de la structure cutanée de tissu lésé. Elle met en jeu une cascade complexe de réactions et d'interactions entre les cellules et les médiateurs (**Oummad, 2013**).

I.9.2. Les différentes étapes de cicatrisation

La cicatrisation d'une plaie se déroule en trois phases principales qui se chevauchent entre elles et chacune est caractérisée par des activités cellulaires spécifiques (**Singer et Clark, 1999**).

I.9.2.1. La phase inflammatoire

C'est la première étape de cicatrisation, elle vise à limiter les perturbations physiologiques provoquées par les lésions et empêche la propagation des bactéries, Elle est divisée en deux étapes (**Oummad, 2013**) :

a) Étape vasculaire

Elle s'accompagne de rupture des vaisseaux sanguins ce qui engendre la sortie des plaquettes et des facteurs de coagulation pour permettre au processus initial de stopper l'hémorragie, tout d'abord une vasoconstriction des vaisseaux lésés aura lieu suivie par :

- **L'hémostase primaire** : qui engendre l'adhésion des plaquettes au collagène.
- **L'hémostase secondaire aussi nommée coagulation** : c'est la formation de caillot de fibrine qui servira comme une matrice ou un support à la migration des cellules.

b) Étape inflammatoire

Une fois que le caillot est formé, la vasodilatation aura lieu grâce à la présence des neutrophiles et des monocytes, ce phénomène est modulé par plusieurs facteurs, ces deux derniers sont attirés dans la plaie non seulement par des facteurs libérés par les plaquettes mais aussi par les peptides bactériens ainsi que d'autres facteurs de complément (**Martin, 1997**).

Les neutrophiles interviennent au site de lésion en premier et permettent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires qui sont obligatoires pour l'activation des fibroblastes et des kératinocytes. Les macrophages en deuxième lieu permettent l'élimination des débris grâce à leurs capacités de phagocytose et de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires qui stimulent

la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales ainsi que leurs migrations (**Senet et Raynaud-Simon, 2007**).

I.9.2.2. Phase proliférative

Cette phase dure généralement 10 à 15 jours. Elle peut se diviser en deux étapes :

a) La formation d'un tissu de granulation

Les macrophages, les cellules endothéliales, et les fibroblastes migrent dans la plaie, au cours de cette phase, les macrophages jouent un rôle clé, elles libèrent des médiateurs comme les facteurs de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et les interleukines-1 (IL1) qui activent la néo-angiogenèse et l'activité fibroblastique (**Witte et Barbul, 1997**).

La multiplication et la migration des fibroblastes qui fait suite à ces stimulations aboutissent à la synthèse d'une nouvelle matrice (**Oummad, 2013**).

b) La ré-épithélialisation

C'est la formation d'un nouveau tissu au sein de la plaie, grâce aux kératinocytes. Ces derniers prolifèrent pour former un néo-épiderme puis se différencient pour reformer un épiderme fonctionnel, les trois processus de ré-épithélialisation sont :

- La migration
- La prolifération
- La maturation

Cette étape est modulée par différents stimulateurs et facteurs de croissance, cependant, la cicatrisation n'est pas complète car cette cicatrice sera reconfigurée au cours de la phase finale de maturité (**Strodtbeck, 2001**).

Un événement clé dans cette phase est la formation des nouveaux vaisseaux sanguins, c'est l'angiogenèse qui assure le renforcement du derme.

I.9.2.3. La phase de remodelage

C'est la dernière phase cicatricielle, le collagène est reformulé pour provoquer la maturation de la cicatrice, et assurer un équilibre entre la dégradation et la synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire plus résistante. L'augmentation du diamètre du collagène est modulée par plusieurs enzymes ainsi que leur organisation qui sont différentes de celles du collagène

natif d'une peau saine. C'est pourquoi, la peau ne retrouve jamais ni sa fonction ni sa résistance initiale. Deux phénomènes accompagnent cette phase: La régression de la vascularisation et la réduction de la densité cellulaire.

Enfin, la résistance mécanique de la plaie peut augmenter de manière considérable jusqu'à 70%, à 80% grâce au remodelage (**Martin, 1997 ; Strodbeck, 2001 et Oummad, 2013**).

Chapitre II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Dans le cadre de cette étude, le matériel biologique utilisé est :

- Carapaces de crevettes
- Poudres d'algues
- Peaux de raie et de sole
- Souris NMRI
- Rats Wistar
- Germes pathogènes

II.1.2. Matériel non biologique

Dans le tableau II.1 ci-dessous sont listés les différents appareils, réactifs et excipients utilisés :

Tableau II. 1 : Le matériel non biologique utilisé lors de cette étude

Appareillage et matériels de laboratoire	Réactifs	Excipients
- Mixeur, bras mixeur, fouet électrique - Balance de précision (shimadzu AUW 220 D Uni Bloc) - Etuve (memmert) - Creusets, spatules, thermomètre - Microscope photonique (ZEISS AXIO Cam ERc-5s) - Four à moufle (wise therm) - Dessiccateur - pH mètre - Agitateur magnétique, plaque chauffante - Appareil de soxhlet (huber minichiller)	- Réactif de Bradford - Acétone - Ethanol - Eau distillée - Alcool chirurgical - HCl - NaOH - Solution tampon peptonée au NaCl - Solution NaCl saturée - Acide acétique - Milieux gélosés chapman, cétrimide, sabouraud et PCA	- Emulsifiant N°3 - Huile de foie de morue - Huile de coco - Vaseline - Conservateur Cosgard

<ul style="list-style-type: none"> - Evaporateur rotatif (Ika hb 10) - Chauffe ballon (BensteadElectrothermal) - Bec bunsen - Maillet, ciseaux, poinçon - Becher, éprouvettes, micropipette, écouvillons, tubes à essai, pipettes pasteur. - Sonificateur - Centrifugeuse - Bouteilles en verre 1L - Membrane de dialyse spectrapor - Fil alimentaire - Spectrophotomètre UV-visible (shimadzu UV) - Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier FTIR - Cul de poule en acier inoxydable - Bocaux de conditionnement stériles - Lames de bistouris stériles, seringues à insuline, coton - Pince, chalumeau, pièce en argent, pansement stériles, une paire de ciseaux - Papier aluminium, papier cuisson, film alimentaire 		
---	--	--

II.2. Echantillonnage

II.2.1. Collecte de la matière première

Diverses ressources marines ont été exploitées et incorporées par la suite dans la préparation de quatre pommades aux propriétés pharmacologiques (cicatrisantes, anti inflammatoires et antibactériennes).

Les coproduits marins (carapaces de crevettes, peaux de sole, de raie et de seiche) exploités dans cette étude ont été collectés en Février 2022, au niveau de la pêcherie d'Alger centre.

En ce qui concerne les algues marines (vertes, rouges et brunes), une partie de ces dernières a été récoltée par Mme. AMROUCHE L, en Mai 2022 au niveau de la plage du rocher blanc de la Daïra de Cherchell de la wilaya de Tipaza ; l'autre partie a été récoltée au niveau de la baie de Bou-ismail en Mars et Avril 2021 par M. Boukourt R (enseignant à l'ENSSMAL). Ces algues ont été lavées, séchées, broyées finement ($\varnothing < 150 \mu\text{m}$) puis conservées sous forme de poudre dans des boites hermétiques dans un dessiccateur. La spiruline utilisée dans ces travaux de recherches est d'origine commerciale.

II.2.1. Identification de l'espèce de crevette

L'identification de l'espèce a été faite en se basant sur les fiches FAO (**Fischer et al, 1987**) avec l'aide de Mme FELLAH Houda au niveau du laboratoire LBCM 2 de l'ENSSMAL, et ce en examinant un individu entier conservé lors de la collecte de la matière première.

II.2.2. Prétraitement des carapaces de crustacés

Le prétraitement des coproduits de crustacés commence par un rinçage à l'eau claire afin d'éliminer les résidus de sang et d'épiphytes mais également de sable, puis un 2^{ème} rinçage est effectué à l'eau distillée avant de les sécher à l'étuve à 37°C pendant 24h, par la suite vient le broyage au mixeur pour obtenir une poudre fine dont le diamètre est inférieur à 200 μm . la poudre de crevettes ainsi obtenue est conservée dans des bocaux à température ambiante dans un dessiccateur jusqu'à utilisation.

II.3. Détermination de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes

La détermination de la composition biochimique a été effectuée au niveau du laboratoire LBCM 2 de l'ENSSMAL.

II.3.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est calculée suivant la méthode référentielle (**AOAC, 1980**), en se basant sur le calcul de la perte de masse, due au séchage de la poudre dans une étuve à 105°C pendant 24h (jusqu'à stabilisation du poids). Le résultat obtenu est exprimé en pourcentage :

Mode opératoire

- Peser les creusets vides et noter leurs poids M0 ;
- Tarer ces poids, puis peser 2g de chaque échantillon sec ;
- Peser l'ensemble creuset + échantillon et noter leurs poids M1 ;
- Mettre les échantillons dans l'étuve à 105°C jusqu'à stabilisation du poids de chaque échantillon (24h) ;
- Retirer les creusets, enlever les couvercles et laisser refroidir dans le dessiccateur, puis noter le poids final des échantillons secs M2.

La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M1 - M2}{M1 - M0} \times 100$$

Avec :

M0 : poids du creuset vide ;

M1 : poids du creuset avec l'échantillon avant étuvage à 105°C ;

M2 : poids du creuset avec l'échantillon après étuvage.

II.3.2. Détermination de la teneur et de la composition en matière minérale

II.3.2.1. Détermination de la teneur totale en matière minérale

La détermination de la teneur en matière minérale a été faite par une méthode référentielle à partir d'échantillons secs préalablement étuvés à 105°C pendant 24h. La méthode se base sur l'incinération des échantillons dans un four à moufle à 600°C pendant 4h (AOAC, 1990) jusqu'à blanchiment total des cendres.

Modes opératoire

- Peser le creuset en porcelaine vide ;
- Peser une quantité de 2g de poudre de crevettes séchées au préalable à 105°C durant 24h ;
- Placer le creuset dans le four à moufle à 600°C pour une durée de temps de 4h ;
- Retirer le creuset et le placer dans un dessiccateur ;
- Peser le creuset pour déterminer la masse des cendres après avoir été refroidi dans un dessiccateur.

La teneur en matière minérale est calculée suivant la formule ci-dessous :

$$C\% = \left(\frac{M2-M0}{M1-M0} \right) \times 100$$

Avec :

M0 : poids du creuset vide ;

M1 : poids du creuset avec l'échantillon sec avant incinération ;

M2 : poids du creuset avec l'échantillon après incinération à 600°C.

II.3.3. Détermination de la teneur en protéine totales

La détermination de la teneur en protéines totales est effectuée par la méthode de Bradford modifiée.

C'est une méthode de dosage colorimétrique des protéines. Elle est utilisée pour mesurer la concentration en protéines totales dans un échantillon, elle repose sur l'utilisation de bleu brillant de Coomassie dans un milieu éthanoïque acide, ce colorant se lie aux protéines par des liaisons ioniques avec des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et des interactions hydrophobes avec les acides aminés hydrophobes (**Bradford, 1976**). Cette liaison entraîne un déplacement du pic d'absorption de 465 nm (brun orangé) à 595nm (bleu). C'est une méthode très sensible (2-5 µg de protéines), reproductible et très rapide. Le réactif ne réagit pas avec les acides aminés libres. La masse du peptide ou de la protéine doit être au moins de 3 k Da.

Mode opératoire

- La protéine de référence est la BSA (Sérum Albumine Bovine) ;
- Préparer une solution à 1% de BSA dans de l'eau distillée, qui sert à préparer la gamme étalon. Des volumes croissants de BSA ont été introduits dans les tubes de la gamme ;
- Les échantillons (poudre de carapaces de crevettes) ont été également dissouts dans un volume d'eau distillée déterminé ;
- Ajouter à tous les tubes un volume déterminé du réactif de Bradford. Le mélange est incubé à l'abri de la lumière à une température ambiante pendant 10 minutes ;
- Un volume de chaque mélange a été prélevé après incubation est mis dans la cuve de spectrophotomètre. La lecture a été réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.
- Tracer la courbe et déduire l'équation $DO = f(BSA)$

II.3.4. Détermination de la teneur en lipides totaux

L'extraction des lipides totaux est effectuée par la méthode de Soxhlet qui est une méthode gravimétrique (El Houda, 2017).

L'échantillon est placé dans une cartouche de cellulose, l'extraction se fait en continu par l'éther diéthylique en ébullition (35°C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral (El Houda, 2017). Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther diéthylique est évaporé sur un évaporateur rotatif. La matière grasse est récupérée dans le ballon séché qui est pesé (Sahoré et Abouattier, 2016).

La teneur en matière grasse est la différence de poids du ballon avant et après extraction.

Mode opératoire

- Mettre en marche le réfrigérant à 2°C ;
- Peser le ballon vide avant extraction ;
- Dans une cartouche de cellulose peser 2g de poudre de carapaces de crevettes;
- Placer la cartouche dans la chambre d'extraction ;
- Prévoir un blanc qui ne contiendra que le solvant (pour confirmer l'absence de composés lipidique ou d'impuretés dans celui-ci) ;
- Ajouter 160 ml d'éther éthylique ;
- Chauffer le ballon à 60°C, l'extraction dure 4 heures ;
- Une fois le temps écoulé le ballon est placé dans un rota-vapeur à 60°C afin de concentrer les lipides tout en éliminant le solvant ;
- Repeser le ballon.

La teneur en lipide est déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$L\% = \left(\frac{P1 - P0}{m} \right) \times 100$$

Avec :

P0 : poids du ballon vide ;

P1 : poids du ballon qui contient l'échantillon après le passage par le rota vapeur ;

P1-P0 : la masse des lipides; m : le poids de l'échantillon (2g).

II.4. Extraction de la chitine et du chitosane

La chitine peut être extraite à partir des carapaces de crustacés par deux méthodes, biologique par l'utilisation des enzymes, ou chimique en utilisant des acides et des bases, dans le présent travail, le protocole adopté est basé sur l'extraction chimique qui comporte 3 étapes (Truong *et al.*, 2007), à savoir:

- Dépigmentation et délipidation ;
- Déminéralisation ;
- Déprotéinisation et désacétylation.

Une mise au point du protocole d'extraction du chitosane à partir des carapaces de crustacés a été réalisé par Haddab et Kortbi (2020) ; Guesmi et Hennous (2021).

Le mode opératoire est schématisé ci-après :

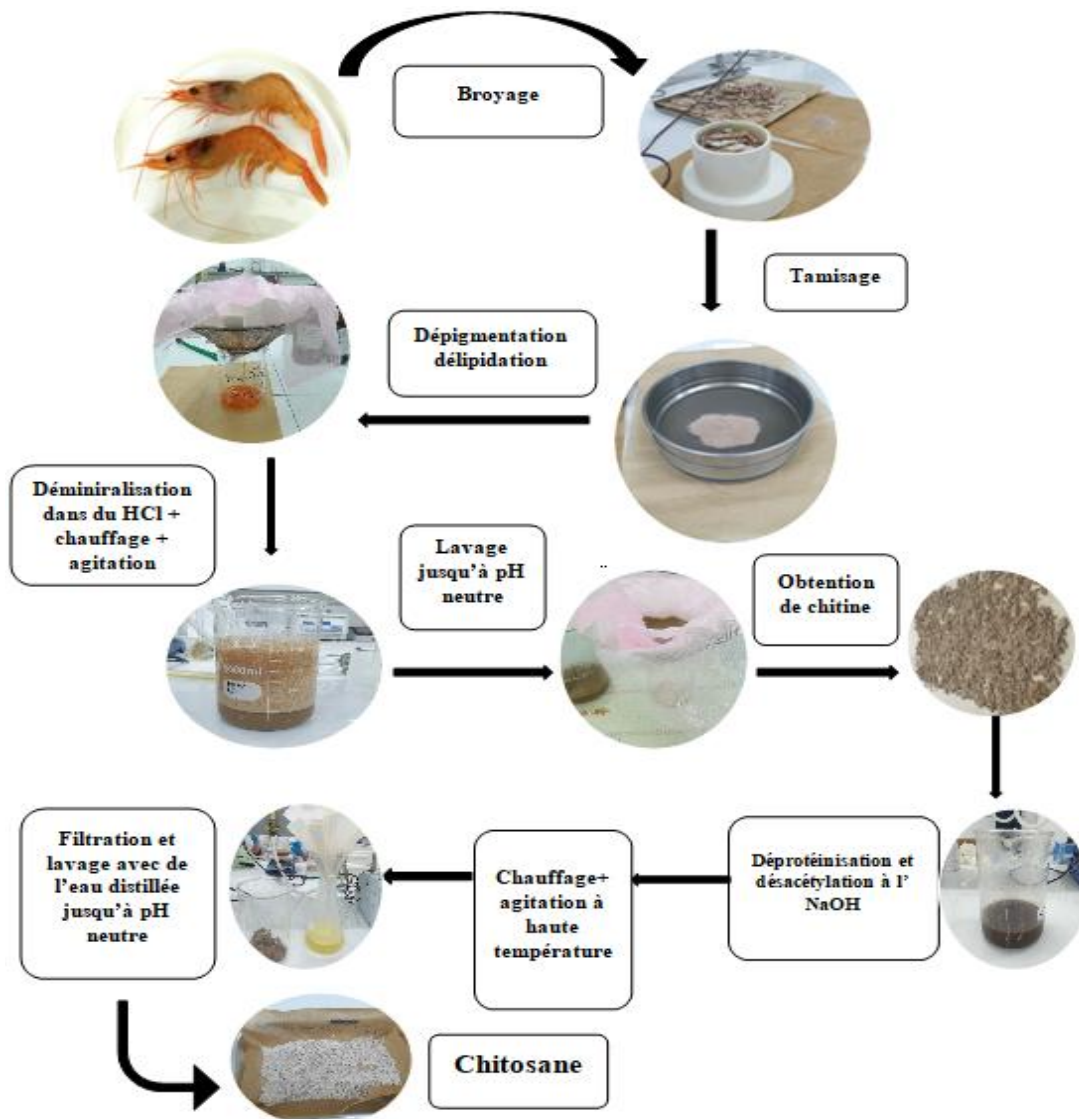


Figure II. 1 : Diagramme d'extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes

II.5. Caractérisation du chitosane produit

II.5.1. Rendement massique

L'élimination des groupes acétyles de la chitine permet d'obtenir le chitosane. Le rendement massique est calculé en utilisant la formule mentionnée par **Haddab et Kortbi (2020)** ; **Guesmi et Hennous (2021)** :

$$Ym = \frac{Mf}{Mi} \times 100$$

Avec :

Mi : la masse initiale en g ;

Mf : la masse finale en g.

II.5.2. Test de solubilité

Dissoudre 0.1g du chitosane en poudre dans 10 ml d'une solution d'acide acétique (1%), sous agitation constante pendant une nuit à température ambiante jusqu'à sa solubilisation (**Fernandez-Kim, 2004**).

La chitine est insoluble dans l'acide acétique 1% car elle ne peut pas être protonée à cause de l'absence de groupement amine et/ou un faible degré de désacétylation, en revanche le chitosane est complètement soluble dans l'acide acétique 1%.

II.5.3. Calcul du degré de déprotéinisation

Le degré de déprotéinisation permet d'évaluer l'efficacité du traitement de déprotéinisation. Il est calculé par la formule (**Rao et al., 2000**):

$$Dp = \frac{(P0 M0) - (Pr Mr)}{(P0 M0)} \times 100$$

Avec :

M0 et Mr : les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé ;

P0 et Pr : les pourcentages de protéines dans le produit initial et résiduel respectivement.

La teneur en protéines est déterminée par la micro méthode de Bradford décrite précédemment.

II.5.4. Calcul du degré de déminéralisation

Le degré de déminéralisation est calculé par la formule suivante (Rao et al., 2000) :

$$DM = \frac{(AO Mo) - (Ar Mr)}{(AO Mo)} \times 100$$

Avec :

Mo et Mr : les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé ;

Ao et Ar : les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel respectivement.

Ces taux sont estimés par la méthode (AOAC, 1990) décrite précédemment.

II.5.5. Calcul du degré de désacétylation

II.5.5.1. FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR)

Ce test a été utilisé afin de caractériser la structure du chitosane extrait et de déterminer son degré de désacétylation. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse qui permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques. Elle est liée aux propriétés de vibration des liaisons interatomiques. Elle consiste à irradier l'échantillon par un rayonnement infrarouge. Quand la fréquence du rayonnement correspond à une fréquence de vibration des molécules exposées, il se produit un phénomène d'absorption. Ceci se traduit par un pic d'absorption sur le spectre en absorbance (Mecheddou et Barr, 2018).

Le degré de désacétylation du chitosane a été calculé en utilisant la formule mentionnée par Hafsa et al. (2016) et qui est la suivante :

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.03133.DA$$

Avec :

$$DA = 100 - DDA$$

A_{1320} : l'absorbance au nombre d'onde 1320 cm^{-1} ;

A_{1420} : l'absorbance au nombre d'onde 1420 cm^{-1} .

II.6. Extraction d'eau d'algues

Le choix des algues a été fait soigneusement selon leurs apports en minéraux et antioxydants. La préparation des eaux d'algues commence par le lavage des algues avec de l'eau du robinet pour enlever toutes traces de sable et par la suite elles sont rincées à l'eau distillée, puis

séchées à l'abri de la lumière à 30°C, pour enfin être finement broyées, tamisées ($\varnothing < 200\mu\text{m}$) et conditionnées dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière et au sec dans un dessiccateur.

Le protocole d'extraction des eaux d'algues, mis au point par **Amrouche (2021)**, est illustré dans la (Figure II.2.) :

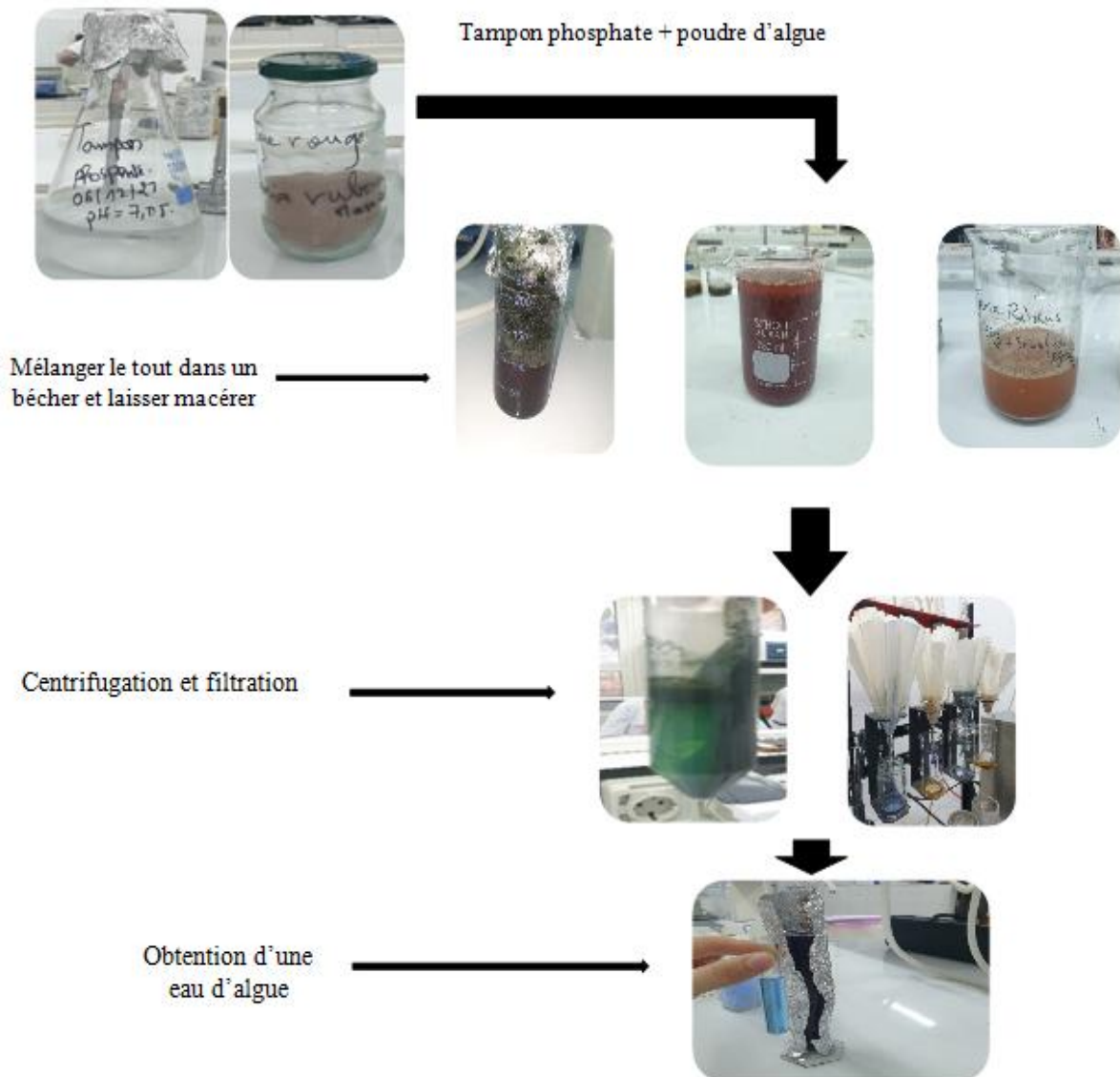


Figure II. 2 : Diagramme général extraction d'eau d'algue (**Amrouche, 2021**)

II.7. Extraction du collagène marin

II.7.1. Traitement des peaux

L'ensemble des peaux a été lavé à l'eau du robinet afin d'éliminer toutes traces de sang, la chair collée est éliminée à l'aide d'un bistouri et de ciseaux, puis un deuxième rinçage est

effectué pour enlever toutes traces de chair et on termine par un dernier rinçage avec une solution de tampon phosphate de pH neutre pour enfin les mettre à sécher à 35°C pendant 48h. Une fois complètement séchées, les peaux sont coupées à l'aide d'une paire de ciseaux puis broyées au mixeur.

II.7.2. Méthode d'extraction du collagène marin

Il existe différentes méthodes d'extraction de collagène, on en distingue principalement trois (**Ben slimane et Sadok, 2015**) :

- 1) Extraction acide
- 2) Extraction par précipitation saline
- 3) Extraction enzymatique

Dans le présent travail, l'extraction du collagène fut avec un acide suivant la méthode **Kharoubi et al. (2017)** modifiée (Figure II.3)

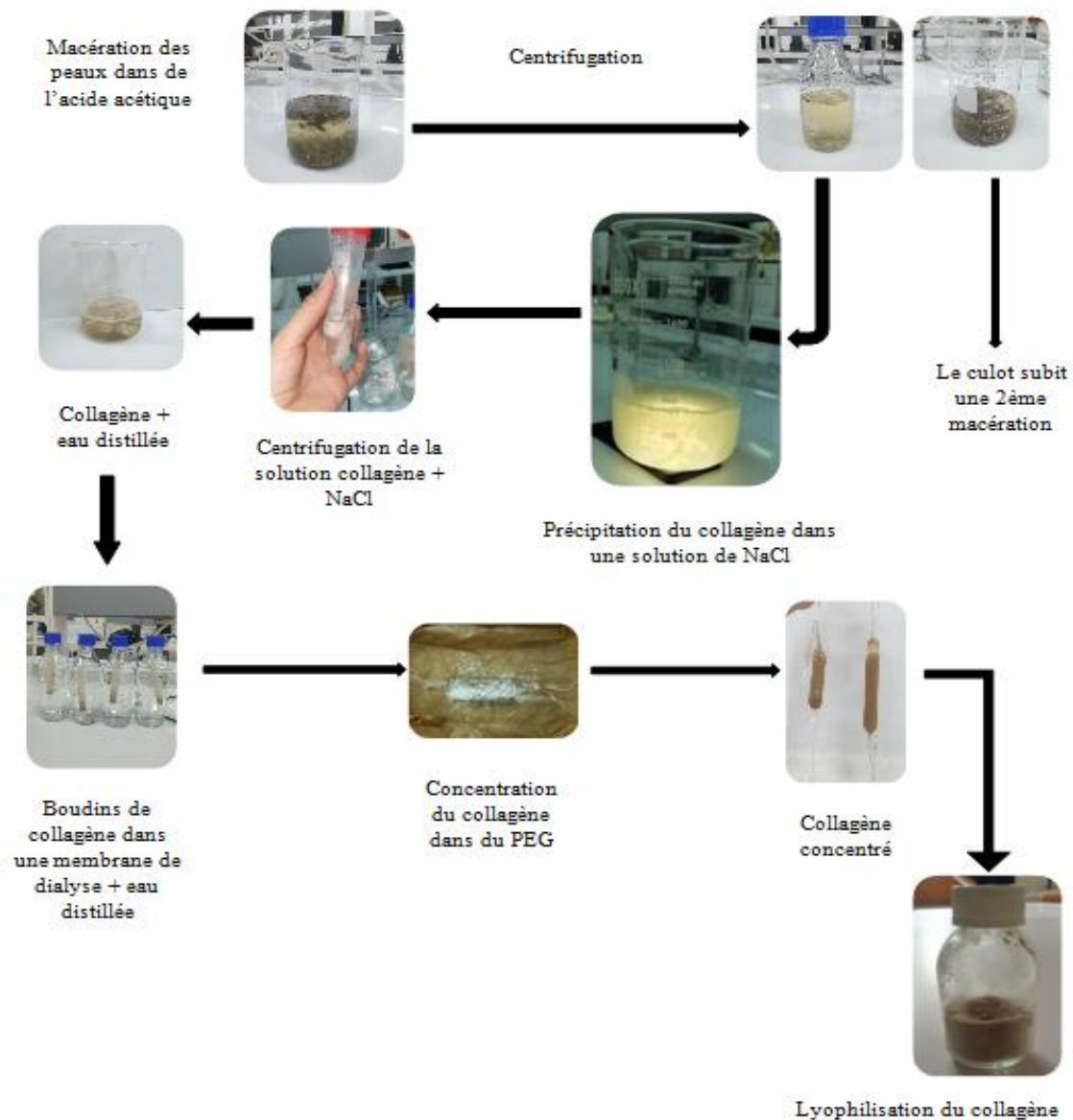


Figure II. 3 : Diagramme général d'extraction du collagène marin à partir des peaux de poissons

II.7.3. Mise en évidence du collagène extrait

II.7.3.1. Test de biuret

C'est une méthode de dosage colorimétrique des protéines, basée sur la formation d'un complexe, dans un milieu alcalin, entre les ions cuivre II (Cu^{2+}) et les protéines (plus précisément les atomes d'azote des liaisons peptidique de la protéine). S'il y a formation d'un complexe mauve donc le test est positif (présence de protéines), et si le complexe reste bleu, le test est négatif (absence de protéines) (Lablack, 2012).

Mode opératoire

Dans un petit tube à essai on met 0.5 ml du collagène extrait, on rajout 3 à 4 gouttes de NaOH, ensuite, on rajoute quelques gouttes de sulfate de cuivre CuSO₄, après le mélange on obtient un complexe violet, on compare le résultat avec un témoin positif (la protéine de référence BSA), et un témoin négatif (l'eau distillée).

II.7.3.2. Test à la xanthoprotéine

Le test xanthoprotéique est une méthode biochimique pour la caractérisation et l'identification des acides aminés contenant des groupes phénoliques ou indoliques. On cible surtout l'acide aminé tryptophane qui est très concentré dans le collagène.

Le test est basé sur l'identification de la présence des cycles benzéniques activés lors du chauffage de la protéine avec de l'acide nitrique concentré (HNO₃) qui subit une réaction de nitration et forme un produit de couleur jaune, après l'addition alcaline, le culot devient orange en raison de la formation d'un sel (Lablack, 2012).

Mode opératoire :

- Dans un tube à essai propre on met 1 ml de la solution de collagène ;
- On ajoute 2 à 3 gouttes d'acide nitrique concentré (HNO₃) ;
- À l'aide d'une pince, porter le tube à ébullition sur un bec bunsen jusqu'à la formation d'un précipité blanc du collagène dénaturé ;
- On rajoute 2 à 3 gouttes d'ammoniaque ;
- Après l'ajout de l'ammoniaque le culot vire à l'orange.

II.7.4. Rendement massique du collagène marin

Le rendement massique du collagène est calculé en utilisant la formule suivante :

$$Ym\% = \frac{Mf}{Mi} \times 100$$

Avec :

Mi : la masse de peaux de poissons en g ;

Mf : la masse du collagène lyophilisé en g.

II.7.5. Détermination du poids moléculaire du collagène marin par SDS-PAGE

La détermination des profils électrophorétiques du collagène a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). L'électrophorèse a été réalisée en utilisant un gel de séparation de 10% et un gel de concentration de 5%.

II.7.5.1. Principe de l'électrophorèse SDS-PAGE

La pureté de nos solutions de collagène est caractérisée par une électrophorèse en condition dénaturante ou SDS-PAGE. Les techniques d'électrophorèse consistent à séparer des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Dans le cas de la SDS-PAGE, on utilise une molécule tensioactive, le sodium dodécyl sulfate (pour SDS) afin de dénaturer la conformation des protéines. Le SDS est composé d'une longue chaîne alkyl apolaire et d'un groupement sulfate chargé négativement. Par sa chaîne alkyl apolaire, le SDS peut se fixer au niveau des zones hydrophobes de la protéine et les « solubiliser ». Les protéines sont ainsi dépliées et chargées négativement. La charge de la protéine dépend alors de la quantité de SDS liée à sa surface ; c'est à dire :

- de la longueur de la protéine
- de la quantité d'acides aminés hydrophobes sur la protéine
- de l'état de glycosylation de la protéine

En général, la répartition de SDS sur les protéines étant assez uniforme, on considère que la séparation se fait en fonction de la masse moléculaire apparente de la protéine. Afin d'être dans des conditions totalement dénaturantes, on ajoute un réducteur de pont disulfures à l'échantillon (ex : β mercaptoéthanol) et on le chauffe à 100°C pendant quelques minutes pour rompre les liaisons hydrogènes. Dans le cas du collagène, on fait migrer des chaînes α et des dimères de chaînes α notés « β ». Les protéines migrent au sein d'un gel de polyacrylamide réticulés par des monomères bis-acrylamides. En modifiant la concentration en monomère acrylamide ou le rapport acrylamide/bis-acrylamide, on module la porosité du gel. Le contrôle de cette porosité permet de définir la gamme de poids moléculaire que l'on souhaite discriminer. Un gel dense, avec de petits pores, est efficace pour séparer des protéines de faible poids moléculaire. A l'inverse, on utilise un gel lâche avec de gros pores pour caractériser des protéines de haut poids moléculaire. Dans le système développé par Ornstein et Davis, les protéines migrent successivement à travers deux gels :

- **un gel de concentration sur la partie haute.** Il s'agit d'un gel lâche (5% en acrylamide, pH = 6,8) dans lequel on ajoute de la glycine, un composé qui migre plus lentement que les protéines. Sous l'effet du champ électrique, le déplacement de la glycine permet de concentrer spatialement les protéines (indifféremment de leur masse

moléculaire). Le but est d'aligner les protéines avant de les faire migrer en fonction de leur masse.

- **un gel de migration sur la partie basse.** Ce gel est plus dense (10% en acrylamide) et a un pH différent (pH = 8,8) du gel de concentration. Il en résulte que la glycine migre plus vite que les protéines dans le gel de migration. En changeant de gel, on commence réellement la séparation de protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente.

Après la migration, les protéines sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie. En comparant leur migration à celles de marqueurs de poids moléculaire et en utilisant la relation (1), on peut alors attribuer une masse moléculaire à chaque bande.

$$\text{Log (masse moléculaire)} = a (\text{mobilité relative}) + b \quad (1)$$

La mobilité relative d'une protéine est définie comme le rapport entre sa distance de migration et la distance de migration du front.

II.7.5.2. Protocole de l'électrophorèse

1 – Préparation des plaques – Montage.

- Laver soigneusement avec de l'éthanol une plaque support et une plaque fine en verre pour chaque gel. Sécher.
- Installer les plaques sur le support de montage. Vérifier l'étanchéité avec de l'eau déionisée.
- Remplir de gel de migration jusqu'à 4-5 mm de la ligne verte inférieure.
- Ajouter doucement de l'eau déionisée jusqu'en haut des plaques pour chasser les bulles d'air à l'interface eau/gel.
- Attendre la polymérisation complète du gel de migration.
- Vider l'eau au-dessus des gels par retournement des plaques.
- Ajouter le gel de concentration (micropipette) jusqu'à 2-3 mm du bord supérieur. Aspirer les bulles d'air.
- Mettre un peigne 10 puits sur les plaques et laisser polymériser le gel de concentration.

2 – Préparation des cuves à électrophorèse.

- Transférer les plaques sur le support prévu pour l'électrophorèse, plaques fines orientées vers l'intérieur. Mettre ensuite ce support dans la cuve.

- Remplir la cuve de tampon de migration (1X) jusqu'au ras des plaques.

3 – Préparation des échantillons.

- Diluer les solutions de collagène dans l'acide acétique 500 mM (1/2 ; 1/5 ; 1/10).
- Pour chaque échantillon, mélanger 10 µl de solution échantillon avec 10µl de tampon échantillon (Tampon Laemmli) dans un eppendorf, vortexer et centrifuger (2 min à 5000 g).
- Fermer hermétiquement les eppendorfs et les mettre dans un bain d'eau à ébullition pendant 3 minutes. Placer ensuite les eppendorfs pendant 5 minutes dans la glace puis les mettre à centrifuger pendant 2 minutes à 5000 g.

4 – Dépôts des échantillons.

- Déposer un échantillon dans chaque puit.
- Réserver un échantillon pour le marqueur de poids moléculaire et/ou pour un échantillon témoin de collagène.

5 – Migration.

- Recouvrir la cuve de son couvercle en respectant les polarités des électrodes.
- Relier les électrodes au générateur.

Migration en 2 temps :

- Régler le générateur sur 80 volts et le mettre en marche (apparition de petites bulles dans le tampon de migration).
- Laisser 10 à 20 minutes jusqu'à ce que les dépôts soient compactés en une seule ligne (concentration des protéines).
- Régler alors le générateur sur 160 volts pour que la migration proprement dite démarre.
- Arrêter la migration quand le front de migration (Bleu de bromophénol) est proche du bas de la plaque.

6– Coloration.

- Démouler les gels.
- Mettre chaque gel dans une solution de coloration comprenant du bleu de Coomassie.
- Agiter pendant 1 heure.
- Ôter la solution de bleu de Coomassie.

7– Décoloration/lavage.

Décoloration rapide :

- Prendre les gels et les mettre dans la solution de décoloration rapide.
- Agiter pendant 1 heure
- Jeter la solution de décoloration (devenue bleutée).

8- Décolorant de conservation :

- Ajouter 50 à 100 ml du décolorant de conservation.
- Agiter 1 nuit.
- Jeter le colorant.
- Recommencer cette étape si le gel est encore trop « bleu ».

9-Réhydratation :

Mettre les gels dans l'eau déionisée pour les laver du décolorant et leur faire reprendre leur taille initiale.

10-Lecture : Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique au sein d'un gel. La détermination de la masse moléculaire étalon ou Log (MM) = f(RF) . Le Rapport Frontal RF est calculé grâce à la relation suivante :

$$\text{RF} = \text{Distance parcourue par la protéine} / \text{Distance de migration de bleu de bromophénol}$$

II.8. Test de l'activité antibactérienne des principes actifs par la méthode de diffusion sur disques

L'étude de l'activité antimicrobienne des principes actifs a été réalisée par la méthode de disques de diffusion sur gel. Cette méthode, très utilisée en microbiologie (antibiogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (**Ababsa, 2012**).

Quatre souches pathogènes ont été testées : une souche environnementale *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), une souche ATCC 25922 *Escherichia coli* (Gram-), une souche ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* et une souche *Enterococcus spp* (Gram+).

Mode opératoire :

- Un écouvillon stérile est plongé dans une suspension bactérienne (0,3 McF), préalablement revivifiée, puis retiré en l'essorant contre les parois du tube ;
- L'écouvillon est étalé sur toute la surface de la gélose en tournant la boîte trois fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum ;
- Les disques stériles sont imprégnés avec 80µl de la solution à tester (chitosane, polyphénols, polysaccharides sulfatés, extrait de *Codium*) et déposés sur la gélose

Les boîtes préparées sont laissées un moment sur la paillasse afin de permettre la diffusion du composé antimicrobien, puis incubées à la température adéquate de croissance (37°C). Les lectures seront faites après 24h.

- **Lecture**

L'activité antimicrobienne a été évaluée en déterminant les diamètres (en mm) de la zone d'inhibition de croissance nette autour des disques. L'inhibition est notée positive si le diamètre est supérieur à 2mm (**Thompson *et al.*, 1996**).

Remarque : Les essais ont été effectués en duplicata.

II.9. Préparation des émulsions

Quatre pommades ont été préparées pour cette étude et celles-ci sont globalement formulées comme suit :

- **La phase aqueuse** contient l'eau d'algue et un mélange de biomolécules marines (chitosane, collagène, l'extrait de polyphénols, polysaccharides sulfatés et extrait de *Codium bursa*) dissoutes dans de l'acide acétique à 1%.
- **La phase huileuse** contient de la vaseline, de l'huile de foie de morue et de l'huile de coco. Le choix de cet ingrédient est basé sur le fait que ces produits sont non allergisants et ayant un pouvoir hydratant pour la peau.
- Facteur de consistance : cire n°3
- Agent conservateur et antimicrobien : conservateur cosgard .

Avant d'entamer la procédure de fabrication des pommades, le matériel utilisé ainsi que les pots de conditionnement des pommades ont été lavés puis enrobés de papier aluminium pour être stérilisés à l'autoclave (à 121,1°C, 20 min).

Toutes les formules testées ont été préparées selon le même protocole et selon la méthode d'inversion de phase (**Caullet *et al.*, 2018**).

La procédure est comme suit :

- Calculer et peser les principes actifs et les excipients
- Préparer les 2 phases huileuse et aqueuse
- Procéder à la dispersion des deux phases
- Homogénéisation mécanique de l'émulsion
- Ajouter le conservateur
- Mettre dans des pots stériles
- Désaérer en tapant doucement les pots contre la paillasse.

II.9.1. Calcul et pesée des principes actifs et des excipients

Le calcul des principes à 1% ainsi que la quantité des autres ingrédients est réalisé pour une quantité de pommade de 50g, étant donné que notre émulsion est une pommade et non une crème, la quantité de la phase huileuse est plus grande que la quantité de la phase aqueuse.

Les principes actifs tels que le chitosane et les polysaccharides ont été solubilisés et introduits dans les pommades à raison de 1%.

Les autres constituants tels que le collagène, les polysaccharides, les polyphénols et l'extrait de Codium ont été introduits à des taux encore plus bas.

Note : La pesée des ingrédients a été effectuée à l'aide d'une balance électronique de précision 10^{-6} .

II.9.2 Formulation des pommades

La formulation détaillée des pommades est décrite dans le tableau suivant (Tableau II.2) :

Tableau II. 2 : Formulation détaillée des pommades

	Pommade 1	Pommade 2	Pommade 3	Pommade 4
Principes actifs	Chitosane + Collagène	Chitosane + Collagène + Polyphénols	Chitosane + Collagène + Polysaccharides	Chitosane + Collagène + extrait de Codium
Phase huileuse (excipients)	Huile de coco + vaseline	Huile de coco + Vaseline + huile de foie de	Huile de coco + Vaseline + huile de foie de	Huile de coco + Vaseline + huile de foie de

		morue	morue	morue
Phases aqueuse	Eau d'algue brune : Padina	Eau d'algue rouge : Sphaerococcus	Eau d'algue bleue : <i>Spirulina platensis</i> (phycocyanine)	Eau d'algue rouge : <i>Jania rubens</i>

Il est à savoir que le chitosane et le collagène ont été préalablement solubilisés dans un volume défini d'acide acétique à 1% et les polysaccharides dans un volume défini d'eau avant d'être introduits dans la préparation.

NOTE : Les échantillons des extraits d'algues ; polyphénols, polysaccharides et extrait de *Codium bursa*, nous ont été remis par Mme AMROUCHE L. Ces échantillons ont fait l'objet d'étude de PFE antérieurs et ont été conservés dans les conditions de conservations adéquates à chacun.

II.9.3. Préparation des pommades

Le protocole de fabrication des différentes pommades est illustré ci-après (Figure II.4) :

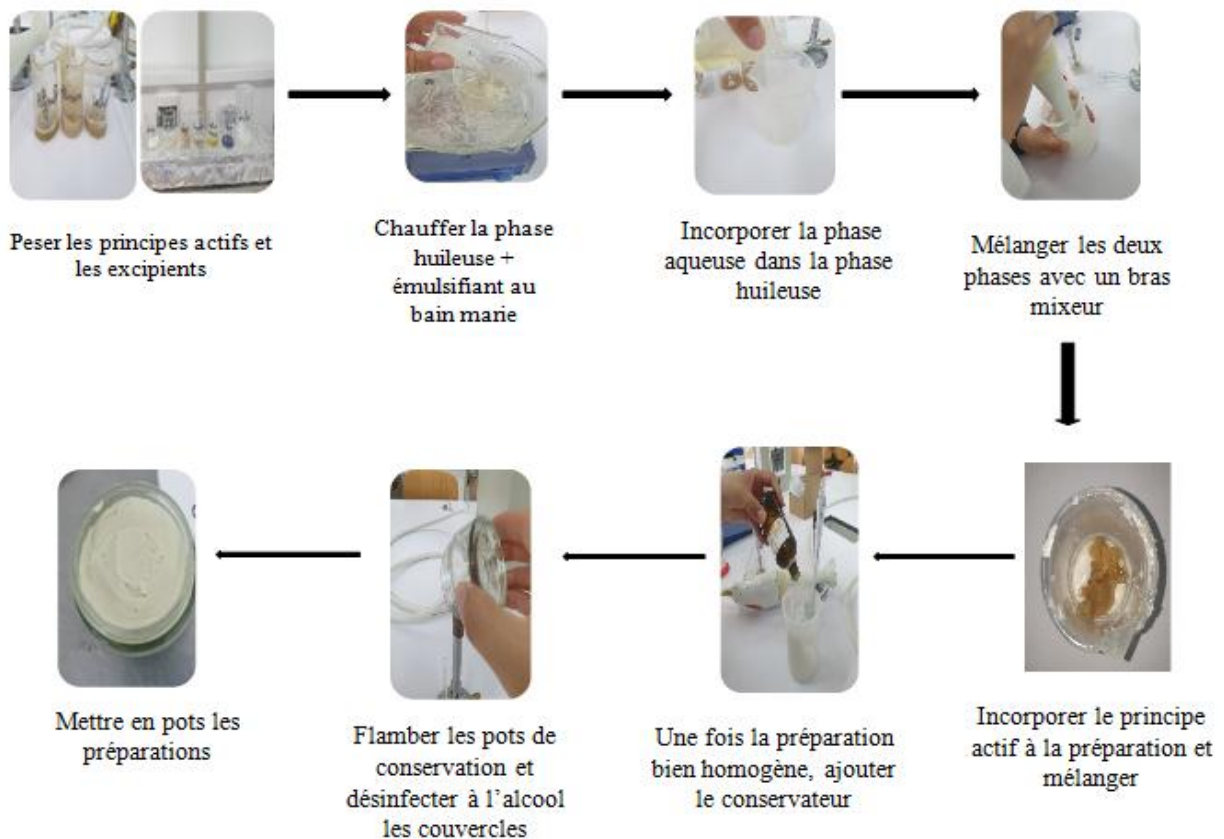


Figure II. 4 : Diagramme de fabrication des pommades

II.9.4. Contrôle de qualité microbiologique des émulsions préparées

II.9.4.1. Dénombrement des germes aérobies totaux et des levures et moisissures totales DGAT et DMLT

Mode opératoire :

- Faire fondre au bain marie à 100°C le milieu gélosé PCA et la gélose Sabouraud dextrose en desserrant légèrement les fermetures dans le bain marie en surfusion à 45°C ;
- Préparer une solution de 1g du produit à tester dans 9ml de la solution tampon péptonée au chlorure de sodium pH 7 (solution A) ;
- Agiter jusqu'à homogénéisation complète ;
- Prélever 1ml de la solution A préparée et déposer chaque prélèvement dans une boîte de Pétri de 90mm de diamètre ;
- Couler dans 2 des 4 boîtes de Pétri destinées au DGAT 15ml à 20ml du milieu gélosé PCA, et dans les 2 boîtes restantes destinées au DMLT 15 à 20ml de gélose Sabouraud dextrose ;
- Agiter doucement les boîtes par un mouvement circulaire pour assurer un mélange homogène de l'échantillon et la gélose, sans faire de bulles et sans mouiller les couvercles des boîtes ;
- Incuber les boîtes PCA à 30-35°C pendant 3-5 jours et les boîtes Sabouraud dextrose à 20-25°C pendant 5-7 jours.

II.9.4.2 Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus*

Mode opératoire :

- Repiquer sur gélose cétrimide 0,1 ml de la solution A et incuber à 30-35°C pendant 18 à 72h pour la recherche de *Pseudomonas aeruginosa* ;
- Repiquer sur gélose Chapman 0,1 ml de la solution A et incuber à 30-35°C pendant 18 à 72h pour la recherche de *Staphylococcus aureus* (Butin and Provence, 2022).

II.9.5. Détermination des propriétés pharmacologiques des différentes pommades préparées

II.9.5.1 Test de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

L'évolution de l'activité anti- inflammatoire de deux pommades obtenues a été faite in vivo sur 4 lots de 6 souris de souche NMRI femelles dont le poids est de $20g \pm 2$.

Une inflammation cutanée est induite sur la face interne de l'oreille gauche de chaque souris par application de $30\mu\text{l}$ d'un solvant irritant. Une heure avant, chaque lot reçoit :

- Lot1 (témoin négatif) : $30\mu\text{l}$ d'eau physiologique
- Lot 2 (témoins positif) : du Diclofénac à 1%
- Lot3: Pommade 1 (composée de chitosane+ collagène)
- Lot 4: Pommade 3 (composée de chitosane + collagène + polysaccharides)

Quatre heures après l'induction de l'inflammation, les souris sont sacrifiées par dislocation et les oreilles sont découpées puis des disques de 8mm de diamètre sont prélevés puis peser avec une balance de précision.

L'activité anti-inflammatoire est évaluée en comparant les poids de l'oreille gauche contenant l'œdème et l'oreille droite qui est saine. Le potentiel anti-inflammatoire des échantillons testés est déterminé par le pourcentage d'inhibition de l'œdème PIO.

La formule utilisée pour le calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (PIO) est la suivante (Mezit, 2018) :

$$\text{PIO} = \frac{\text{MD}(\text{témoin négatif}) - \text{MD}(\text{essai})}{\text{MD}(\text{témoin négatif})} \times 100$$

Avec :

MD (témoin négatif) : la moyenne de différences entre les deux oreilles du lot témoin négatif ;

MD (essai) : la moyenne des différences entre les deux oreilles du lot essai.

➤ **Etude statistique**

Les résultats sont évalués à l'aide du test de Student en utilisant le logiciel EXCEL.

Le test T ou test de Student est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes des deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique. L'emploi de ce test reste subordonné en général à deux conditions d'application importantes qui sont la normalité et le caractère aléatoire et simple des échantillons.

Le degré de signification :

- $P > 0,05$: la variation est non significative ;
- $P < 0,05$: la variation est significative ;
- $P < 0,01$: la variation est très significative ;
- $P < 0,001$: la variation est hautement significative.



Figure II. 5 : Diagramme détaillé du protocole du test anti-inflammatoire (Chader, 2019)

II.9.5.2 Test de l'activité cicatrisante *in vivo*

L'évaluation de l'activité cicatrisante des pommades a été réalisée sur 5 lots de 6 rats femelles adultes de souche Wistar (le rat Wistar est un albinos) d'un poids qui varie entre 180g et 200g.

Le choix d'un lot de 6 rats au lieu de 10 a été pris en respectant la règle des 3R créée par **Russell** et **Burch** en **1959** visant à la protection animale dans le cadre de la recherche scientifique. Les 3 R désignent les initiales de :

- Remplacer les modèles animaux par d'autres méthodes lorsque cela est possible.
- Réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'expérience.
- Raffiner les conditions d'élevage, de soins, et de la méthode utilisée dans la procédure afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur ou souffrance.

Une anesthésie des animaux a également été effectuée lors de cette expérience. (Figure II.6)

➤ Anesthésie :

L'anesthésie fait partie intégrante de l'expérimentation animale, elle est nécessaire d'un point de vue :

- Ethique.
- Pratique en cas de non faisabilité de certains tests sur les animaux éveillés.
- Méthodologique ; le stress et la douleur pouvant constituer des facteurs de confusion à l'origine de modification de la réponse biologique et donc des résultats expérimentaux, il faut cependant prendre en considération les interférences éventuelles de l'anesthésie avec ces mêmes résultats (**Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV**).



Figure II. 6 : Anesthésiant Kétamile et anxiolytique Midazolam utilisés dans cette étude

➤ **Induction des brûlures**

Les étapes de l'étude de l'activité cicatrisante sont rapportées ci-dessous et illustrées dans la figure : (**Chader, 2019**)

- Avant toutes pratiques les rats ont reçus un gavage de 2ml de solution glucosée à 30%.
- Les rats sont anesthésiés, dans un premier temps, avec une solution d'anxiolytique le Midazolam, suivie d'une autre injection d'une solution de Kétamile par injection intrapéritonéale.
- Une fois les rats complètement anesthésiés (Stade III de l'anesthésie générale : inhibition de la motricité semi volontaire et automatique)
- La partie dorsale des rats est par la suite épilée à la main,
- Une brûlure thermique du 3^{ème} degré est induite en utilisant un poinçon métallique préalablement chauffé au chalumeau pendant 30 secondes puis appliqué sur le dos de l'animal pendant 10 secondes
- Les surfaces brûlées des rats sont traitées quotidiennement avec une couche épaisse des pommades préparées pendant 15 jours, tout en couvrant les lésions avec des compresses stériles et du sparadrap dans des conditions d'asepsie. Ces dernières sont assurées par les mesures suivantes :

- Paillasse propre et matériel désinfecté ;
- Cages individuelles, changées tous les jours
- Alimentation normale

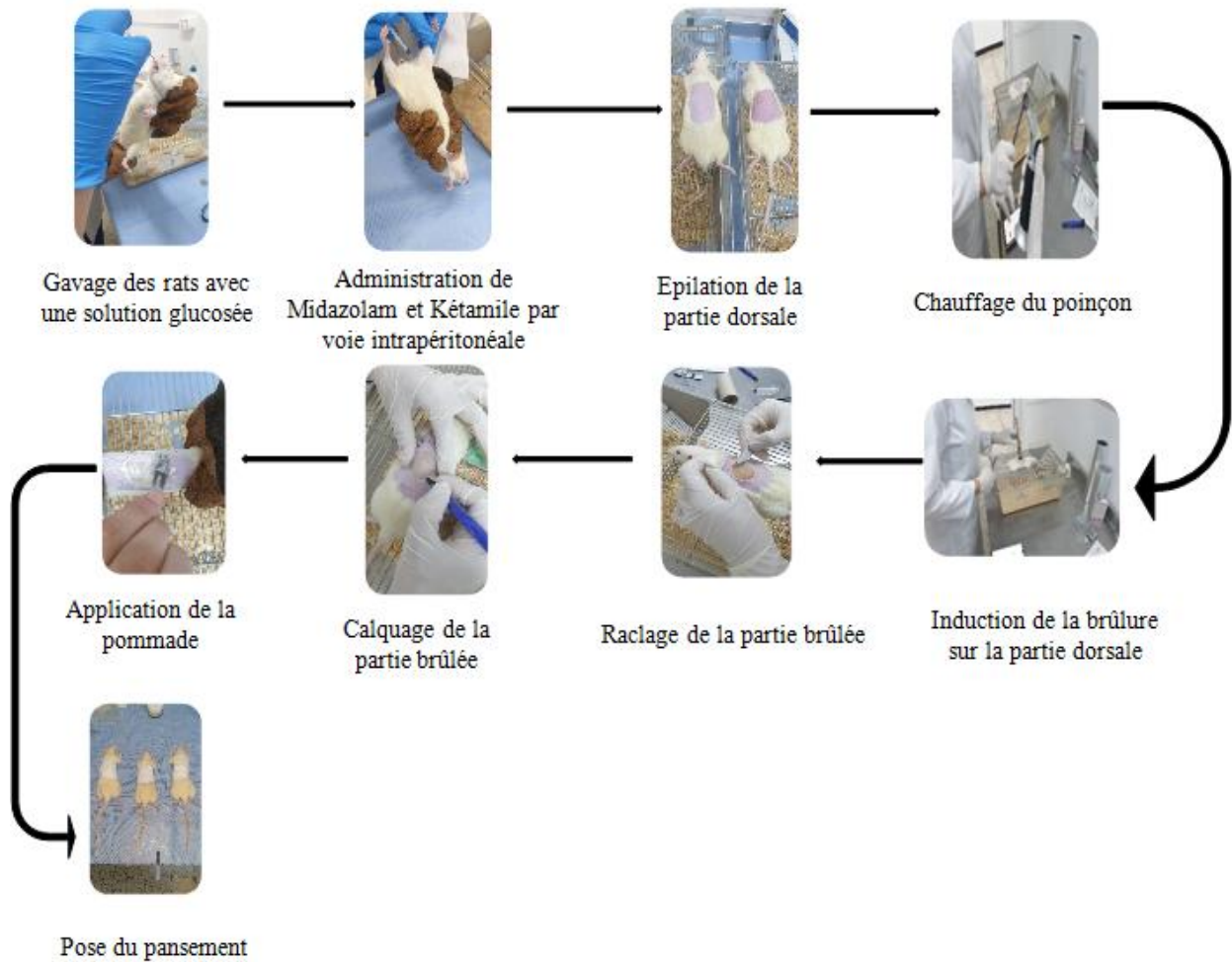


Figure II. 7 : Diagramme du protocole d'induction d'une brûlure de 3^{ème} degré.

➤ **Le standard : Crème Madécassol**

Le médicament MADECASSOL 1% est une crème à visée protectrice et cicatrisante indiquée dans le traitement local d'appoint des ulcérations cutanées et des plaies de la peau. Ce médicament est composé de l'hydrocotyle (extrait sec reconstitué tiré à 40% d'asiaticoside et 60% d'acides madécassique et asiatique) qui est à 1%.



Figure II. 8 : Traitement de référence (**Madécassol**)

Tableau II. 3 : Les traitements reçus par les différents lots de rats

Lots	Traitement
Témoin positif	Madécassol 1%
Lot 1	Pommade 1 (chitosane + collagène)
Lot 2	Pommade 2 (chitosane + collagène + polyphénols)
Lot 3	Pommade 3 (Chitosane + collagène + polysaccharides)
Lot 4	Pommade 4 (chitosane + collagène+ extrait de Codium)

➤ **Suivi des plaies**

Les plaies ont été observées et photographiées tous les 2 jours dans les mêmes conditions.

Tous les 2 jours, les contours des lésions sont repris sur un papier calque, puis leurs surfaces sont mesurées à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (J image).

➤ **Calcul du pourcentage de la réduction de la surface brûlée**

Le pourcentage de la réduction de la surface brûlée par rapport à la surface initiale a été mesuré selon la méthode décrite par (**Kim et al., 2008**).

La formule utilisée est la suivante :

$$R\% = (S_i - S_f) / S_i \times 100$$

Avec :

S_i : surface initiale de la brûlure (en cm^2) ;

S_f : surface finale de la brûlure (en cm^2).

➤ **Analyse statistique**

Les résultats obtenus sont exprimés en moyennes et variances qui ont été soumises à une analyse de la variance ANOVA à un facteur à l'aide du logiciel EXCEL. La valeur donnée peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

- $p > 0,05$: la différence n'est pas significative
- $0,05 > p > 0,01$: la différence est significative
- $0,01 > p > 0,001$: la différence est hautement significative
- $p < 0,001$: la différence est très hautement significative

Chapitre III. Résultats et Discussion

III.1. Identification des espèces de crevettes

L'identification des espèces de crustacés est basée sur plusieurs critères distinctifs décrits dans la fiche FAO (**Fischer, 1987**) et consignés dans le tableau III.1 ; pour les crevettes, c'est la morphologie du rostre et du telson qui est prise en considération. Les espèces identifiées sont les suivantes. (Figure III.1)

- *Parapenaeus longirostris* (crevette rose)

- *Aristeus antennatus* (crevette rouge)

Les deux espèces présentent un corps lisse et mou avec la présence de petites pinces aux trois premières paires de pattes. On distingue une coloration rouge pâle avec un rostre légèrement dentée chez *Aristeus antennatus* (**Risso, 1816**); et une couleur rose orangée avec un rostre recourbé en haut avec 8 dents, ainsi qu'un telson se terminant par 3 grandes dents, aiguës et fixes chez *Parapenaeus longirostris* (**Lucas, 1846**).



(A)







(B)

Figure III. 1 : Espèces de crevettes identifiées.

Aristeus antennatus (A), *Parapenaeus longirostris*(B)

Tableau III. 1 : Critères distinctifs des espèces identifiées (**Fischer, 1987**)

Espèce	Taille	Caractères distinctifs
<i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)	8 à 14 cm (mâles), et 12 à 16 cm (femelles)	Le rostre : bien développé et armé de dents, il est légèrement recourbé vers le haut, et dépasse légèrement le pédoncule antennaire, son bord dorsal avec 8 dents environ dont le postérieur est épigastrique et nettement séparée des autres  le telson : se termine par 3 grandes dents aiguës et fixes 

<p><i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816)</p>	<p>10 à 18 cm</p>	<p>le rostre ; armé de trois dents sur le bord dorsal</p>  <p>le telson : long et très étroit, comprimé latéralement, se termine par une pointe aigue</p> 
---	-------------------	--

III.2. Composition biochimique globale des coproduits de crevettes

La composition biochimique du mélange des coproduits de crevettes *Parapenaeus longirostris* et *Aristeus antennatus* est présentée dans le tableau III-2 et la figure III-2 et elle est comparée à celles décrites par les études antérieures.

Tableau III. 2 : Données comparatives de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes

Teneurs (%) /MS	Présente étude (Crevettes)	(Guesmi et Hennous, 2021) (Crevettes)	(Haddab et Kortbi, 2020) (Crevettes)	(Kefil, 2020) (Crevettes)
Teneurs en eau (%)	19,38	11,57	14,61	10,5
Teneur en minéraux (%)	49,75	39,88	37,49	32,6
Teneur en protéines (%)	9,9	8,3	28,96	24,26
Teneur en lipides (%)	6	11,04	6,99	8,7

III.2.1. Taux d'humidité (teneur en eau)

Au regard du tableau III.2, La teneur en eau du mélange des coproduits de crevettes (*Parapenaeus longirostris* et *Aristeus antennatus*), est de 19,38% du poids sec, cette valeur est supérieure à celle mentionnée par **Haddab e Kortbi (2020)** (14,61%) et par **Kefil (2020)** (10,5%) pour les mêmes espèces ainsi que celle mentionnée par **(Guesmi et Hennous (2021)** (11,57%) travaillant sur la crevette rose uniquement (*Parapenaeus longirostris*).

III.2.2. Teneur en matières minérale

En ce qui concerne la teneur en matière minérale, la valeur obtenue était de 49,75%, cette valeur est supérieure à toutes les valeurs enregistrées par les différents auteurs à savoir **Haddab et Kortbi (2020)** (37,49%); par **Kefil (2020)** qui est de 32,26% et par **Guesmi et Hennous (2021)** à (39,88%).

III.2.2. Teneur en lipides

Les carapaces de crevettes sont relativement pauvres en composés lipidiques (tableau III.2), la valeur obtenue (6%) corrobore avec celle relevée par **Haddab et Kortbi (2020)** (6,99%), elle en revanche inférieure à celle rapportée par **Guesmi and Hennous (2021)** qui était de (11,04%).

III.2.4. Teneur en protéines

La teneur en protéines de l'échantillon est de 9,9%, ce qui est supérieure à celle obtenue par **Guesmi et Hennous (2021)** qui est de 8,3%. Mais, elle représente moins du tiers des taux rapportés par **Haddab et Kortbi (2020)** et **Kefil (2020)** qui sont respectivement de 28,96% et 24,26%.

Cette considérable différence résulte vraisemblablement d'une décortication minutieuse et d'un bon nettoyage de la matière première, lors du nettoyage, toute la chair collée à la carapace et au telson a été extraite dans le but de faciliter et d'optimiser l'étape de déprotéinisation.

Le présent échantillon ne contenait quasiment pas de tête et il y avait une prédominance de la partie abdominale de la carapace de crevettes.

Ravoninjatovo et al. (2015) a mené une étude comparative entre la composition biochimique des têtes de crevettes et la carapace ; il en a conclu que les têtes sont plus riches importante en protéines que les carapaces. Lors d'une étude ; menée par **Randriamahatody (2011)**, il a été relevé des taux très élevés en protéines dans les têtes de crevettes qui étaient de l'ordre de 57%.

Il est courant que, pour les animaux aquatiques, des fluctuations dans la composition biochimique dans la chair et dans les coproduits soient observées chez un même individu, des écarts peuvent être relevés entre la région proche de la tête par rapport à celle de la queue.

Il est admis que la composition biochimique globale des coproduits de crustacés (crevettes) varie en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge, et aussi en fonction des saisons et des conditions environnementales. Ces variations peuvent exister au sein d'un même individu. En

effet, les crevettes muent au fur et à mesure qu'elles grandissent car la carapace devient trop petite pour leur corps, et après chaque mue l'animal se retrouve dans l'obligation de reconstituer un nouvel exosquelette. Cette grande variabilité dans les teneurs en protéines, lipides et minéraux a été déjà signalé par plusieurs auteurs pour un même individu dans le cas des crevettes (céphalothorax et carapace) (Waldeck et al., 2006; Kurita, 2006 et Randriamahatody, 2011). De l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette étude, on peut conclure que les coproduits de crevettes (mélange des deux espèces) contiennent de grandes quantités de cendres suivis de protéines et de lipides-pigments. Par déduction, ce qui reste représenterait la fraction chitineuse des crustacés (Figure III.2).

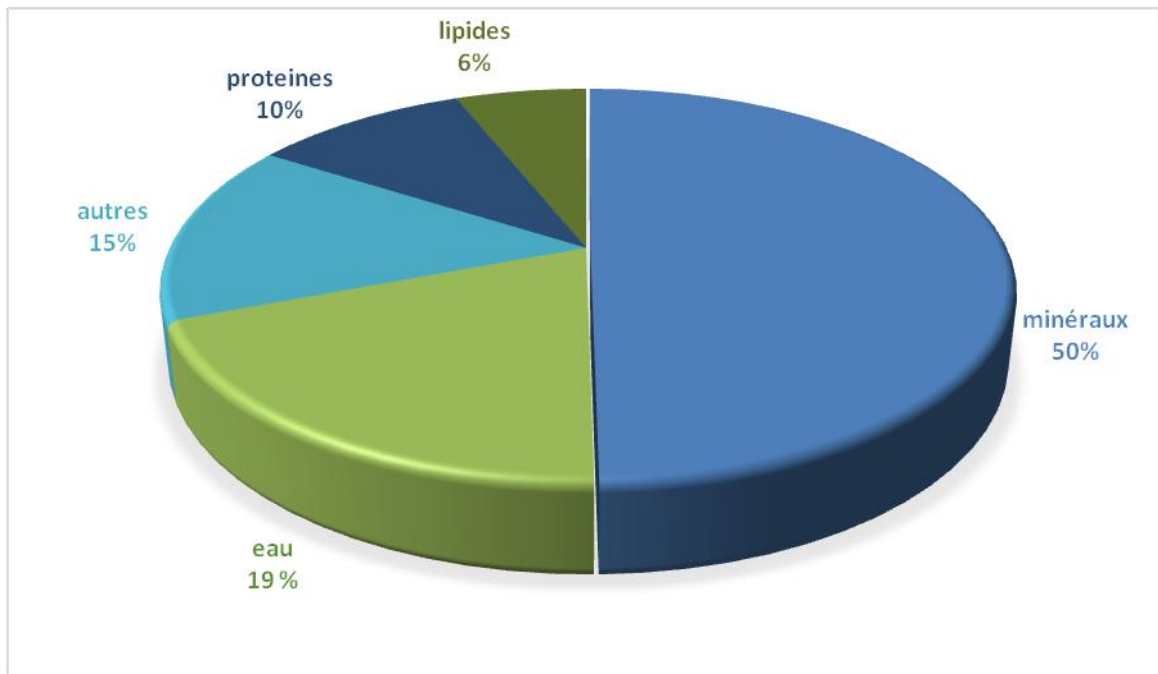


Figure III. 2 : Composition biochimique globale du mélange des coproduits de crevettes exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche (MS)

III.3. composition minérale des coproduits de crevettes

L'analyse par XRF des carapaces de crevettes (*Parapenaeus longirostris*, *Aristeus antennatus*) a révélé la présence de plusieurs éléments minéraux. Ces résultats sont représentés dans la figure III.3 ci-dessous

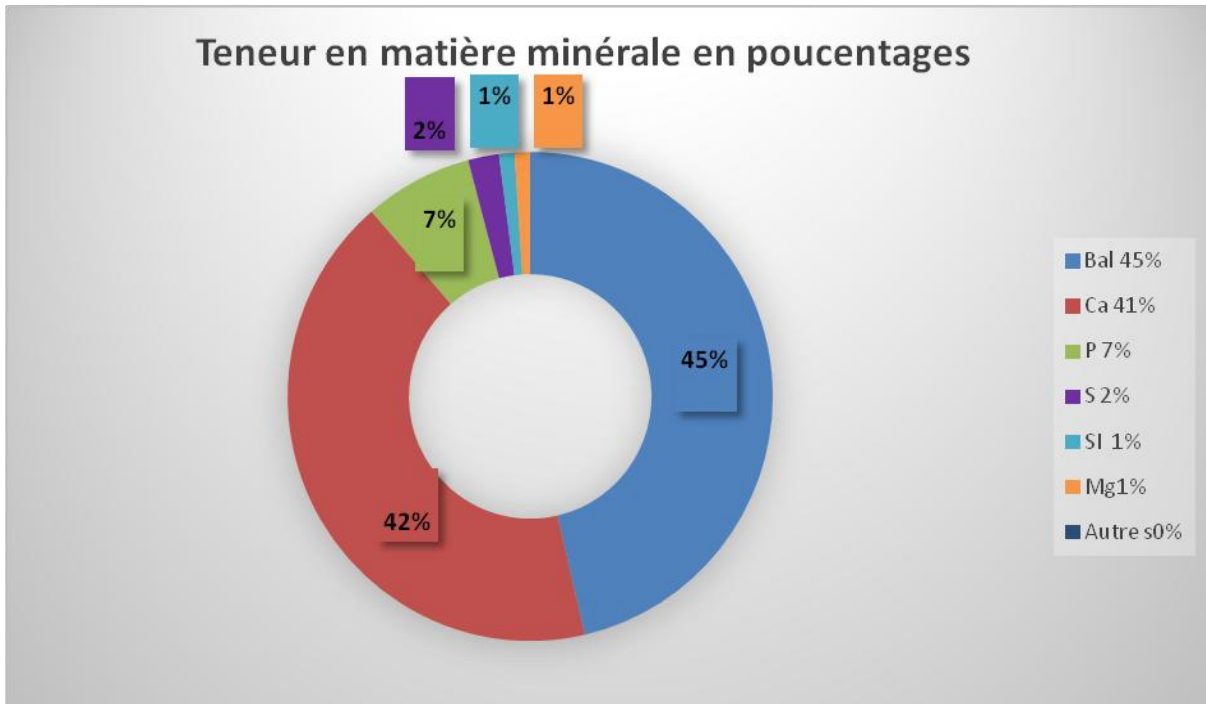


Figure III. 3 : Composition en matières minérales des carapaces de crevettes

Pour les carapaces de crevettes, le Bal et le calcium en sont les principaux composants avec un pourcentage de 45 et 41% respectivement.

La balangeroite (Bal) est un minéral fibreux, rare et récent, sa présence ce minéral dans les coproduits de crevettes est insolite. Il fut signalé dans les carapaces de crevettes pour la première fois par **Haddab et Kortbi en (2020)**. Des investigations sont en cours pour expliquer son origine.

D'autres éléments sont présents en un pourcentage moindre tels que : le phosphore (7%), le soufre (2%), le silicium (1%) et le magnésium (1%), etc.

Ces résultats restent plus importants que ceux obtenus par **Randriamahatody (2011)** pour *Parapenaeus longirostris* qui sont de 6% pour le calcium, 0,61% pour le magnésium et 0,68% pour le phosphore.

Des éléments métalliques en très faible quantités tels que l'or, le cuivre, le fer, l'arsenic ont été également détectés.

III.4. Caractérisation du chitosane produit

Afin de déterminer le rendement d'extraction du chitosane et d'apprécier sa qualité, sa teneur en protéines et de matière minérale résiduelles, sa solubilisation dans un acide dilué et son degré de désacétylation par la méthode FTIR ont été déterminés.

III.4.1. Rendement massique

Le rendement massique du chitosane obtenu après déminéralisation, déprotéinisation et désacétylation des coproduits de crevettes (*Parapenaeus longirostris* et *Aristeus antennatus*), est de 11,88 % (Figure III.4 et Tableau III.3).

La valeur obtenue est similaire à celle obtenue par **Guesmi et Hennous (2021)** (11,13%). En revanche, le taux obtenu est supérieur à ce qui a été rapporté par **Haddab et Kortbi (2020)** et **par Kefil (2020)** (9,6 %) et (6,84 %) respectivement.

Tableau III. 3 : Rendement massique du chitosane obtenu à partir des coproduits de crevettes rapportés dans la littérature

	Présente étude (crevettes)	(Guesmi et Hennous, 2021)	(Haddab et Kortbi, 2020)	(kefii, 2020)
Rendement d'extraction	11,88%	11,13%	9,6%	6,84%

Selon **Özogul et al. (2018)**, Les rendements massiques varient en fonction de plusieurs facteurs tels que : la méthode d'extraction, l'espèce utilisée, les saisons et les conditions environnementales (zones de pêche).



Figure III. 4 : Pesée du chitosane produit à partir de 200 g des carapaces de crevettes

III.4.2. Solubilité

Le chitosane produit à partir des carapaces de crevettes se solubilise parfaitement dans l'acide acétique à 1% ; la solution est translucide avec un aspect très visqueux (Figure III.5). Ceci indique également que la chitine a été correctement déacétylée.



Figure III. 5 : Solubilisation du chitosane extrait de crevettes dans l'acide acétique à 1%
 Contrairement à la chitine qui est insoluble dans les solvants aqueux, le chitosane est soluble dans les acides faiblement dilués (comme l'acide acétique, lactique, citrique,...).

Les groupes aminés du chitosane subissent une protonation et deviennent chargés positivement à partir de $\text{pH} = 3$, le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3. À un pH supérieur ($>6,5$), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite (**Rinaudo et al., 1993**).

III.4.3. Caractérisation biochimique

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements de déminéralisation et de déprotéinisation appliqués aux coproduits de crevettes, la teneur du chitosane en protéines et cendres résiduelles a été déterminée. Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après (Tableau III,4).

Tableau III. 4 : Degrés.de déminéralisation et de déprotéinisation du chitosane produit

	Chitosane produit
DM(%)	23,35
DP(%)	18,4

L'attaque acide de la poudre de crevettes a permis une déminéralisation de l'ordre de 23,35%. Ce taux résiduel est nettement inférieur à ceux rapportés par **Haddab et Kortbi (2020)** (53,31%) et par **Kefil (2020)** (36%). En revanche, le degré de déminéralisation enregistré par **Guesmi et Hennous (2021)** était de (100%), soit une élimination totale des matières minérales.

L'utilisation d'une base forte a permis une bonne déprotéinisation de la chitine (18,4%) qui est inférieure à celles rapportées par **Guesmi et Hennous (2021)** (63,2%) et par **Haddab et**

Kortbi (2020) (100%). Le degré de déprotéinisation dépend de la concentration en NaOH et de la température appliquée.

III.4.4. Degré de désacétylation

III.4.4.1. Spectrophotométrie infrarouge (FTIR)

La FTIR a été réalisée dans la gamme de fréquences 4000–500 cm^{-1} sur des pastilles de KBr contenant le chitosane produit à partir des coproduits de crevettes. La caractérisation entraîne l'apparition d'une série de pics d'absorption qui sont représentés dans la figure III.6 ci-dessous :

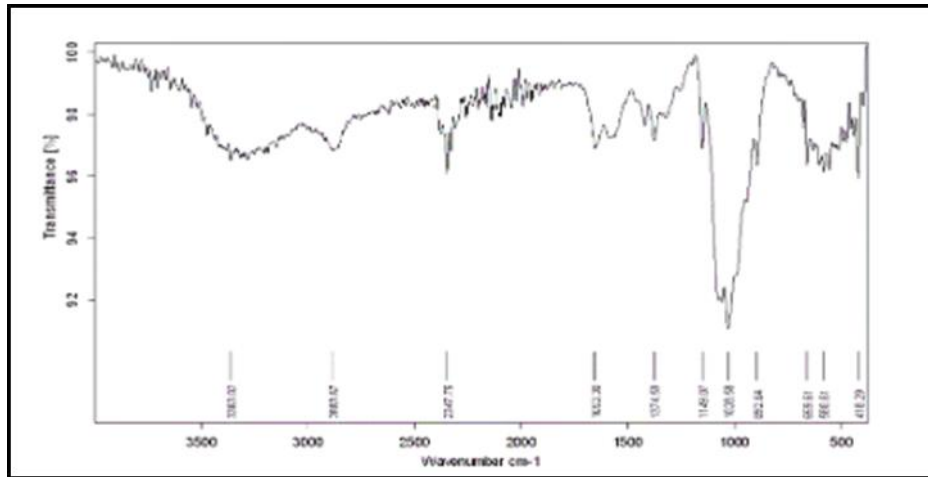


Figure III. 6 : Spectres FTIR du chitosane produit.

Les spectres révélés par la FTIR ont permis de mettre en évidence plusieurs liaisons caractéristiques du chitosane telles que : les liaisons (O-H) dans les régions 3300 et 1155 cm^{-1} , les liaisons (C-H) dans les régions 2879 cm^{-1} , 2922 et 2888 cm^{-1} , les liaisons C=O aux pics 1660 cm^{-1} , et aussi des liaisons (N-H) dans les régions 1643, 1594 cm^{-1} .

En se basant sur les spectres obtenus et en utilisant la formule mentionnée par **Hafsa et al. (2016)**, le DDA du chitosane produit est de 98%, ce résultat est largement supérieur à ceux obtenus par par **Haddab et Kortbi (2020)** (80,12%), **Oulhiz (2018)** sur la crevette rose *Parapenaeus longirostris*, en utilisant deux méthodes chimiques (65% et 72,73%). Cette différence peut être due à la concentration de NaOH utilisée pour la désacétylation et la déprotéinisation de la chitine qui est 10N chez (**Oulhiz, 2018**).

Les degrés de désacétylation de la chitine extrait des carapaces de crevettes sont consignés dans le tableau III.5 ci-dessous :

Tableau III. 5 : degré de désacétylation du chitosane

	Présent travail FTIR	Résultats de Haddab et Kortbi (2020)	Résultats de d'Oulhiz (2018) (Crevettes)	Résultats de Bellouti et Hadj Djilani (2018) (crevettes)
Crevettes	98%	80,12%	72,34%	82,59%

III.5. Mise en évidence du collagène extrait

III.5.1. Test du Biuret

Trois essais ont été utilisés, un témoin négatif (eau distillée), un témoin positif (protéine de référence BSA), et l'échantillon qui est le collagène extrait, le résultat obtenu montre la formation d'un complexe mauve entre les ions cuivre II (Cu^{2+}) et les liaisons covalentes contenues dans ce dernier (Figure III-8). Cela indique que le test est positif et qu'il y a présence de collagène. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par (Lablack, 2012 ; Oulhiz, 2018 et Lassoued et al., 2022).

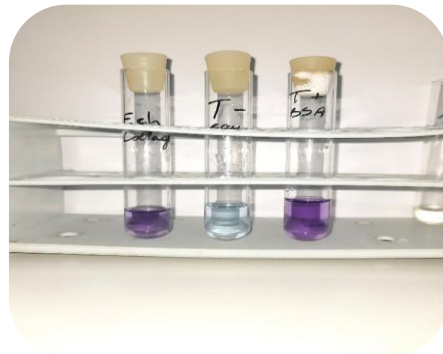


Figure III. 7 : Mise en évidence de la présence du collagène avec la méthode de biuret

III.5.2. Test à la xanthoprotéine

De même, trois essais ont été utilisés, un témoin négatif (eau distillée), un témoin positif (protéine de référence BSA), et le collagène extrait. Le résultat obtenu montre la formation d'un complexe jaune orangé, qui reflète la réaction de nitration lors du chauffage du collagène avec de l'acide nitrique concentré (HNO_3) (Figure III.9). Cela indique que le test est positif

(présence de collagène) conformément à ce qui a été décrit par **Lablack,(2012) ; Lassoued et al., 2022 et Oulhiz, 2018)**



Figure III. 8 : Résultat du test à la xanthoprotéine

III.5.3. Rendement massique

Le rendement massique du collagène extrait et lyophilisé est de 21%. La valeur obtenue est supérieure à celle obtenue par **Lablack (2012)** (19,53%), et inférieure à celle relevée par **Nagai et Suzuki (2000)** (50%).

III.5.4. Poids moléculaire du collagène déterminé Par SDS-PAGE

Le profil du collagène extrait des peaux de sole et de raie analysé par SDSPAGE dans des conditions réductrices est illustré sur la figure III.9.

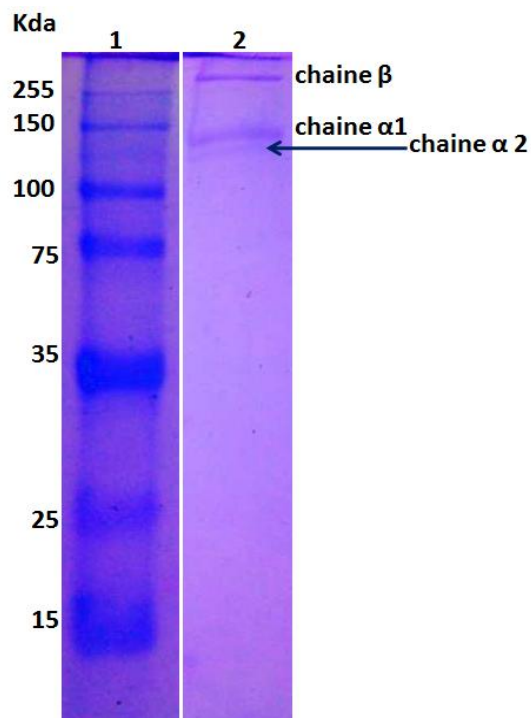


Figure III. 9 : Profil électrophorétique du collagène extrait en présence de dodécyl sulfate de sodium. Piste 1: marqueurs de haut poids moléculaire ; piste 2 : collagène extrait (échantillon).

Le modèle SDS-PAGE a montré que le collagène obtenu à partir de peau de sole et de raie se compose de deux chaînes α différentes ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) avec un poids moléculaire compris approximativement entre 120 et 110 kDa et une chaîne β avec un poids moléculaire supérieur à 225 kDa.

En effet ces résultats obtenus correspondent à la plupart des autres travaux rapportés dans la littérature (Nagai et al., 2004, Jongjareonrak et al., 2005 et Kittiphattanabawon et al., 2005).

III.6. caractérisation spectrale des pigments hydrosolubles

Les différents pigments extraits ont fait l'objet d'une caractérisation d'absorption de la lumière en réalisant un balayage de spectre de 400 à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible classique.

Les phycobiliprotéines : Les phycobilines sont des pigments principalement présents chez les algues rouges et les cyanobactéries. Comme les caroténoïdes, ce sont des pigments accessoires transférant l'énergie vers la chlorophylle a. Ils sont divisés en deux grands groupes : les phycoérythrine caractérisées par une coloration rouge et les phycocyanines donnant une coloration bleue et émettant une fluorescence rouge.

- **Les pigments extraits des algues rouges (*Sphaerococcus sp* et *Jania rubens*) :**

La phycoérythrine extraite de *Sphaerococcus sp*, qui est un pigment associé à une protéine hydrosoluble, absorbe à une longueur d'onde de 520 nm.

Ce résultat corrobore avec la littérature, où le maximum d'absorption est enregistré entre 490 et 570 nm (Wilmotte, 2008 et Pérès, 2022).

- **Le pigment des cyanobiontes (algue bleu-verte) (phycocyanine) :**

La phycocyanine (du grec phyco signifiant « algue » et cyanine venant de la couleur « cyan » qui est dérivé du grec « kyanos » signifiant bleu-vert) est l'association des protéines de la famille des phycobiliprotéine, et des pigments hydrosolubles. Elle absorbe les lumières orange et rouge aux alentours de 610 et 650 nm (wilmotte, 2008 et Pérès, 2022). La phycocyanine extraite absorbe à la longueur d'onde 650 nm.

- **Les pigments des algues Brune *Padinasp* :**

La fucoxanthine est un pigment caroténoïde jaune à brun de certaines algues, dont les algues brunes. Ce pigment absorbe à des longueurs d'ondes entre 500–560 nm (bleu-vert) et constituant une composante importante de l'antenne. Le terme fucoxanthine est composé du grec phûkos (algue) et xanthós (jaune).


Le pigment extrait absorbe à une longueur d'onde 457nm. Le résultat final montre que les algues brunes absorbent les rayons lumineux aux alentours de 450nm (**Pérés, 2022**)

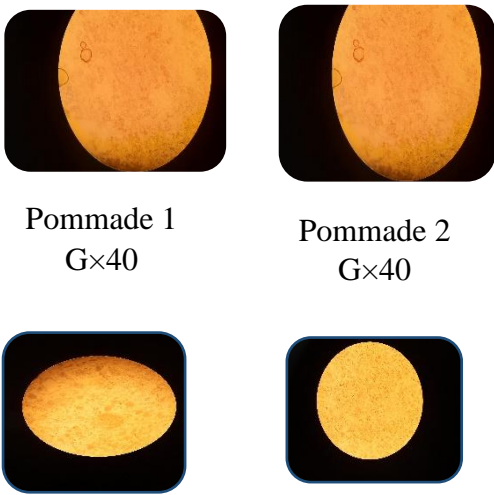
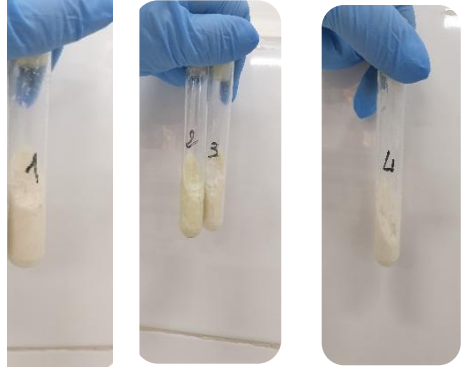
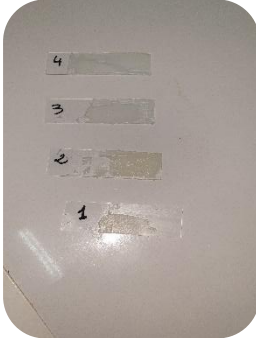

III .7. Caractéristiques physico-chimiques des pommades préparées

Quatre pommades ont été préparées, pommade1 dont les principes actifs sont le chitosane et le collagène, pommade 2 avec comme principal ingrédient chitoane, collagène et polyphénols, pommade 3 avec comme principes actifs chitosane collagène et polysaccharide, et pommade 4 avec comme un ingrédient actifs chitosane collagène et extrait de codium.

Les pommades sont destinées à être utilisé dans différents conditions (froid, chaleur et humidité), pour s'assurer de leurs stabilité, les pommades ont été stockées à + 4°C, le suivi des pommades a été fait pendant plus de deux mois. Les différents tests sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau III. 6 : Caractéristiques physico-chimiques des quatre pommades préparées.

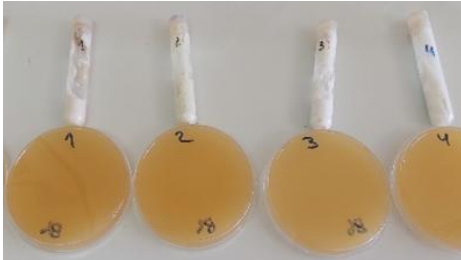



<p>Aspect macroscopique :</p> <p>J₁ : les quatre pommades sont onctueuses, lisses, épaisses et sans odeurs.</p> <p>J₁₅ : les quatre pommades sont stables et on remarque l'absence de formation de croute à la surface.</p> <p>L'aspect à 3 mois reste le même qu'a J₁</p>	
--	--

<p>Aspect microscopique :</p> <p>Nos préparations sont des pommades où l'excipient est la vaseline ce qui les classe dans la catégorie de pommades lipophiles, (hydrophobe) absorbant qu'une petite quantité d'eau.</p> <p>Ici on remarque une bonne distribution et absence de coalescence et de floculation. La répartition des gouttelettes de la phase huileuse en fonction de leurs tailles est homogène.</p>	 <p>Pommade 1 G×40</p> <p>Pommade 2 G×40</p> <p>Pommade 3 G×40</p> <p>Pommade 4 G× 40</p>
<p>Stabilité à la centrifugation :</p> <p>Après une centrifugation à une vitesse de 3000 tours/min pendant 20min, aucune séparation de phases n'a été observée, les pommades sont donc stables et homogènes.</p>	
<p>Homogénéité et distribution :</p> <p>Pommades homogènes, lisses, ne présentent pas de grumeaux et s'étale facilement</p>	
<p>Détermination de la valeur du pH :</p> <p>pH = 7</p>	

III.7.1. Qualité microbiologique des produits fabriqués

Les résultats des contrôles microbiologiques des pommades pharmaceutiques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III. 7 : Qualité microbiologique des pommades préparées

Milieux/pommades	Résultats de la qualité microbiologique	Normes
PCA (DGAT)		00 UFC/g $\leq 10^2$
Cétrimide (P.a)		00 UFC/g Absence
Chapman (S.a)		00 UFC/g Absence
Sabouraud (DLMT)		00 UFC/g $\leq 10^2$

DGAT : le nombre de germes aérobies totaux, DLMT : le nombre total des levures et Moisissures, Pa : *Pseudomonas aeruginosa*, Sa : *Staphylococcus aureus*

Selon la pharmacopée européenne, les quatre produits finis sont de qualité microbiologique satisfaisante, vu qu'il y a absence totale de germes aérobies totaux, des levures et moisissures, ainsi que des germes spécifiques : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Ces résultats indiquent que les pommades fabriqués sont conformes. (Garlock, 2011; Daikh et Dafri, 2017 et Butin et Provence, 2022)

III.8. Activité antibactérienne des principes actifs des pommades préparées

Les principes actifs tels que le chitosane, les polyphénols, les polysaccharides ainsi que l'extrait méthanoïque de *Codium bursa* ont été testés pour leur activité antagoniste vis à vis de quatre germes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus sp*. Les résultats obtenus sont reportés ci-après. (Tableau III.8 et figure III.13)

Tableau III. 8 : Activité antagoniste du chitosane, des polyphénols, des polysaccharides ainsi que des extraits méthanoïques de *Codium bursa* testée par la méthode de diffusion des disques sur gélose.

Souches	Diamètre des zones d'inhibition exprime en (mm)			
	Chitosane	Polyphénols	Polysaccharides sulfatés	Extrait de <i>Codium bursa</i>
<i>Escherichia coli</i>	23	17	19	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	11	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	09	13	12
<i>Enterococcus sp</i>	16	11	-	18

Diamètre des zones d'inhibition en mm = différence entre le diamètre des zones d'inhibition détenu et le diamètre des disques (6mm)

- : Absence d'activité antagoniste.

Au regard du tableau III.8, on constate que le chitosane est la molécule la plus bioactive, il a présenté une activité antibactérienne contre toutes les souches testées avec les plus grands diamètres des zones d'inhibition. Selon la littérature, l'activité antimicrobienne du chitosane augmente avec un degré de désacétylation élevé (Aljawish, 2013).

L'activité antagoniste du chitosane préparé semble supérieure à celle du chitosane obtenu à partir de carapaces de crevettes (*E.coli* 10,08 mm, *Pseudomonas* 12,53mm et *S.aureus* ;

13.58 mm) par **Oulhiz (2018)** et à partir de crabes (*E.coli*, 13,04 mm et *S.aureus* 8,17 mm) par **Prabu et Natarajan (2012)**.

Les composés phénoliques issus de l'*Ulva lactuca* ont également montré une très bonne activité antagoniste vis-à-vis des quatre germes testés. Il en est de même pour l'extrait méthanoïque de *Codium* qui a présenté une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ensemble des souches testées à l'exception de *Pseudomonas* qui s'est révélée insensible à son action.

Les polysaccharides sulfatés extraits de l'*Ulva lactuca* ont eu une action inhibitrice contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par **Mishra (2018)**. L'extrait à l'acétate d'éthyle d'*U. lactuca* a été observé avec la zone d'inhibition la plus faible ($5,0 \pm 0,0$ mm) contre *S. aureus* et contre *P. aeruginosa* ($6,0 \pm 0,0$ mm). Pour *E. coli*, les extraits au butanol de l'*U. lactuca* ont montré les valeurs les plus élevées ($12,0 \pm 0,54$ mm).

Selon **Cherif et al., (2011)**, les activités des extraits de deux espèces représentatives de la famille des Codiaceae (*C. fragile* et *C. bursa*) sont relativement semblables, puisque ces derniers ont inhibé les mêmes espèces bactériennes suivantes : *S. aureus*, *P. fluorescens*, *P. cepacia* et *E. faecalis*. Cependant, l'extrait de *C. fragile* a donné des diamètres d'inhibition plus importants.

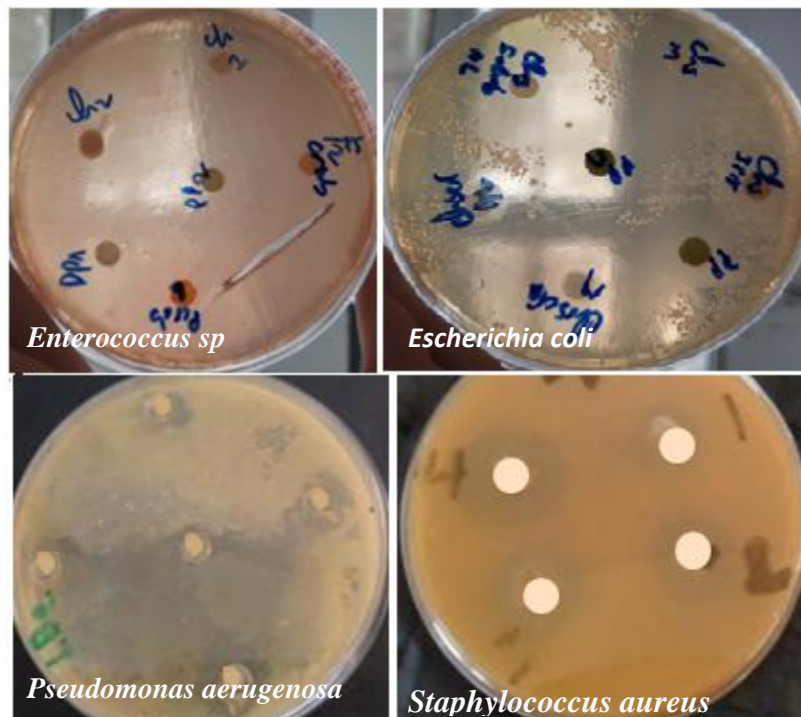


Figure III. 10 : Activité antibactérienne des principes actifs des pommades préparées

III.9. Activité anti-inflammatoire des pommades préparées

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des pommades a été réalisée sur le modèle de l'œdème de l'oreille de souris induit au xylène à 96% et estimée par le pourcentage d'inhibition de l'œdème (PIO) (Chader, 2019). Quatre heures après l'induction de l'inflammation, les souris du groupe témoin négatif ont développé un œdème au niveau de leur oreille gauche avec un poids moyen de 0,01g contre un poids de l'œdème \leq à 0,004g pour les lots traités avec les pommades élaborées.

Les valeurs des poids des oreilles du groupe témoin négatif sont toujours comparées aux autres valeurs des lots traités en utilisant le test T (en supposant que la valeur moyenne des poids suit la loi normale et l'égalité des variances avec des différences non significatives), Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau III.9 Et la figure III.14 suivants :

Tableau III. 9 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème (PIO) des pommades

	Témoin négatif eau physiologique	Témoin positif Diclofénac	Pommade 1	Pommade 3
Poids de l'œdème en (g)	0,0100	0,0046	0,00257	0,0033
PIO (%)	-	53,50%	72,59%	66,27%

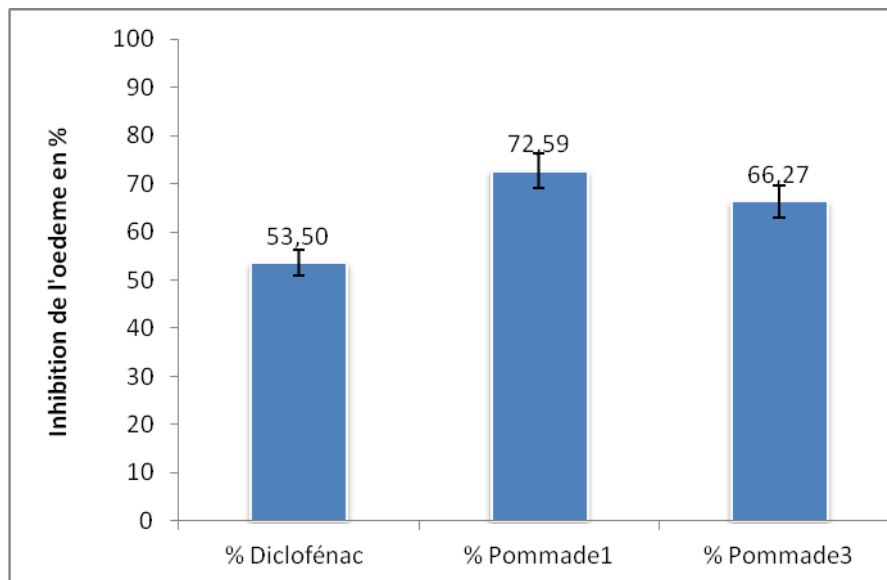


Figure III. 11 : Potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) pour chaque traitement appliqué.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des pommades ont été comparés avec ceux du Diclofénac (tableau III.9) et avec le lot contrôle (témoin négatif traité à l'eau physiologique).

La pesée des oreilles des souris traitées avec la pommade 1 et la pommade 3 a montré une faible différence entre les poids des oreilles traitées (gauche) et non traitées (droit) (0,00257g et 0,0033 g) respectivement, contre une différence de 0,01g chez le lot témoin négatif, ce qui traduit une inhibition significative ($p < 0,05$) de l'inflammation avec un pourcentage d'inhibition de 72,59% et 66,27% respectivement.

Chez les souris traitées localement avec le Diclofénac à 1%, on remarque une inhibition significative ($p < 0,05$) de l'œdème de l'oreille par rapport à celle des souris du groupe témoin négatif, et qui passe de 0,01g à 0,0046 mg ; ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation de 53,50 %.

Au regard des résultats obtenus, on constate aussi l'efficacité des deux pommades préparées (1 et 3) dans l'inhibition de l'inflammation de l'oreille, avec une différence non significative ($p > 0,05$), par rapport à celle des souris traitées au diclofenac (témoin +). Ces pommades (1 et 3) à base de bioressources marines possèdent un potentiel d'inhibition de l'œdème aussi efficace que le Diclofénac commercial.

Ces résultats sont très encourageants et corroborent avec ce qui est décrit dans la littérature. **Adnan et al.(2020)** ont montré que, suite à une injection intra plantaire chez les rats d'une solution de carragénine (1%), le chitosane O-carbométhylé (dérivé du chitosane) présente un pouvoir anti-inflammatoire de 45,5%, ce résultats reste inférieurs à ceux obtenus dans le présent travail.

Dans une autre étude menée par **Qiao et al. (2011)**, où les souris ont reçu des injections de doses létales de lipopolysaccharide (LPS) bactérien induisant une inflammation de 90% à 100%, la mort des souris (témoin négatif) est intervenue trois jours après l'injection. Alors que pour celles traitées avec du chitosane, le taux de survie a augmenté jusqu'à 52% pendant la même période.








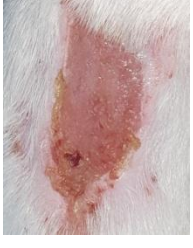

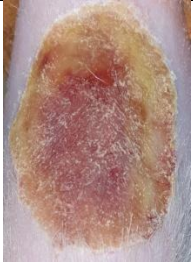






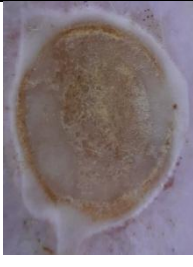
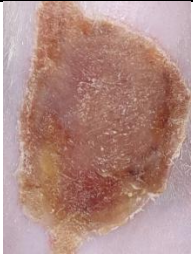

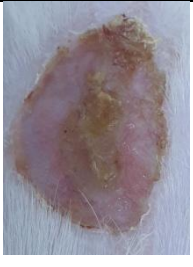
III.10. Activité cicatrisante des quatre pommades préparées

L'activité cicatrisante des quatre pommades préparées a été évaluée sur des brûlures du 3^{ème} degré sur 04 lots dont chacun est constitué de 06 rats femelles adultes de souche Wistar femelles. Suite à un nombre insuffisant d'animaux, il n'a pas été possibles de faire un lot de témoin (-), de ce fait cette étude sert d'amorce pour d'autres travaux futures. De même faute de temps, il n'a pas été possible de faire un suivi au-delà de 15jours. Néanmoins, un

cinquième lot a été utilisé à titre comparatif (témoin positif) pour comparer le pouvoir cicatrisant des pommades à celui de la crème commerciale "Madécassol".

La description macroscopique des brûlures traitées pendant ces 15 jours est rapportée dans le tableau (Tableau III.10) suivant :

Tableau III. 10 : Descriptions macroscopiques des brûlures traitées avec les quatre pommades préparées ainsi que le madécassol durant 15 jours (avec un intervalle de 5 jours)

	J0	J5	J10	J15
Lot 1 Pommade N°1 : Chitosane Collagène				
Lot 2 Pommade N° 2: Chitosane Collagène Polyphénols				
Lot 3 Pommade N°3 : Chitosane Collagène Polysaccharides				
Lot 4 Pommade N° : Chitosane Collagène Extrait de Codium				
Lot 5 Témoin + Madécassol				

Description	La brûlure est d'un couleur brunâtre / blanchâtre (de façon hétérogène) avec des contours blancs.	Phase de déterision : - Apparition d'érythème et d'œdème au niveau des contours. - Plaies fibrineuses et exsudatives. - Formation de la croûte.	Phase de bourgeonnement : - Debut de décollement de la croûte. - Début de revascularisation des plaies.	Phase d'épithélialisation: - Contraction de la plaie. - Les plaies prennent une couleur rose.
-------------	--	--	---	---

Le graphe ci-dessous (Figure III.15) présente la variation de la superficie de la plaie (cm²) pendant le traitement des brûlures avec les quatre émulsions et le témoin positif.

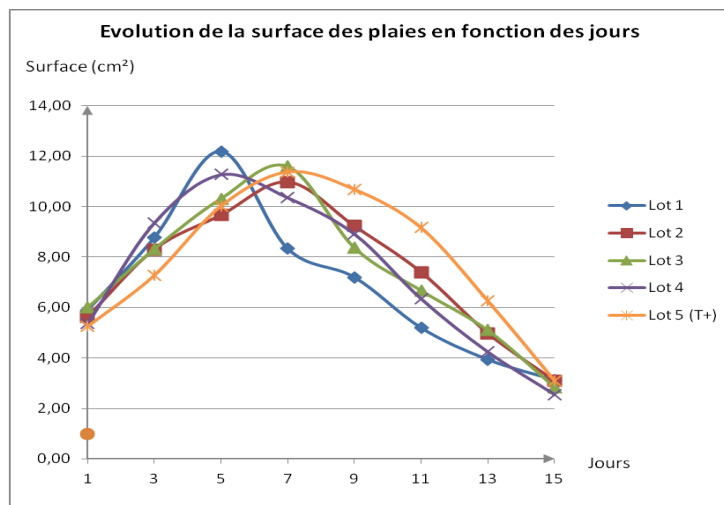


Figure III. 12 : Evolution des surfaces brûlées en cm² durant 15 jours de traitement avec les quatre pommades préparées. Lot 1=pommade 1, lot 2=pommade 2, lot 3=pommade 3, lot 4=pommade 4, lot 5= témoin (+) (madécassol),

D'après le graphe, la cicatrisation pour les cinq lots de rats se manifeste en 2 phases :

- **Phase 1 :** Une augmentation importante des surfaces brûlées est remarquée et cette phase s'étale sur une durée de cinq à sept jours.

Pour les pommades 1 et 4 la surface de la plaie passe d'une moyenne de 6 cm² à j₁ à une moyenne de 12 cm² et 11 cm² respectivement à j₅.

Pour les pommades 2 et 3, la surface passe de 5,62 cm² et 6 cm² à J₁ à une moyenne de 10,98 cm² et 11,60 cm² à J₇.

Quant au témoin +, elle passe de 5,25 cm² (J₁) à 11,39 cm² à J₇.

→ Cette augmentation de la surface brûlée est tout à fait normale car elle fait partie du processus de cicatrisation ; c'est la phase inflammatoire et de déterision. Cette phase

fait intervenir des cellules inflammatoire leucocytes (polynucléaires neutrophiles et monocytes) dont le rôle est d'éliminer tous résidus des tissus brûlés, de nettoyer la plaie et la décontaminer de tout agent infectieux, ceci grâce aux enzymes protéolytiques (protéase, hydrolase, lysozyme, lactoferrine) qu'elles produisent pour qu'enfin la prolifération et la migration cellulaires puisse commencer (**Lafourcade, 2015**).

- **Phase 2 :** A la suite de cette phase inflammatoire (05 jours pour les pommades 1 et 4, 7 jours pour les pommades 2,3 et Madécassol), une diminution progressive des surfaces est notée pour atteindre une moyenne de 3,12 cm² et 2,56 cm² pour les pommades 1 et 4 au J₁₅, et 3,09 cm² et 2,85cm² pour les pommades 2 et 3 et 3,49 cm² pour le témoin +, ce qui correspond à un pourcentage de réduction des surfaces des brûlures de :
 - ✓ 47,02 % pour la pommade 1
 - ✓ 45,10 % pour la pommade 2
 - ✓ 52,53 % pour la pommade 3
 - ✓ 52,21 % pour la pommade 4
 - ✓ 33,49 % seulement pour la crème commerciale (Madécassol)

→ Juste après la phase de détersion, les cellules inflammatoires diminuent au profit des cellules endothéliales et des fibroblastes. Ces dernières migrent des extrémités de la plaie vers le centre où différentes molécules sont synthétisées afin de former une nouvelle matrice extracellulaire qui sera, par la suite, revascularisée par de nouveaux vaisseaux sanguins pour donner un tissu de granulation (néo-angiogenèse). En effet, ce tissu est jeune et lâche ; il comble la perte de substance dermique et permet ainsi la réparation épidermique qui se fait à partir des berges de la plaie ainsi que des reliquats épidermiques épargnés par la brûlure. Les cellules endothéliales permettent ainsi une reconstruction de la trame vasculaire tandis que les fibroblastes fabriquent simultanément des fibres de collagène et des protéines favorisant la contraction et donc la rétraction de la plaie (**Lafourcade, 2015, Gachie, 2012 et Rochet et al., 1998**).

Durant le traitement aucune odeur et aucune sulfuration des plaies n'a été notée, ce qui indique une bonne qualité de reconstitution.

III.10.1. Étude comparative

Les mesures des surfaces des plaies ont été utilisées pour évaluer l'effet cicatrisant des pommades issues de produits et coproduits marins. (Figure III.16)

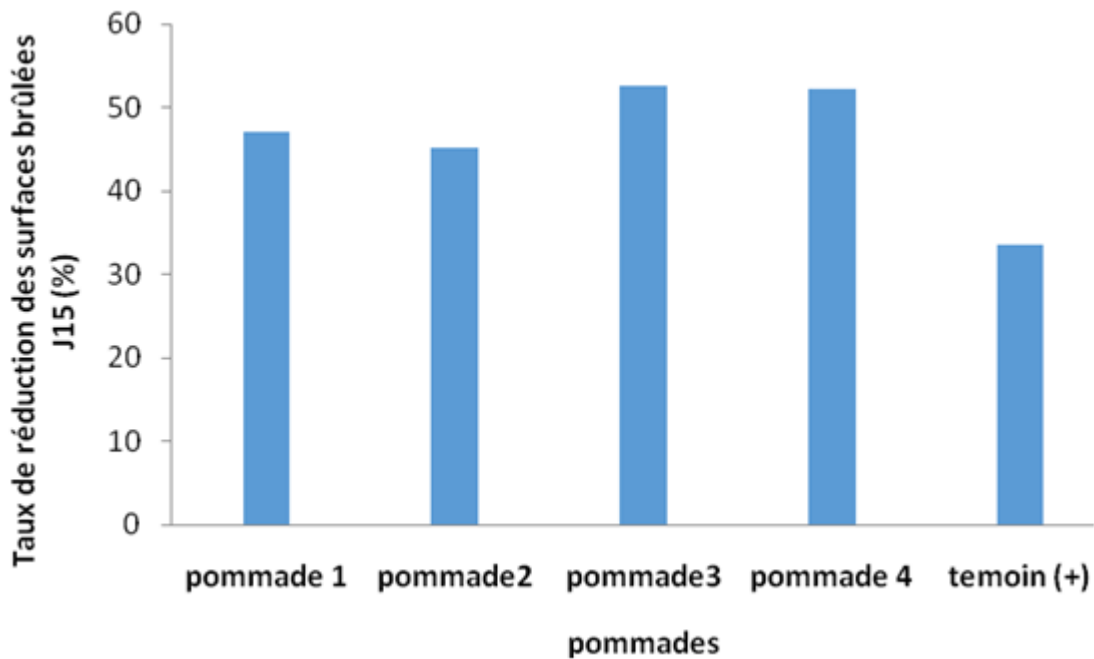


Figure III. 13 : Taux de réduction des surfaces brûlées après 15 jours de traitement avec les différentes pommades (témoin (+) = madécassol)

A travers les résultats obtenus, on constate une efficacité de toutes les pommades dans la réduction des plaies avec une différence non significative ($p > 0,05$) entre les surfaces des plaies traitées avec les pommades préparées et les surfaces des plaies traitées au Madécassol (témoin +).

Ces résultats sont très prometteurs puisque les pommades préparées à base de coproduits marins semblent être aussi efficaces que la crème commerciale "Madécassol". Il est à rappeler que les principes actifs comme le chitosane et les polysaccharides ont été incorporés à raison de 1%. Les autres constituants tels que le collagène, les polysaccharides, les polyphénols et l'extrait de *Codium* ont été introduits à des taux encore plus bas.

En outre, le début de cicatrisation a été observé très tôt pour les pommades à base de biomolécules marines comparativement à la crème commerciale. La deuxième phase de bourgeonnement et d'épidermisation est observée au cinquième jour de traitement avec les pommades 1 et 4, au septième jour d'application des pommades 2 et 3, et il faut attendre jusqu'au neuvième jour pour que la phase inflammatoire s'estompe et pour observer un début de réduction des plaies traitées au madécassol.

Dupasquier (2011), Khodja et al. (2013) et Haddab et Kortbi (2020) ont démontré le rôle biologique du chitosane dans la cicatrisation et la régénération *in vivo* du tissu cutané après une brûlure profonde (deuxième et troisième degré). Cette molécule a été bien tolérée par l'organisme et a permis la régénération de toutes les strates cutanées ainsi que celles du réseau vasculaire. Les auteurs ont relevé les propriétés antimicrobiennes du chitosane et son intérêt thérapeutique dans la fonctionnalité des néotissus.

Il semblerait que les pommades préparées dans la présente étude ont permis une meilleure cicatrisation et une réduction de la surface brûlée plus importante que l'application du chitosane préparé par **Haddab et Kortbi (2020)**. En effet, ces auteurs ont noté une diminution progressive des surfaces pour atteindre une moyenne de 3,8 cm² avec un pourcentage de réduction des brûlures de 28% au J₁₅.

En plus du chitosane, les pommades contiennent du collagène, dont le rôle dans la régénération de la peau et la stimulation des fibroblastes n'est plus à démontrer, et d'autres principes actifs, ce qui vraisemblablement a contribué à la réduction des plaies et la cicatrisation rapide.

En effet, le collagène a la particularité d'être humide mais de sécher lorsqu'il est appliqué sur les plaies. Il présente plusieurs avantages dont le caractère hypoallergène et une certaine stérilité. Néanmoins il ne convient aux plaies peu profondes et nécessite que celles-ci soient sèches et propres (**Janssens, 2022**).

Conclusion et Perspectives

L'objectif principal de cette étude est la valorisation biotechnologique des produits et coproduits marins en vue de préparation de pommades aux propriétés pharmacologiques ; cicatrisantes, anti-inflammatoires et antibactériennes.

Quatre émulsions, de type pommade (H/E), à base de coproduits marins (dont le chitosane extrait des carapaces de crevettes associé avec le collagène extrait de la peau de seiche, de raie et de sôle) ont été formulées. Cinq algues, *Padina pavonica*, *Sargassum muticum*, *Spirulina platensis*, *Jania rubens*, *Sphaerococcus sp*, ont été incorporées dans les différentes préparations sous forme d'eaux d'algues. D'autres ingrédients d'origine marine ont été exploités telles que les huiles de poissons, les polyphénols, les polysaccharides sulfatés ainsi que l'extrait méthanoïque de *Codium bursa*.

De l'ensemble des résultats obtenus, il en ressort :

- Les cendres, les polysaccharides et les protéines sont les fractions majoritaires constitutives de la carapace de crevettes.
- Le chitosane obtenu par voie chimique est de bonne qualité, avec un grand degré de désacétylation (98%) et une excellente solubilité dans l'acide acétique à 1%.
- Les rendements de l'extraction du chitosane et du collagène sont très satisfaisants.
- Les pigments d'algues marines rouges, bleues, brunes qui sont la phycoérythrine, la phycocyanine et la fucoxanthine absorbent les rayons lumineux aux alentours de 520, 650, 457 nm respectivement.
- La qualité physico-chimique et microbiologique des quatre pommades préparées est satisfaisante (pH neutre, très bonne stabilité, consistance satisfaisante) et conforme à la pharmacopée européenne.
- L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des pommades (1 et 3) a montré qu'elles possèdent un potentiel d'inhibition de l'œdème aussi efficace que celui du Diclofénac commercial.
- L'étude du pouvoir cicatrisant des pommades, sur des brûlures du 3^{ème} degré, indique également que leur efficacité est comparable à celle du Madécassol, avec une réduction des surfaces des plaies allant jusqu'à 52,53% après 15 jours de traitement.

- Les principes actifs incorporés dans les quatre pommades ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis plusieurs germes pathogènes dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus sp.*

À la lumière de ces premiers résultats, il apparaît clairement que les coproduits marins méritent une attention particulière car ils constituent une mine de biomolécules bioactives aux propriétés pharmacologiques multiples.

A l'avenir, il serait intéressant de :

- Poursuivre l'étude de l'activité cicatrisante au delà des 15 jours.
- Faire une étude histologique des plaies traitées avec les 04 pommades.
- Formuler des pommades à différentes concentrations de chitosane et des autres principes actifs et comparer leur efficacité.
- Evaluer l'activité antibactérienne des pommades élaborées.
- Améliorer la formulation galénique et proposer un gel pour favoriser l'absorption des principes actifs par la peau.
- Purifier les extraits des coproduits et des algues afin d'améliorer leur efficacité.
- Poursuivre la caractérisation des propriétés pharmacologiques du chitosane à savoir l'activité analgésique, antioxydant, antidiabétique et anti-hypertensive.
- Explorer les activités biologiques des autres constituants des coproduits de crevettes et de poissons tels que les protéines et les minéraux.

Références bibliographiques

- Ababsa (2012).** Etude d'activités biologiques des deux espèces : *Ammoides atlantica* et *Ranunculus bulbosus*. Thèse de Magister. Microbiologie et biochimie. Batna. Université de Batna 2.
- Abad M. J. (2013).** Anti-inflammatory properties of algae. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, ed : H. Domínguez: Woodhead Publishing. p.p. 338-368.
- Adnan S., Ranjha N. M., Hanif M et al. (2020).** O-Carboxymethylated chitosan; a promising tool with in-vivo anti-inflammatory and analgesic properties in albino rats. [en ligne] *Biological Macromolecules*, p.p. 531-536. [Consulté le 10/07/2022]. Disponible sur le web : [10.1016/j.ijbiomac.2020.04.038](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.038)
- Aiache J. M., Aiache S., Renoux R. (2004).** Initiation à la connaissance du médicament. France. Ed : MASSON. 4^{ème} édition.
- Aljawish A. (2013).** Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. these doctorat. Spécialité Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. France. Université de lorraine. p. 321
- Allouche J. (2003).** Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples Eau/Huile/Eau. Thèse de doctorat. France. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Ashley N. T., Weil Z. M., Nelson R. J. (2012).** Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, [en ligne] p.p. 385-406. [Consulté le: 03/08/2022]. Disponible sur le web: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>
- Aytekin A. O., Morimura S., Kida K. (2011).** Synthesis of chitosan–caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. Vol. 111, p.p. 212-216.
- Ben Dhieb F. (2014).** Développement et caractérisation de films biodégradables à base d'acide poly lactique et de chitosane. Maîtrise en génie chimique .Canada. Université de Laval

- Ben Slimane E., Sadok S. (2015).** extraction du collagène à partir des écailles de la carpe commune *Cyprinus carpio*. Bulletin Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de Salammbô. Tunisie. Vol. 42, (Numéro Spécial). p.p. 73-75
- Boizot N., Charpentier J. P. (2006).** extrait de la thèse d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Numéro spécial . p.p. 79-82.
- Bradford. (1976).** La méthode de Bradford pour le dosage de la teneur totale en protéines [en ligne]. Disponible sur : https://cellculture.altervista.org/the-bradford-method-to-quantify-cell-protein/?lang=fr&doing_wp_cron=1655325055.5128540992736816406250 (accessed 6.15.22).
- Bravo L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Revue de Nutrition Vol. 56, N°11, p.p. 317-333.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Ed : Lavoisier Tec et Doc. Médicales Internationales, p. 261, 308 ,571. 1234.
- Carter D. W. (2020).** Le manuel MSD version pour les professionnels de la santé. [en ligne].[consulté le 15/07/2022].disponible sur le web : <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/blessures-empoisonnement/brulures/brulures>
- Caullet L., Dos Santos A., Knipper G. (2018).** Les émulsions alimentaires et cosmétiques. Projet professionnel. France. Université de Lorraine.
- Chérif W., El Bour M., Daly Yahia-Kefi O. (2011).** Screening de l'activité antimicrofouling d'algues vertes récoltées sur la côte nord Tunisienne Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer Vol. 38, p.p. 131-138
- Claeyssen. (2009).** Zinc et brûlure. Thèse de doctorat. Pharmacie. Grenoble. Université de Grenoble..
- Cuvillon P., Viel E. (2002).** Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti-COX-2. Une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aiguë. Le Courrier de l'algologie Vol.1, p.p. 19-23.
- Das K., Tiwari R.K.S., Shrivastava D.K. (2010).** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research, Vol.4, N°2, p.p. 104-111.

David L., Montembault A., Vizio N., Crépet A. (2004). Ordering in hydrophobic biopolyelectrolyte chitosan solutions. 5th International Conference on Polymer-Solvent Complexes & Intercalates. 11-13 Juin. Lorient, France.

Djebbar M. (2019). Les émulsions (cours). Faculté de médecine Département de Pharmacie. Laboratoire de Pharmacie Galénique.

Djelad A. (2011). Préparation des matériaux composites chitosane –zeolithes. Application dans l'adsorption du cuivre. Thèse de doctorat. Oran. Université Ahmed Ben Bella

Du Y. J., Zhao Y.Q., Dai S.C., Yang B. (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 10, N° 1, p.p.103-107.

Dumay J., Morançais M. (2016). Chapter 9 - Proteins and Pigments. In *Seaweed in Health and Disease Prevention*, Colifornie. Ed : J. Fleurence and I. Levine. San Diego: Academic Press, p.p. 275-318.

Dupasquier F. (2011). Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré. [en ligne]. [Consulté le: 02/08/2022]. Disponible sur le web: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00830801/>

Dupasquier M.-L., Nazari A., Fontaine-Vive F., Fernandez X., Golebiowski J. (2018). formulation cosmétique, les émulsions. [en ligne]. [consulté le 20/05/2022]. Disponible sur le web : https://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/formulations.html

El Houda H. N. (2017). Evaluation de la qualité organoleptique, hygiénique et nutritionnelle du tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (L., 1758). Mémoire master. Aïn Defla. Université Khemis Milyana

Felt O. (1999). Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de Doctorat. Suisse .Université de Genève.

Fernandez-Kim S. O. (2004). Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols. Thèse. Etats unis, Université des états de Louisiana.

Fischer W., Schneider M., Bauchot M.L. (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire (Zone De Pêche 37), Révision 1, Volume 2.

Fisher L. J., Lessard J. R. (1987). Intake and digestibility of corn, rye and sorghum-sudan grass silages by lactating cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 67 (4): p.p. 1027-1032.

Gachie E. (2012). L'expansion cutanée : revue rétrospective sur 25 ans d'utilisation. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen

Garlock S. (2011). Contrôle de la qualité de lavage, désinfection et séchage des véhicules de transport des porcs vivants. Conseil canadien de la santé porcine. Canada

Guesmi K., Hennous M. D. (2021). Valorisation biotechnologique des coproduits de crustacés : étude du pouvoir antimicrobien du chitosane et traitement d'une eau contaminée par *Legionella pneumophila*. Mémoire d'ingénieur, Biotechnologie marine. Alger, ENSSMAL.

Haddab M., Kortbi R., (2020). Extraction de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir des coproduits de crustacés en vue d'une valorisation comme ingrédients fonctionnels dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Mémoire d'ingénieur, Biotechnologie marine. Alger, ENSSMAL.

Hafsa J., Smach M. A., et al . (2016). Antioxidant and antimicrobial proprieties of chitin and chitosan extracted from *Parapenaeus Longirostris* shrimp shell waste. *Ann. Pharm. Fr.* 74, p.p. 27-33.

Henzen C. (2003). Traitement aux glucocorticoïdes : risques et effets secondaires. In *Schweiz Med Forum*, Vol. 19, p.p. 6-442.

Hodja K., Mahlous M., et al. (2013). Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: pharmacological and toxicological tests. *Burns*, 39(1), [en ligne] p.p. 98-104. [Consulté le: 02/08/2022]. Disponible sur le web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417912001805>

Ifremer. (2011). Le collagène marin. [en ligne]. [consulté le 23/09/2022]. Disponible sur le web : <http://www.bibliomer.com/>

Janssens C. (2022). Le traitement des brûlures chez les mammifères par la peau de tilapia. These Médecin Vétérinaire. Belgique. Faculté de Médecine Vétérinaire de Liege. p.39.

Jaouen D. (1994). Chitine, Chitosane et Dérivés. Thèse de doctorat. Pharmacie, France. Université d'Angers.

Jick H. (1994). Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Lancet*, Vol.343, p.p. 769-772.

Jongjareonrak A., Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M. (2005 b). Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus marcracanthus*) skin. *J. Sci. Food Agricul.* Vol.85, p.p. 1203-1210.

Juang R. S., Shao H. J. (2002). Effect of pH on Competitive Adsorption of Cu (II), Ni (II), and Zn(II) from Water onto Chitosan Beads. *Adsorption* Vol.8, p.71.

Kefil S. (2020). Valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes: Etude du pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire du chitosane.

Kessel L., Tendal B., et al. (2014). Postcataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal antiinflammatory eye drops. *Ophthalmology*, Vol.121, N°10, p.p. 1915-1924.

Kim S.K., Rajapakse N., Shahidi F. (2008). Production of bioactive chitosan oligosaccharides and their potential use as nutraceuticals. New York. Ed : Marine nutraceuticals and functional foods. *Nutraceutical Science and Technology*, p.p. 183- 196.

Kittiphattanabawon P., Benjakul S., et al. (2005). Characterization of acid soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* Vol.89, p.p.363-372.

Kühnel, Wolfgang, Samama B. (2009). Atlas de poche d'histologie. Paris. Ed : Flammarion Médecine-Sciences.

Kurita K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. Ed : *Mar. Biotechnol.* Vol.8, p. 203. [en ligne] [consulté le 15/08/2022]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>.

Lablack M. (2012). Extraction et purification du collagène à partir de la peau et des écailles du tilapia du Nil adulte (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758). Mémoire de Magister. Biotechnologie. Oran. Université Ahmed Ben Bella

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* Vol.227, p.p. 680-685.

Lafourcade. (2015). Prise en charge de la brûlure cutanée thermique : parcours-type du centre de traitement des brûlés jusqu'à celui de rééducation prise en charge de la brûlure cutanée thermique : parcours-type du centre de traitement des brûlés jusqu'à celui de rééducation. Thèse de de docteur en pharmacie. France. Université de Bordeaux – UFR des Sciences Pharmaceutiques. p.122

Lahaye M. (1991). Marine algae as source of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fibre content insome sea-vegetables . Journal Sciences Food Agric. Vol.54, p.p. 94-587.

Lakhdar F. (2018). Contribution à l'étude des potentialités antiproliférative et antibactérienne des algues brunes et rouges de la côte d'El Jadida pour une valorisation médicale et environnementale. Thèse de doctorat en biologie des organismes.Nantes. France. École doctorale Sciences de la mer et du littoral (Plouzané).

Lassoued J., Ben Slimane E., Sadok S., Bejaoui N. (2022). Extraction du collagène à partir du byssus de la moule *Mytilus gallprovincialis*. Tunisie. Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de Salammbô

Le dictionnaire visuel Coupe de la peau [en ligne].[Consultaté le 25/08/2022]. Disponible sur le web : <https://infovisual.info/fr/corps-humain/peau>.

Lee S., Choi H., et al. (1999). Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. Plant Physiol., Vol.121, N°1, p.p.147-52.

Macheix J-J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). les composes phenoliques des vegetaux, un exemple de metabolites secondaires d'importance economique, presses polytechniques et universitaires romandes, p.vii. (eds.), Biology of plant litter decomposition, Volume T, Academic Press.

Manchado P.S., Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Edition T.EC&DOC. Lavoisier, p.p. 3- 20, 45-93, 363 -379.

Marieb, Elaine Nicpon, Katja Hoehn, Moussakova L., Lachaine R. (2010). Anatomie et physiologie humaines. Paris; [Saint-Laurent (Québec)]: Ed : Pearson ; ERPI.

Martin P. (1997). Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. Science, Vol.276, p.p. 75-81.

Martini, Marie-Claude. (2011). Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Éd. Médicales internationales. Cachan: Lavoisier.

Massiot G. (2012). Les médicaments de la mer : espoir ou illusion ?. p.p. 135-149

Mecheddou C., Barr K. (2018). Valorisation des carapaces des crevettes dans la dépollution des eaux : Extraction du chitosane et optimisation des procédés. Mémoire de fin d'études. Biochimie appliquée. Bouira. Université Akli Mohand Oulhadj

Méllissopoulos, Alexandre, Levacher C., Ladislas R., Ballotti R. (2012). La peau structure et physiologie. Paris. Éd. TEC & DOC. Lavoisier.

Mezdour H., Menad A. (2018). Potentiel antioxydant des algues des côtes de l'est Algérien. Thèse de doctorat. Constantine. Université des Frères Mentouri Constantine1.

Mishra A. K. (2018). Sargassum, Gracilaria and Ulva Exhibit Positive Antimicrobial Activity against Human Pathogens. OALib, 5, p.p. 1–11. [CrossRef]

Montagnat-Rentier C. (2014). Vieillissement de la peau et les produits cosmétiques anti-âge actuels en pharmacie : la réglementation, leur composition, leur efficacité et l'attente des clients. Thèse de doctorat. Pharmacie. Université Joseph Fourier faculté de pharmacie de Grenoble. p.158.

Nagai T., Izumi M., Ishii M. (2004). Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. , Vol .39 (3), p.p. 239–244.

Ngo D.N., Lee S.H., Kim M.M., Kim S.K. (2009). Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. Journal of Functional Foods. Vol.1, p.p.188-198

No H. K., Meyers S. P. (1999). Preparation and characterization of chitin and chitosan (A review). J Aquatic Food Product Technol. Vol.4, p.27.

Ortiz J., Romero N., et al. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. Food Chemistry Vol.99, p.p. 98–104.

Oulhiz A. (2018a). Évaluation, valorisation et utilisation des coproduits de la crevette (*Penaeus japonicus*) et du thon rouge (*Thunnus thynnus*) pour l'alimentation du loup de mer d'élevage (*Dicentrarchus labrax*). [en ligne], Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn

Badis. [Consulté le: 15/05/2022]. Disponible sur le web: <https://www.pnst.cerist.dz/detail.php?id=67930>

Oulhiz A. (2018b). Évaluation, valorisation et utilisation des coproduits de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) et du thon *Thunnus thynnus* (Linné, 1758) pour l'alimentation du tilapia rouge (*Oreochromis* sp). [en ligne]. [Consulté le: 05/05/2022]. Disponible sur le web: <https://www.pnst.cerist.dz/detail.php?id=67930>

Oummad A. (2013). Cicatrisation des plaies chez l'enfant. Thèse de doctorat. Médecine, Maroc. Université mohammed V souissi, p.219.

Özogul F., Hamed I., Özogul Y., Regensteinc J. M. (2018). Crustacean By-products 7. Journal : Marine Drugs Vol. 20, Issue 3

Pangestuti R., Bak S. S., Kim S. K. (2011). Attenuation of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglia by chitooligosaccharides via the MAPK signaling pathway. Vol. 49, p.p. 599-606.

Peh K. S.H., Sodhi N.S., et al. (2006). Conservation value of degraded habitats for forest birds in southern Peninsular Malaysia., Diversity and Distributions, Vol.12 : p.p. 572-581.

Person J. (2010). Livre turquoise Algues, filière du futur. Romainville. Ed : Adebiotech

Peter M.G. (2002). Chitin and chitosan from animal sources. Mémoire. Allemagne. Université de Potsdam , p. 481.

Portier. (2016). Biomateriaux collagène / gélatine : des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides. France. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. Ed : Hal. p. 61

Prabu K., Natarajan E. (2012). In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Chitosan Isolated from *Podophthalmus Vigil*. J App Pharm Sci. Vol.2, N°9, p.p. 75-82.

Qiao Y., Bai X. F., Du Y. G. (2011). Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. [en ligne]. International immunopharmacology, 11 : p.p. 121-127 [Consulté le 25/08/2022]. Disponible sur le web : [10.1016/j.intimp.2010.10.016](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.10.016).

Randriamahatody Z. (2011a). Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : utilisation de la proteolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar. Thèse de doctorat. Biochimie. Madagascar. Université d'Antananarivo. p. 236.

- Randriamahatody Z. (2011b).** Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : utilisation de la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar Thèse de doctorat. Biochimie. Madagascar. Université d'Antananarivo.
- Rasmussen R.S.M., Morrissey T. (2008).** Chitin and chitosan. In: C.S. Barrow, F, New York. Ed : Marine nutraceuticals and functional foods. Nutraceutical Science and Technology p.p. 155- 182
- Ravoninjatovo M., Randriamahatody Z., et al. (2015).** Valorisation des coproduits de crevette (*Penaeus spp.*) par hydrolyse enzymatique. Rev. D'élevage Médecine Vét. Pays Trop. Vol.67, p.137.
- Ricard-Blum S., Ruggiero F. (2005).** The collagen superfamily : from the extracellular matrix to the cell membrane. Pathologie Biologie. Vol.53 N°7, p.p.430-442.
- Rinaudo M., Milas M., Dung P. L. (1993).** Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. Elsevier. Journal international des macromolécules biologiques. Vol. 15, p.p. 281-285.
- Risser A., Donovan D., Heintzman J. (2009).** NSAID prescribing precautions. American family physician, Vol. 80 N°12, p.p. 1371-1378.
- Rochet J., Wassermann D., et al. (1998).** Rééducation et réadaptation de l'adulte brûlé. Encyclopédie médico-chirurgicale. p.27.
- Rosen Milton J., Kunjappu Joy T. (2012).** Surfactants and Interfacial Phenomena. New Jersey. Ed : John Wiley & Sons. 4^{ème} édition.
- Sahoré A. D., Abouattier J. L. (2016).** Quelques méthodes d'analyse biochimique de produits alimentaires. France. Ed : Connaissances et savoirs.
- Salunkhe D.K. (1990).** Dietary, tannins: Conséquences and remedies. Boca Raton, Floride. CRC Press. Cité par : Peronny Sylvie,
- Senet P., Raynaud-Simon A. (2007).** Cicatrisation. Traité de nutrition artificielle de l'adulte, p.p. 473-480.
- Seng J.M. (1988).** Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie, Biofutur. p.p. 40-44

Singer A. J., Clark R. A. (1999). Cutaneous wound healing, New England. The New England Journal of Medicine. p.p. 738-46.

Sionkowska A., Kozłowska J., Skorupska M., Michalska M. (2015). Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*, International Journal of Biological Macromolecules, [en ligne] [consulté le 15/08/2022]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.032>

Stevens, Alan, Lowe J. S. (2006). Histologie humaine. Paris: Ed : Elsevier Masson 3^{ème} édition.

Stig Friberg, Kare Larsson, Johan Sjoblom. (2003). Food Emulsions. 4^{ème} édition.

Strodtbeck F. (2001). Physiology of wound healing. Newborn and infant nursing reviews, vol. 1, p.p. 43–52.

Taouint A. N. (2016). Préparation de chitosane à partir de la biomasse marine. Application au conditionnement des boues urbaines .Thèse de Magister. Tizi ousou, Université UMMTO

Thompson J., Collins M., Mercer W. (1996). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450 - Thompson - 1996 – Journal of Applied Bacteriology - Wiley Online Library [en ligne]. [disponible sur le web] : URL <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03229.x> (accessed 6.21.22).

Truong T. O., Hausler R., Monette F., Niquette P. (2007). Valorisation des résidus industriels de pêches. Revue des sciences de l'eau. Journal of Water Science – Érudit [en ligne]. [disponible sur] <https://www.erudit.org/en/journals/rseau/1900-v1-n1-rseau1812/016170ar/abstract/> (accessed 6.27.22).

Turon F., Villeneuve P., Pina M. (2004). Amélioration de la qualité nutritionnelle des huiles de poissons. OCL. Oléagineux Corps gras Lipides. Vol.11, N°2, p.p. 146-149. [en ligne]. [Consulté le 25/08/2022]. disponible sur le web : <https://doi.org/10.1051/ocl.2004.0146>

Uriarte-Montoya M.H., Arias-Moscoso J.L., et al. (2010). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms. Vol.101, N°11, p.p. 4212-4219.

Vo T. S., Kim J. A., Ngo D. H., Kong C. S., Kim S. K. (2012). Protective effect of chitosan oligosaccharides against FcRI-mediated RBL-2H3 mast cell activation. *Process Biochemistry*. Vol. 47, p.p. 327-330.

Waldeck K., Desbrieres J., Trystram G. (2006). Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé.

Wang S.L., Lin H.T., Liang T.W., Chen Y.Z., Yen Y.H., Guo P. (2008). Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource Technology*, Vol.99, p.p. 4386-4393.

Wassermann, D. (2002). Critères de gravité des brûlures. *Épidémiologie, prévention, organisation de la prise en charge*. *Pathologie Biologie* Vol.50, p.p. 65-73.

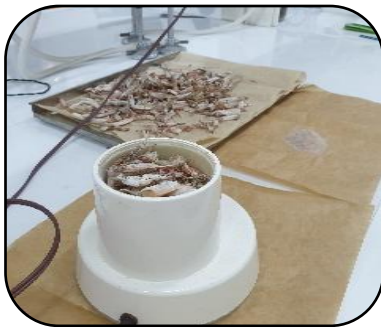
Wilmotte D. A. (2008). Les cyanobactéries : comment exploiter au mieux la lumière ?
Communication scientifique. Belgique. Université de Liège

Witte M. B., Barbul A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America* Vol.77, p.p. 509-528.

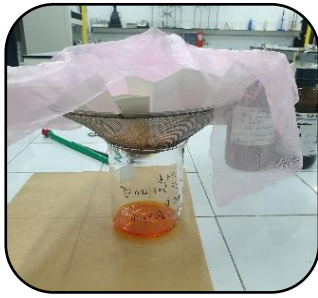
Annexes



Annexe 1 : Prétraitement des peaux



Annexe 2 : Broyage et tamisage des carapaces de crevettes



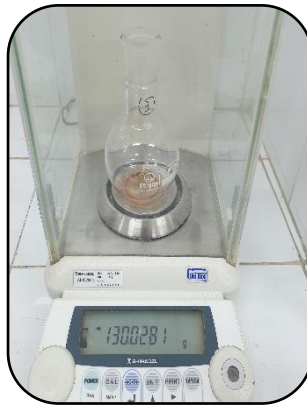
1- Rinçage apres dépigmentation



2- déminéralisation



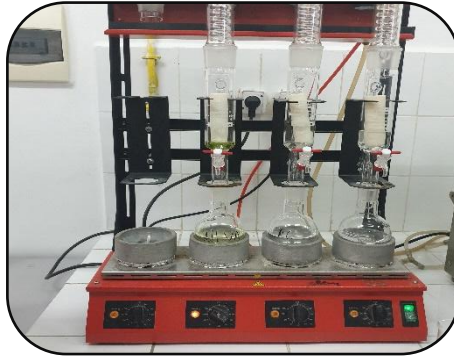
3- rinçage et filtrage apres déproteinisation



Annexe 3 : Pesée des trois ballons contenant l'échantillon après leur passage par le rota vapeur



Annexe 4 : Pesée des principes actifs des pommades



Annexe 5 : Extracteur de Soxhlet



Annexe 6 : Incinération des échantillons dans le four à moufle

Annexe 7 : II – Composition des solutions de réactifs utilisées au cours de l'électrophorèse

1 – Composition des gels

Gel de migration – Composition pour 2 gels ($V_{\text{totale}} = 20 \text{ ml}$).

- H₂O 8,1 ml
- Tris HCl 1,5 M (pH = 8,8) 5 ml
- Acrylamide / Bis 30% 6,6 ml
- SDS 10% 200 μl
- Persulfate d'ammonium 10% 100 μl
- Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) 10 μl

Gel de migration – Composition pour 2 gels ($V_{\text{totale}} = 10 \text{ ml}$).

- H₂O 5,7 ml
- Tris HCl 0,5 M (pH = 6,8) 2,5 ml
- Acrylamide / Bis 30% 1,7 ml
- SDS 10% 100 μl
- Persulfate d'ammonium 10% 50 μl

- Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) 10 µl. Le TEMED étant le catalyseur, il doit être ajouté juste avant de couler les gels.

2 – Tris-HCl 1,5 mM (pH = 8,8)

Pour 100 mL de solution, solubiliser 18,171 g de Tris Amino dans 70 mL d'eau déionisée. Mesurer le pH et l'ajuster à 8,8 à l'aide de solutions concentrées d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Compléter avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 ml.

3 – Tris-HCl 0,5 mL (pH = 6,8)

Pour 100 mL de solution, solubiliser 6,057 g de Tris Amino dans 70 ml d'eau déionisée. Mesurer le pH et l'ajuster à 6,8 à l'aide de solutions concentrées d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Compléter avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 ml.

4 – SDS 10%

Solubiliser, dans un bain marie à 45°C, 10 g de SDS dans 50 mL d'eau déionisée. Compléter ensuite avec de l'eau déionisée jusqu'à 100 ml.

5 – Acrylamide/Bisacrylamide 30% : Solution prête à l'emploi et conservée à 4°C (Sigma-Aldrich).

6 – Tampon échantillon (tampon Laemmli)

- Tris-HCl 0,5mM (pH = 6,8) : 1,25 ml
- Mercapto Ethanol : 0,45 ml
- SDS 10% : 2 ml
- Bleu de Bromophénol 0,05% (p/v) : 2,5 mg
- Glycérol : 1 ml
- EDTA : 3,72 mg
- H₂O déionisée : compléter jusqu'à 5 ml

Résumé :

Quatre pommades aux propriétés cicatrisantes, anti-inflammatoires et antibactériennes sont élaborées à partir des coproduits marins. Ces coproduits ont servi à l'extraction de biomolécules à haute valeur ajoutée dont le chitosane qui est extrait à partir des carapaces de crustacés et le collagène qui est obtenu à partir des peaux de poissons (raie, seiche et sole). D'autres ressources marines sont incorporées telles que l'huile de foie de morue, les poudres et les eaux de quatre types d'algues : bleues, rouges, vertes et brunes ainsi que leurs pigments (phycocyanine, phycoérythrine, chlorophylle, fucoxanthine, xanthophylle et β carotène). Une caractérisation biochimique des biomolécules extraites des algues et des coproduits marins a été entreprise, suivie du contrôle de la qualité des produits finis. Le chitosane est parfaitement soluble dans une solution d'acide acétique à 1% avec un degré de désacétylation de 98% et un rendement massique de 11,88 %. Il a présenté une activité antibactérienne contre toutes les souches testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus sp*) avec les plus grands diamètres des zones d'inhibition. Le collagène est mis en évidence par le test du biuret et xanthoprotéique ainsi qu'une électrophorèse SDS-PAGE ; Son rendement d'extraction est de 21%, c'est une protéine composée de trois chaînes peptidiques α_1 , α_2 et β et dont le poids moléculaire est respectivement 120 et 110 et 225 kDa. L'analyse spectrale des pigments des algues rouges, bleues, et brunes a montré qu'ils absorbent les rayons lumineux aux alentours de 520, 650, 457 nm respectivement. L'aspect macroscopique et microscopique des pommades est satisfaisant, elles sont également stables, leurs distributions est homogène et leur pH est neutre. L'évaluation de la qualité microbiologique des quatre émulsions a montré qu'elles sont conformes à la pharmacopée européenne. En outre, ces pommades ont une activité cicatrisante vraisemblable à celle du Madecassol et deux d'entre elles ont une activité anti-inflammatoire aussi efficace que le Diclofenac à 1%. À la lumière des résultats obtenus, la valorisation biotechnologique des coproduits marins méritent une attention particulière et notamment dans le domaine pharmaceutique.

Mots clés : pommades, chitosane, collagène, pigments, eau d'algue, coproduits de crevettes, peaux de poissons, qualité microbiologique, tests anti-inflammatoire, activité cicatrisantes, valorisation biotechnologique.

Abstract

Four ointments, with healing, anti-inflammatory and antibacterial properties, are made from marine co-products. These co-products were used to extract high value-added biomolecules, including chitosan which is extracted from the shells of crustaceans and collagen which is obtained from the skins of fish (ray, cuttlefish and sole). Other marine resources are incorporated such as cod liver oil, powders and waters of four types of algae: blue, red, green and brown as well as their pigments (phycocyanin, phycoerythrin, chlorophyll, fucoxanthin, xanthophyll and β carotene). A biochemical characterization of biomolecules extracted from algae and marine co-products was undertaken, followed by quality control of the finished products. Chitosan is perfectly soluble in a 1% acetic acid solution with a degree of deacetylation of 98% and a mass yield of 11.88%. It exhibited antibacterial activity against all strains tested (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus sp*) with the largest diameters of the inhibition zones. Collagen is highlighted by the biuret and xanthoproteic test as well as SDS-PAGE electrophoresis; Its extraction yield is 21%, it is a protein composed of

three peptide chains $\alpha 1$, $\alpha 2$ and β and whose molecular weight is respectively 120 and 110 and 225 kDa. Spectral analysis of red, blue, and brown algae pigments showed that they absorb light rays around 520, 650, 457 nm respectively. The macroscopic and microscopic appearance of the ointments is satisfactory, they are also stable, their distribution is homogeneous and their pH is neutral. The evaluation of the microbiological quality of the four emulsions showed that they comply with the European Pharmacopoeia. In addition, these ointments have a healing activity likely to that of Madecassol and two of them have an anti-inflammatory activity as effective as Diclofenac 1%. In the light of the results obtained, the biotechnological valorization of marine co-products deserves particular attention, particularly in the pharmaceutical field.

Keywords: ointments, chitosan, collagen, pigments, seaweed water, shrimp co-products, fish skins, microbiological quality, anti-inflammatory tests, healing activity, biotechnological valorization.

ملخص

أربعة مراهم بخصائص علاجية ومضادة للالتهابات ومضادة للبكتيريا مصنوعة من المنتجات الثانوية البحرية. تم استخدام هذه المنتجات الثانوية لاستخراج الجزيئات الحيوية ذات القيمة المضافة العالية بما في ذلك الشيتوزان ، والذي يتم استخراجه من قشريات القشريات والكولاجين الذي يتم الحصول عليه من جلود الأسماك (شعاع ، حبار ونعل). يتم دمج الموارد البحرية الأخرى مثل زيت كبد سمك القد ومساحيق ومياه أربعة أنواع من الطحالب: الأزرق والأحمر والأخضر والبني بالإضافة إلى أصباغها (فيكوسيانين ، فيكويريثرين ، كلوروفيل ، فوكوكسانثين ، زانثوفيل و β كاروتين). تم إجراء توصيف كيميائي حيوي للجزيئات الحيوية المستخرجة من الطحالب والمنتجات الثانوية البحرية ، متبوعاً بمراقبة جودة المنتجات النهائية. الشيتوزان قابل للذوبان تمامًا في محلول حمض أسيتيك 1٪ بدرجة إزالة الأسيتيل 98٪ وعائد كتلة 11.88٪. أظهر نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد جميع السلالات المختبرية (*Enterococcus sp* و *Escherichia coli*. *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*) بأكبر أقطار من مناطق التثبيط. يتم تسليط الضوء على الكولاجين من خلال اختبار *biuret* و *xanthoproteic* وكذلك الرحلان الكهربائي *SDS-PAGE* ؛ عائد استخلاصه هو 21٪ ، وهو بروتين يتكون من ثلاث سلاسل ببتيدية $\alpha 1$ و $\alpha 2$ ووزنه الجزيئي 120 و 110 و 225 كيلو دالتون على التوالي. أظهر التحليل الطيفي لأصباغ الطحالب الحمراء والزرقاء والبنية أنها تمتص أشعة الضوء بحوالي 520 ، 650 ، 457 نانومتر على التوالي. المظهر المجهرى والميكروسكوبي للمراهم مرضٍ ، كما أنها مستقرة ، وتوزعها متجانس ودرجة الحموضة فيها متعادلة. أظهر تقييم الجودة الميكروبيولوجية للمستحلبات الأربعة أنها تتوافق مع دستور الأدوية الأوروبي. بالإضافة إلى ذلك ، فإن هذه المراهم لها نشاط علاجي يحتمل أن يكون من نوع *Madecassol* واثنان منهم لهما نشاط مضاد للالتهابات فعال مثل *Diclofenac 1*٪. في ضوء النتائج التي تم الحصول عليها ، فإن تثمين المنتجات البحرية الثانوية بالتكنولوجيا الحيوية يستحق اهتمامًا خاصًا ، لا سيما في المجال الصيدلاني.

الكلمات المفتاحية : مستحضرات طبية بحرية، شيتوزان، كولاجين، أصباغ، مياه طحالب، البوليفينول ، متعدد السكريات، مستخلص الكوديوم ، قشور الجمبريات، جلود الأسماك، الجودة الميكروبيولوجية ،النشاط المضاد للميكروبات ، النشاط المضاد للالتهابات، نشاط التنام الجروح ، تثمين التكنولوجيا الحيوية.