

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 وتهيئة 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 d'Etat en Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral

**Spécialité : Biotechnologie Marine**

**Thème**

## **Préparation de bio-adhésif (Hydrogel) à base de biomolécules marines au pouvoir cicatrisant**

Présenté par :

- AMZAL Akli Rayene
- LIBDIRI Mustapha Ahcene

**Soutenu le 20/07/2023 devant le jury composé de :**

Mme. LADOUL S.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Président
M. CHADER H.	Professeur (Faculté de pharmacie d'Alger 1)	Promoteur
Mme. AMROUCHE L.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Co-promotrice
M. KASSAR A.	Maître assistant A (ENSSMAL)	Examinateur
Mme. MAOUEL DJ.	Maître assistante B (ENSSMAL)	Représentant de l'Incubateur bleu
M. MIHOUBI B.	Maître formateur ANADE	Représentants du partenaire économique
M. GHUERBI M.	MPPH .AC	

**Année universitaire : 2022 - 2023**

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 للعلوم البحر وتهيئة 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 de Master

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Hydrobiologie Marine et Continentale

**Spécialité :** Biotechnologie Marine

**Thème**

## **Préparation de bio-adhésif (Hydrogel) à base de biomolécules marines au pouvoir cicatrisant**

Présenté par :

- AMZAL Akli Rayene
- LIBDIRI Mustapha Ahcene

**Soutenu le 20/07/2023 devant le jury composé de :**

Mme. LADOUL S.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Président
M. CHADER H.	Professeur (Faculté de pharmacie d'Alger 1)	Promoteur
Mme. AMROUCHE L.	Maître assistante A (ENSSMAL)	Co-promotrice
M. KASSAR A.	Maître assistant A (ENSSMAL)	Examineur
Mme. MAOUEL DJ.	Maître assistante B (ENSSMAL)	Représentant de l'Incubateur bleu
M. MIHOUBI B.	Maitre formateur ANADE	Représentants du partenaire économique
M. GHUERBI M.	MPPH .AC	

**Année universitaire : 2022 - 2023**

# Remerciements

En tête de ces remerciements, On remercie Notre Dieu le tout puissant qui nous a bénis qui nous a donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer notre mémoire.

On remercie nos familles et surtout nos parents pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Nous tenons aussi 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. Tout comme nous adressons nos sincères remerciements à : Mme Ladoul S. pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury et M. Kassar A, Mme Maouel , M. Mihoubi B., M.GHUERBI M. pour avoir bien voulu examiner et juger ce modeste travail.

Nous tenons également à remercier chaleureusement Mme BEN ABOU Amina, Mme AMMI Nassima, ainsi que l'animalier et les résidentes, en particulier Zineb et Soraya, pour leur soutien constant.

Nos sincère remerciements et reconnaissances à Mr MEZOUAR Khodir notre directeur des études à l'ENSSMAL pour tout aides et encouragements à Mme GUERROUMI Houda ingénieure de laboratoire LBCM 2, à M. MATOUK Youcef, M. MEGARTSI Yacine ingénieur de laboratoire LBCM 3, 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.

Nous souhaitons aussi exprimer nos profondes gratitudes envers Mme FELLAH Houda et MAOUEL Djamilia pour leur assistance précieuse et ses conseils avisés lors de notre formation (Start-up/Brevet) dans l'incubateur de l'école.

Nos remerciements s'étendent également à l'ensemble du personnel de l'Agence nationale des produits pharmaceutiques pour leur collaboration précieuse.

Nous aimerions également exprimer notre reconnaissance envers M. BILT Ali de la pêche de l'Algérie pour son aide précieuse lors de la collecte des échantillons de carapaces de crevettes et de peaux de poissons.

Enfin, nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail. Votre soutien et votre implication ont été inestimables, et nous vous sommes profondément reconnaissants.



# Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, à mon unique frère Sidali, à mon très chère grand père HAMICHE Ali pour sa grande confiance en moi et son encouragement infini qui m'a vraiment donnée un grand pousse en avant, à mes chères grandes mères, ainsi qu'à toute ma grande famille LIBDIRI et HAMICHE, à mon amie IGROUFA Hana pour son soutien et son encouragement tout au long de la réalisation de ce travail, à mes amis notamment mon binôme AMZAL Rayene, Alla-Eddine, Aimen, Ilyas, Brahim et Oussama avec qui j'ai vécu des meilleur moments et a tous mes autres amis. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible, Merci d'être toujours là pour moi

Libdiri Mustapha Ahcene

# Dédicace

Je dédie ce mémoire à mes chers parents, source de vie, d'amour et d'affection, qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études. En signe de reconnaissance, qu'ils trouvent ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études.

A mes chers frères Nadjib et Nassim, source de joie et de bonheur.

A toute ma famille, source d'espoir et de motivation, leur confiance en moi a été une source de motivation pour atteindre mes objectifs et réussir cette étape importante de ma vie.

Et à tous mes amis, tout particulièrement Mustapha, cher ami avant d'être binôme, Hayem, Oussama, Mouhammed, Alla Eddine et Aimen, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant mon cursus universitaire, et à qui je souhaite plus de succès.

Je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite

AMZAL Akli Rayene

# Table des matières

Liste des figures .....	V
Liste des tableaux .....	VII
Liste des abréviations .....	VIII
Introduction générale.....	1
Chapitre I. Etude bibliographique .....	3
<b>Partie 1 : Physiologie de la peau et de la cicatrisation.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1. Définition .....</b>	<b>4</b>
<b>I.2. Histologie .....</b>	<b>4</b>
I.2.1. L'épiderme.....	4
I.2.1.1. Les différentes couches de kératinocytes .....	5
I.2.1.2. Les mélanocytes.....	6
I.2.1.3. Les cellules de Langerhans .....	6
I.2.1.4. Les cellules de Merkel .....	6
I.2.2. Le derme.....	7
I.2.2.1. Structure .....	7
I.2.2.2. Composition .....	7
I.2.3. L'hypoderme.....	8
I.2.3.1. Localisation.....	9
I.2.3.2. Composition .....	9
I.2.3.3. Fonctions.....	9
<b>I.3. Les altérations de la peau .....</b>	<b>10</b>
I.3.1. Les brûlures .....	10
I.3.1.1. Définition .....	10
I.3.1.2. Étiologie des brûlures.....	10
I.3.1.3. Physiopathologie des brûlures.....	10
<b>I.4. La cicatrisation normale : mécanismes.....</b>	<b>11</b>
I.4.1. Phase initiale .....	11
I.4.1.1. Etape vasculaire .....	11
I.4.1.2. Etape inflammatoire et détersion .....	12
I.4.2. Phase de réparation tissulaire .....	12
I.4.2.1. Bourgeonnement .....	12
I.4.2.2. Epithélialisation .....	12
I.4.3. Phase de remodelage .....	13
<b>Partie 2 : Biomolécules marines et valorisation biotechnologique.....</b>	<b>14</b>
<b>I.5. Introduction .....</b>	<b>14</b>

<b>I.6. Le chitosane .....</b>	<b>14</b>
I.6.1. Structure et origine .....	14
I.6.2. Propriétés physico-chimiques.....	15
I.6.2.1. Le degré d'acétylation.....	15
I.6.2.2. La viscosité .....	15
I.6.2.3. La masse molaire .....	16
I.6.2.4. Solubilité .....	16
I.6.3. Les propriétés biologiques.....	16
I.6.3.1. La toxicité .....	16
I.6.3.2. La biocompatibilité .....	16
I.6.3.3. La biodégradabilité .....	17
I.6.3.4. La bio-activité du chitosane .....	17
<b>I.7. Le collagène.....</b>	<b>18</b>
I.7.1. Définition et structure.....	18
I.7.2. Types de collagène .....	19
I.7.3. Caractéristiques physico-chimiques (PARIENTE et <i>al.</i> , 2005).....	19
I.7.4. Propriétés pharmacologiques (PARIENTE et <i>al.</i> , 2005).....	20
I.7.5. Propriétés biologiques du collagène .....	20
<b>I.8. Les minéraux.....</b>	<b>21</b>
<b>I.9. Les hydrogels de chitosane-collagène.....</b>	<b>21</b>
I.9.1. Définition d'un hydrogel .....	21
I.9.2. Propriétés mécaniques .....	23
I.9.3. Propriétés de diffusion.....	23
I.9.4. Les formes des hydrogels .....	23
I.9.4.1. Les hydrogels injectables .....	23
I.9.4.2. Les patches hydrogel .....	24
I.9.5. Les hydrogels de chitosane-collagène .....	24
Chapitre II. Matériel et méthodes .....	26
<b>II.1. Matériel .....</b>	<b>27</b>
II.1.1. Matériel biologique : .....	27
II.1.2. Matériel non biologique .....	27
<b>II.2. Echantillonnage .....</b>	<b>28</b>
<b>II.3. Production et caractérisation du chitosane.....</b>	<b>28</b>
II.3.1. Identification des espèces de crevettes collectées .....	28
II.3.2. Prétraitement des carapaces de crevettes .....	29
II.3.3. Détermination de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes .....	29
II.3.3.1. Détermination de la teneur en eau .....	29

II.3.3.2. Détermination de la teneur totales en matière minérale.....	29
II.3.3.3. Détermination de la teneur en protéines .....	30
II.3.3.4. Détermination de la teneur en lipides totaux .....	31
II.3.4. Extraction de la chitine et du chitosane.....	32
II.3.5. Caractérisation du chitosane produit.....	33
II.3.5.1. Le rendement massique .....	33
II.3.5.2. Test de solubilité .....	33
II.3.5.3. Calcul du degré de déminéralisation.....	33
II.3.5.4. Calcul du degré de déprotéinisation.....	33
II.3.5.5. Détermination de la viscosité.....	34
II.3.5.6. Calcule du degré de désacétylation.....	34
<b>II.4. Préparation et caractérisation des poudres des bivalves et de seiches.....</b>	<b>35</b>
II.4.1. Prétraitement.....	35
II.4.2. Caractérisation des poudres des coquilles des bivalves et de seiches .....	36
II.4.2.1. La teneur en matière minérale .....	36
II.4.2.2. La teneur en carbonate de calcium .....	37
<b>II.5. Extraction du collagène.....</b>	<b>38</b>
II.5.1. Traitement des peaux .....	38
II.5.2. Méthode d'extraction du collagène marin.....	39
II.5.3. Caractérisation du collagène produit.....	40
II.5.3.1. Test de biuret.....	40
II.5.3.2. Test à la xanthoprotéine .....	41
II.5.3.3. Rendement massique du collagène marin.....	41
II.5.3.4. Détermination du poids moléculaire du collagène marin par SDS PAGE.....	42
<b>II.6. Préparation des patchs et du gel .....</b>	<b>44</b>
II.6.1. Préparation des patchs.....	44
II.6.2. Préparation du gel .....	45
II.6.3. Détermination des propriétés pharmacologiques des patchs et du gel préparés .....	46
II.6.3.1. Test de l'activité cicatrisante in vivo.....	46
Chapitre III. Résultats et discussion.....	55
<b>III.1. Production et caractérisation du chitosane produit.....</b>	<b>56</b>
III.1.1. Identification des espèces de crevettes .....	56
III.1.2. Composition biochimique globale des coproduits de crevettes .....	56
III.1.2.1. Taux d'humidité (teneur en eau).....	57
III.1.2.2. Teneur en matières minérale.....	57
III.1.2.3. Teneur totale en lipides.....	57
III.1.2.4. Teneur en protéine .....	57

III.1.3. Caractérisation du chitosane produit.....	58
III.1.3.1. Rendement massique .....	58
III.1.3.2. Solubilité .....	59
III.1.3.3. La teneur en matière minérale .....	60
III.1.3.4. La teneur en Protéines .....	60
III.1.3.5. Le degré de déminéralisation et de déprotéinisations.....	60
III.1.3.6. Degré de déacétylation du chitosane extrait.....	60
III.1.3.7. La Viscosité .....	63
<b>III.2. Caractérisation des poudres de bivalves et de seiches .....</b>	<b>63</b>
III.2.1. La teneur en matière minérale .....	63
III.2.2. La teneur en carbonate de calcium .....	64
<b>III.3. Caractérisation du collagène extrait .....</b>	<b>65</b>
III.3.1. Test du Biuret.....	65
III.3.2. Test à la xanthoprotéine .....	65
III.3.3. Rendement massique .....	66
III.3.4. Le poids moléculaire (SDS-PAGE) .....	66
<b>III.4. Caractérisation des patchs et gels produits .....</b>	<b>67</b>
III.4.1. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des patchs et du gel préparés .....	67
III.4.2. Activité cicatrisante de l'hydrogel (patchs et gel).....	68
III.4.2.1. Description macroscopique de la cicatrisation .....	68
III.4.3. Résultats des coupes histologiques .....	72
Références bibliographiques .....	76
Annexes.....	i
Annex A Images des manipulations.....	i
Annex B Business Model Canvas (BMC).....	vi
<b>B.1 Introduction .....</b>	<b>vi</b>
<b>B.2 Propositions de la valeur. ....</b>	<b>vi</b>
<b>B.3 Segment de clientèle. ....</b>	<b>vii</b>
<b>B.4 Canaux de distribution.....</b>	<b>vii</b>
<b>B.5 Relation Client .....</b>	<b>viii</b>
<b>B.6 Activités Clés.....</b>	<b>viii</b>
<b>B.7 Ressources clés .....</b>	<b>ix</b>
<b>B.8 Partenaires clés .....</b>	<b>ix</b>
<b>B.9 Structure de coûts .....</b>	<b>x</b>
<b>B.10 Sources de revenus .....</b>	<b>xii</b>
<b>B.11 Le business model canvas (BMC).....</b>	<b>xii</b>
<b>B.12 Conclusion .....</b>	<b>xiii</b>

# Liste des figures

Figure I-1 Coupe de la peau ( <a href="https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-peau-7189/">https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-peau-7189/</a> ). ...	4
Figure I-2 : Représentation schématique d’une coupe transversale de l’épiderme humain ( <a href="https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10">https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10</a> ).....	6
Figure I-3 Coupe histologique de la peau faisant apparaître le derme papillaire et réticulaire ( <a href="https://www.researchgate.net/figure/Coupe-histologique-de-la-peau-faisant-apparaître-le-derme-papillaire-et-reticulaire_fig13_38958630">https://www.researchgate.net/figure/Coupe-histologique-de-la-peau-faisant-apparaître-le-derme-papillaire-et-reticulaire_fig13_38958630</a> ). ....	7
Figure I-4 Anatomie d’une peau normale et une peau brûlée (différents degrés de brûlures) ( <a href="https://www.docteurlic.com/guide-montagne/brulure-en-montagne.aspx">https://www.docteurlic.com/guide-montagne/brulure-en-montagne.aspx</a> ). ....	11
Figure I-5 Principales phases de cicatrisation ( <a href="https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/dermatologie/cicatrisation/">https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/dermatologie/cicatrisation/</a> ).....	13
Figure I-6 Structure chimique du chitosane ( <a href="https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan_fig4_355787682">https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan_fig4_355787682</a> ).....	15
Figure I-7 Structure du collagène. ( <a href="https://www.pensersante.fr/collagene-fibre-structurante-corps-humain">https://www.pensersante.fr/collagene-fibre-structurante-corps-humain</a> ) .....	18
Figure I-8 Collagène de poissons (marin). ( <a href="https://www.dieti-natura.com/plantes-actifs/collagene-marin.html">https://www.dieti-natura.com/plantes-actifs/collagene-marin.html</a> ).....	19
Figure I-9 Classification des principaux types d'hydrogel (liste non exhaustive). (SUN et <i>al.</i> , 2015) [Photo de notre hydrogel physique à base de chitosane-collagène (préparé au laboratoire de l’ENSSMAL)] ..... 22	22
Figure II-1 Schéma général d’extraction du chitosane.....	32
Figure II-2 Les cendres des poudres de bivalves et de seiches après incinération dans four à moufle .....	36
Figure II-3 Calcimètre de Bernard .....	37
Figure II-4 Peaux de poissons découpées avec des ciseaux .....	38
Figure II-5 Peaux de poissons Broyée avec un mixeur .....	39
Figure II-6 Diagramme général d’extraction du collagène .....	40
Figure II-7 Diagramme général de production des patches-hydrogels .....	45
Figure II-8 Diagramme général de production du gel .....	46
Figure II-9 Injection de l’anesthésiant Kétamile .....	47
Figure II-10 Rats anesthésiés épilés à la main.....	48
Figure II-11 Induction des brûlures et nettoyage de croute formée.....	49
Figure II-12 Traitement avec le gel .....	50
Figure II-13 Traitement avec les patches .....	50

Figure II-14 Mesure de surface brûlée avec logiciel Image J.....	51
Figure II-15 Echantillonnage des peaux des rats.....	52
Figure II-16 Les 04 échantillons dans du formol à 4% .....	52
Figure III-1 Espèces de crevettes identifiées (A et B).....	56
Figure III-2 Composition biochimique globale du mélange des coproduits de crevettes exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche (MS).....	58
Figure III-3 Pesée du chitosane produit à partir de 600 g des carapaces de crevettes .....	59
Figure III-4 Solubilisation du chitosane extrait de crevettes dans l'acide acétique .....	59
Figure III-5 Spectre FTIR du chitosane extrait .....	61
Figure III-6 Spectre RMN 1H du chitosane extrait.....	62
Figure III-7 Mise en évidence de la présence du collagène par la méthode du biuret .....	65
Figure III-8 Mise en évidence de la présence du collagène avec le test xanthoprotéine.....	66
Figure III-9 Profil électrophorétique du collagène extrait en présence de dodécyl sulfate de sodium.....	66
Figure III-10 Evolution des surfaces brûlées en cm <sup>2</sup> durant 27 jours de traitement avec l'hydrogel, la crème Madécassol et l'eau physiologique.....	70
Figure III-11 Taux de réduction des surfaces brûlées après 27 jours de traitement .....	71
Figure III-12 Coupes histologiques colorées à l'H et à l'E des tissus cutanés de rats sains (a) et rats brûlés au 3ème degré et traités au madécassol (b) (témoin positif), à l'eau physiologique (témoin négatif) (c) et à l'hydrogel (d) au grossissement X 50 (a,b,c) et au grossissement X100 (d).....	72

## Liste des tableaux

Tableau I-1 Les différents types de collagène (PARIENTE et <i>al.</i> , 2005).....	19
Tableau I-2 Avantages des gels hydrides de chitosane-collagène .....	25
Tableau II-1 Matériels biologiques (A et B).....	27
Tableau II-2 Le matériel non biologique utilisé. ....	27
Tableau II-3 Répartition et traitements des plaies chez les rats .....	49
Tableau III-1 Données comparatives de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes	56
Tableau III-2 Rendement massique du chitosane obtenu à partir des coproduits de crevettes rapportés dans la littérature .....	58
Tableau III-3 Le degré de déminéralisation et de déprotéinisation .....	60
Tableau III-4 Degré de désacétylation du chitosane produit .....	62
Tableau III-5 Résultats des paramètres rhéologiques du chitosane produit .....	63
Tableau III-6 La teneur en matière minérale des poudres de bivalves et de seiches .....	63
Tableau III-7 Teneur en carbonates de calcium des os de seiche et de des coquilles des huitres creuses ..	64
Tableau III-8 Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des patchs et du gel préparés.....	67
Tableau III-9 Descriptions macroscopiques des brûlures traitées avec l'hydrogel, la crème Madécassol et l'eau physiologique durant 27 jours (les surfaces (cm <sup>2</sup> ) des plaies mesurées par le logiciel Image J).....	68

# Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de variance
AOAC	Association of Analytical Communities
BGP	Béta Glycérophosphate
BSA	Bovine Sérum Albumi
C°	Degré Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de Calcium
CaCO <sub>3</sub>	Carbonate de calcium
CH <sub>3</sub>	Méthyle
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CSMs	Cellules souches mésenchymateuses
Cu <sup>2+</sup>	Ions cuivre
CuSO <sub>4</sub>	Sulfate de cuivre
D <sub>2</sub> O	L'oxyde de deutérium
DA	Degré d'acétylation
DD	Degré de d'désacétylation
DO	Densité Optique
Ech	Echantillon
EGF	Facteur de croissance épidermique
FAO	Organization des Nations Unies pour l'alimentation et m'agriculture
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment ;
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
g	Gramme
GlcN	Unités D-glucosamine
GlcNAc	Unités N-acétyl-D-glucosamine
h	Heure
H	Proton hydrogène
VIII	

HCl	Chlorure d'hydrogène
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonates
HNO <sub>3</sub>	Nitric acid
IGF1	Insulin-like growth factor
IHA <sub>c</sub>	L'intensité intégrale du pic correspondant aux protons du groupement acétyle
IL-6	Interleukine-6
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
J	Jour
Kg	Kilogramme
LBCM2	Laboratoire de Bio-Chimie Moléculaire 2
LD50	Dose létale
M	Madecazol
MEC	Matrice extra-cellulaire
MF	Masse finale
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
MI	Masse Initial
min	Minute
mm	Millimètre
MS	Matière sèche
MT	Masse total
N°	Numéro
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
OSAV	Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires
PDGF	Plateled-derived growth factor
pH	Potentiel d'hydrogène
Ppm	Partie par million
RF	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
Sf	Surface finale
Si	Surface initiale
T-IX	Témoin positif

T+	Témoin négatif
T°	Température
TGF $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale
UFC	Unité forment colonie
UV	Ultraviolets
UVB	Ultraviolet-B
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial.

# Introduction générale

La production mondiale de poissons, crustacés et mollusques s'élèvent à environ 178,5 millions de tonnes, pêche et aquaculture confondues, dont 88% étaient destinés à l'alimentation humaine, le reste servant majoritairement à la production de farines et d'huiles pour l'alimentation animale **(FAO 2020)**.

Au cours de la transformation des animaux, comme le filetage des poissons, une grande quantité de sous-produits est générée, pouvant atteindre 75% du poids de l'animal. Ces sous-produits regroupent la tête, les viscères, la peau, les écailles, les nageoires, les arêtes, le sang, ou bien encore, les exosquelettes pour les crustacés. Cette importante biomasse est généralement utilisée pour l'alimentation animale à faible valeur ajoutée ou éliminée par incinération. Cependant, il s'agit d'une source non-négligeable de composés : protéines et peptides, collagène et gélatine, enzymes, chitine et chitosan, lipides et acides gras polyinsaturés, minéraux et vitamines, qui sont valorisables après traitement des matières premières. En effet, ces molécules trouvent des applications en alimentation, en nutraceutique, en cosmétique et en médecine **(AL KHAWLI et al. 2019 ; CARUSO et al. 2020 ; ALI et al. 2021)**.

Par ailleurs, la recherche de nouvelles voies de valorisation des biomasses marines est la clé pour une gestion durable des ressources naturelles, une réduction du gaspillage et des déchets **(CARUSO et al. 2020)**.

En effet, la valorisation des co-produits marins a attiré l'attention des acteurs de l'industrie, en raison de l'attrait des consommateurs pour des produits plus naturels, mais également, par l'augmentation des connaissances scientifiques sur la possibilité d'extraire et concentrer des composés à haute valeur ajoutée tels que les protéines, les enzymes, les huiles, l'hydroxyapatite, le collagène et la gélatine en ingrédients pour les industries nutraceutiques, cosmétiques et médicales **(CENTELLA et al. 2017 ; AL KHAWLI et al. 2019 ; ALI et al. 2021, BUSCAGLIA, 2022)**.

En outre, dans les contextes écologiques et économiques actuels, est apparu le souhait de s'éloigner de la pétrochimie pour tendre vers un modèle plus responsable par l'utilisation de produits biosourcés, qui produisent moins de déchets et sont préférentiellement biodégradables. Cette vision plus vertueuse s'intègre dans l'évolution d'une économie linéaire vers une économie circulaire.

Ainsi, l'objectif de ce travail est la préparation d'un hydrogel à base de biomolécules marines, issues de coproduits de la pêche et de l'aquaculture, aux pouvoirs cicatrisants des brûlures de 3ème degré.

La présente étude fait suite à deux autres travaux antérieurs réalisés, dans le cadre de projets de fin d'études, par **OULD RABAH et SAHNOUN (2022)**, **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 (minéraux, chitosane, collagène) à partir de différentes ressources marines.

Après la détermination de leurs propriétés pharmacologiques (activité 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 :

-Le premier chapitre est un aperçu général sur les biomolécules marines issues de coproduits de crustacés, de poisson et des bivalves ainsi qu'un aperçu sur les hydrogels et l'histologie de la peau et les altérations type brûlures.

-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* de l'activité cicatrisantes des hydrogels élaborés.

- Le troisième chapitre est consacré à l'interprétation des différents résultats obtenus.

Chapitre I. **Etude bibliographique**

# Partie 1 : Physiologie de la peau et de la cicatrisation

## I.1. Définition

La peau, qui est un tégument, constitue le revêtement extérieur du corps. Elle est l'organe le plus grand et le plus lourd de notre organisme. Son poids est de 4 kg et sa surface de 1,7 m<sup>2</sup> environ, chez l'adulte. Son épaisseur est variable, allant de 1 mm au niveau des paupières à 4 mm au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds. L'épaisseur moyenne du reste du corps est estimée à 2 mm en moyenne. C'est un organe souple mais résistant. On parle de tissu hétérogène associant plusieurs types de tissus : épithélial, conjonctif, nerveux et vasculaire (MELISSOPOULOS, LEVACHER, 2012).

Ses fonctions sont multiples. On retrouve une fonction de protection, une fonction de thermorégulation, une fonction sensorielle, une fonction d'échanges et une fonction métabolique (LAKHEL *et al.*, 2008).

Structuralement, la peau est composée de 3 couches superposées qui, de la plus externe à la plus interne sont : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (MELISSOPOULOS, LEVACHER, 2012). (Figure I-1)

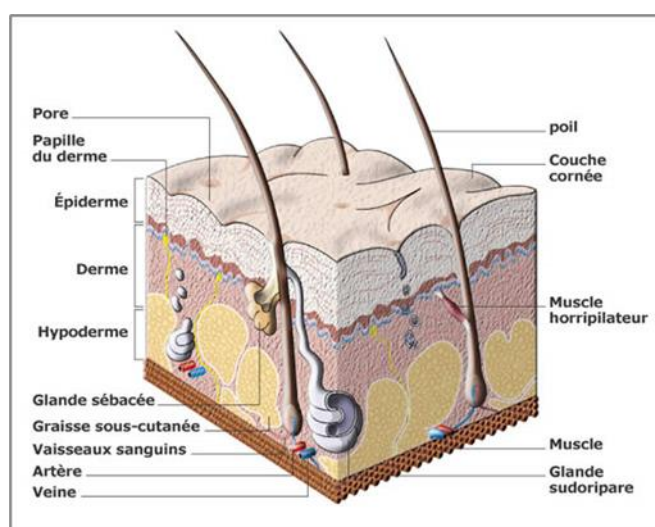


Figure I-1 Coupe de la peau (<https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-peau-7189/>).

## I.2. Histologie

### I.2.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pluristratifié pavimenteux kératinisé, essentiellement constitué de kératinocytes. Ces derniers sont reliés entre eux pour former une barrière imperméable assurant la fonction principale de l'épiderme qui est la protection de l'organisme. On parle aussi d'épithélium de revêtement (**MELISSOPOULOS, LEVACHER, 2012**).

Cet épiderme n'est pas vascularisé mais des nutriments lui sont apportés par diffusion à partir du derme (**RAFFOUL, BERGER, 2006**).

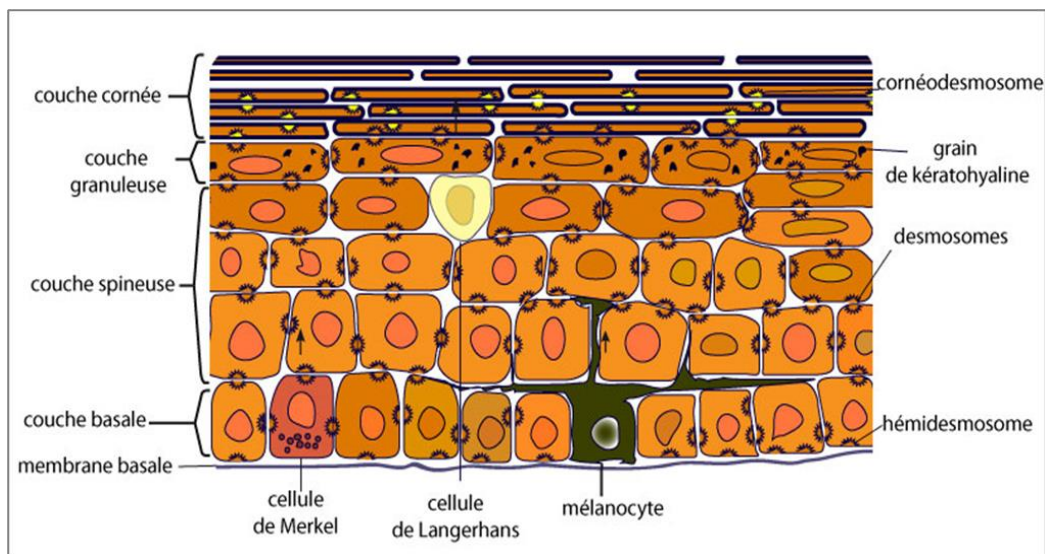
Il est constitué de 4 ou 5 couches cellulaires attachées à la lame basale, et dans lesquelles on trouve 4 types de cellules dont le cycle de renouvellement est de 20 à 30 jours (**RAFFOUL, BERGER, 2006**) (**Figure I-2**).

- les kératinocytes représentent 80% des cellules de l'épiderme. Ce sont des cellules qui se différencient en fabriquant de la kératine via le processus de kératinisation ;
- les mélanocytes synthétisent la mélanine au sein de granules appelés mélanosomes ;
- la mélanine protège les cellules des dommages que causent les rayons ultraviolets sur l'ADN ;
- les cellules de Langerhans sont des cellules immunes qui défendent l'organisme des agressions extérieures ;
- les cellules de Merkel ont un rôle de récepteur sensoriel.

#### **I.2.1.1. Les différentes couches de kératinocytes**

Du pôle basal au pôle apical apparaissent :

- La couche basale ou couche germinative (en contact avec la jonction dermo-épidermique)
- La couche épineuse ou couche du corps muqueux de Malpighi ;
- La couche granuleuse ;
- La couche claire ;
- La couche cornée. (**FONTAINE, 2012**).



**Figure I-2 :** Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épiderme humain (<https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10>).

### I.2.1.2. Les mélanocytes

Les mélanocytes synthétisent la mélanine, pigment conférant à la peau sa couleur et sa fonction de photoprotection vitale. Leur répartition à la surface de la peau n'est pas homogène (avec par exemple une plus forte densité au niveau des organes génitaux), et leur population cellulaire épidermique est faible (moins de 1%). (EISENBERG, MAYEUR, 2001).

### I.2.1.3. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans constituent le système immunitaire de la peau et sont spécialisées dans la capture, le transport et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T des ganglions lymphatiques. Elles forment alors des cellules dendritiques.

Elles se localisent entre les kératinocytes des couches basale et épineuse ainsi que dans les follicules pileux, glandes sébacées et glandes sudoripares apocrines. Leur population épidermique est faible (2 à 5%) mais grâce à leurs dendrites, elles couvrent la totalité de la surface épidermique. Leur nombre diminue chez le sujet âgé (GIRARDEAU *et al.*, 2009).

### I.2.1.4. Les cellules de Merkel

Elles représentent la population minoritaire de l'épiderme et ont un rôle de mécanorécepteur spécialisé dans la fonction du tact. Elles sont pauvres en organites intracellulaires mais présentent de nombreux ribosomes et granules neurosécrétoires à l'intérieur desquels sont stockés des neuromédiateurs. Ces cellules sont regroupées en amas appelés corpuscules ou disques de Merkel que l'on trouve dans la couche basale de l'épiderme (DARTIAL, 2010).

## I.2.2. Le derme

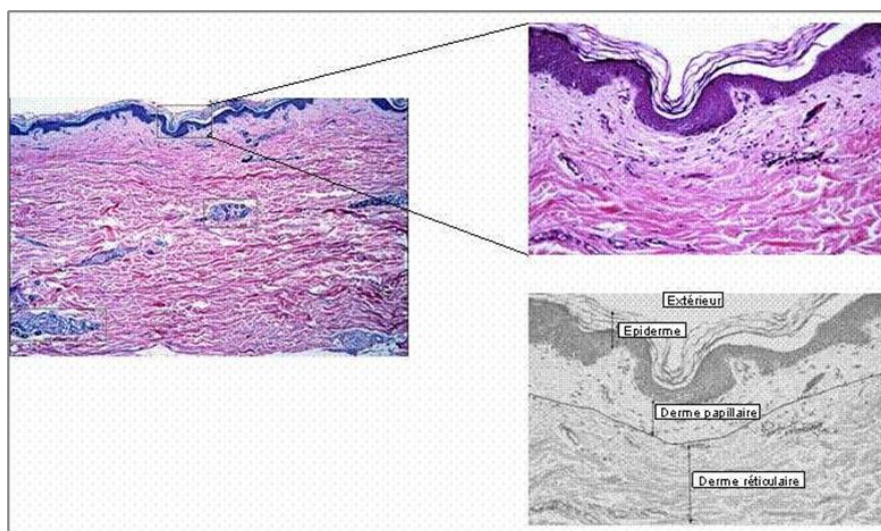
Il s'agit d'un tissu conjonctif fibreux, dense et plus épais que l'épiderme (1 à 2 mm en moyenne), dont la structure de soutien est la matrice extracellulaire. Contrairement à l'épiderme, le derme est vascularisé. Il est ainsi le support nourricier de l'épiderme. De plus, il contribue à la thermorégulation et à la réparation tissulaire (**GIRARDEAU et al., 2009**).

### I.2.2.1. Structure

On distingue deux zones (Figure I-3) :

- le derme papillaire, situé sous la jonction dermo-épidermique, très vascularisé et riche en fibres de collagène orienté perpendiculairement à l'épiderme. Ce derme renferme de nombreux éléments tels que les papilles dermiques qui le relient à l'épiderme, un réseau de fibres élastiques, les plexus sous-papillaires artériels, veineux et lymphatiques, et des terminaisons nerveuses ;
- le derme réticulaire ou couche profonde du derme qui constitue la majeure partie du derme. Son nom provient de l'aspect entrelacé de ses fibres de collagène qui, cette fois-ci, sont orientées parallèlement à l'épiderme. Cette structure contient des vaisseaux sanguins reliant les plexus sous-papillaires aux plexus cutanés situés à la jonction dermo-hypodermique

Le derme est à la fois résistant pour constituer une enveloppe solide de l'organisme et élastique pour permettre la mobilité articulaire (**DARTIAL, 2010**).



**Figure I-3** Coupe histologique de la peau faisant apparaître le derme papillaire et réticulaire ([https://www.researchgate.net/figure/Coupe-histologique-de-la-peau-faisant-apparaître-le-derme-papillaire-et-reticulaire\\_fig13\\_38958630](https://www.researchgate.net/figure/Coupe-histologique-de-la-peau-faisant-apparaître-le-derme-papillaire-et-reticulaire_fig13_38958630)).

### I.2.2.2. Composition

#### a. Les cellules résidentes du derme

Les fibroblastes d'origine mésenchymateuse revêtent une importance capitale. Ils assurent la synthèse du collagène, de l'élastine, de la substance fondamentale et des glycoprotéines de

structure. Ils ont la capacité d'interagir avec la matrice grâce à leur récepteur membranaire de type intégrine.

De plus, ils peuvent dégrader le collagène et la matrice extracellulaire, permettant un remodelage permanent du tissu. Pour cela, ils sécrètent des collagénases et des protéases.

Les fibroblastes permettent donc un renouvellement constant de la matrice extracellulaire. Ils coopèrent avec les kératinocytes pour organiser la jonction dermo-épidermique en synthétisant du collagène de types IV et VII. Aussi, les fibroblastes sont capables de produire des chimiokines dont l'interféron  $\alpha$  ayant des propriétés anti-infectieuse et antivirale. Des cellules impliquées dans l'immunité sont également présentes : des leucocytes, des cellules dendritiques dermiques, des mastocytes et des macrophages (**LACROIX, 2000**).

### **b. La matrice extracellulaire**

Elle est composée de :

- la substance fondamentale qui forme un gel très hydraté à travers lequel peuvent diffuser des métabolites. Elle est constituée de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes dont l'acide hyaluronique ;

- composants fibreux parmi lesquels on trouve le collagène, protéine fibreuse inextensible stockant les forces de tension. Structuralement, il s'agit d'une molécule rigide à trois brins, riche en proline, hydroxyproline et glycine.

On retrouve majoritairement :

- le collagène de types I et III dans le derme : leurs fibrilles formant la charpente de la matrice dermique avec au cœur du collagène de type V ;

- des fibres élastiques qui sont composées d'élastine, protéine extensible très hydrophobe riche en proline et glycine. Elle est synthétisée par les fibroblastes sous forme de tropoélastine qui se polymérise en élastine. Cette dernière possède une résistance importante aux attaques physiques et chimiques ;

- des glycoprotéines de structure synthétisées par les fibroblastes.

La fibronectine est une glycoprotéine volumineuse qui possède différents domaines lui permettant de se lier à des molécules ou à des cellules. Elle joue un rôle dans la guérison des plaies en favorisant la migration des fibroblastes et des macrophages (**DARTIAL, 2010**).

### **I.2.3. L'hypoderme**

L'hypoderme est essentiellement constitué de tissu adipeux blanc, situé juste en-dessous du derme, et attaché à lui par des expansions de fibres de collagène et de fibres élastiques. De nombreux capillaires sanguins et ramifications nerveuses le traversent (**LACROIX, 2000**).

### I.2.3.1. Localisation

Il se trouve sur l'ensemble de la surface corporelle mais son épaisseur et sa répartition varient suivant les habitudes alimentaires, l'hygiène de vie et le sexe.

Chez l'homme, son épaisseur augmente au niveau de l'abdomen et des épaules. Chez la femme, le tissu adipeux blanc est prépondérant dans la partie basse de l'abdomen, au niveau des hanches, des fesses et des cuisses.

Plus l'hypoderme est épais, plus il protège les structures profondes des brûlures (**LACROIX, 2000**).

### I.2.3.2. Composition

On distingue deux grands types de cellules (**GIRARDEAU et al., 2009**) :

- les adipocytes matures sont des cellules sphériques contenant une vacuole remplie de triglycérides et dont le volume varie en fonction du poids. Ces adipocytes sont organisés en lobules séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibroblastes, macrophages, mastocytes et fibrilles de collagène ;

- la fraction stroma-vasculaire à l'intérieur de laquelle on trouve :

- Les cellules progénitrices : cellules souches du tissu adipeux pouvant permettre la régénération d'un tissu ;
- Les préadipocytes, précurseurs des adipocytes ;
- Les cellules endothéliales responsables de la néovascularisation du tissu adipeux ;
- Les lymphocytes et macrophages activés lors d'un processus inflammatoire ;
- Les fibroblastes qui synthétisent du procollagène et de la proélastine.

### I.2.3.3. Fonctions

Le tissu adipeux possède 4 grandes fonctions (**LACROIX, 2000**) :

- métabolique : le tissu adipeux constitue la plus grande réserve énergétique dans laquelle l'organisme peut puiser en fonction de ses besoins.

- sécrétoire : les adipocytes sont capables de produire des molécules bioactives appelées adipokines. Ces molécules régulent le métabolisme énergétique et l'état inflammatoire de l'organisme (**DARTIAL, 2010**).

- protectrice et mécanique : le tissu adipeux a un rôle d'isolant thermique, de tissu de soutien et de protection des structures nobles sous-jacentes ;

- production d'hormones stéroïdiennes : à l'intérieur du tissu adipeux se trouve l'enzyme aromatase qui transforme les androgènes en œstrogènes

### I.3. 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. (CLAEYSSSEN, 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 (CLAEYSSSEN, 2009).

#### I.3.1. Les brûlures

##### I.3.1.1. Définition

Les brûlures sont des lésions de la peau ou d'autres tissus engendrés 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.3.1.2. Étiologie des brûlures

Il existe plusieurs agents responsables des brûlures. (Claeyssen, 2009)

- Les brûlures thermiques
- Les brûlures électriques
- Les brûlures chimiques
- Les brûlures par radiations

##### I.3.1.3. Physiopathologie des brûlures

Les brûlures sont classées en fonction de leur profondeur comme suit :

• **Brûlures du 1er 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<sup>ème</sup> degré superficiel** : ces brûlures présentent une destruction de l'épiderme avec atteinte de la membrane basale. Elles se caractérisent par des saignements, des cloques et des douleurs intenses. La guérison de ces brûlures peut prendre 10 à 15 jours sans laisser de cicatrices. (Wassermann, 2002).

• **Brûlures du 2<sup>ème</sup> 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<sup>ème</sup> 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).

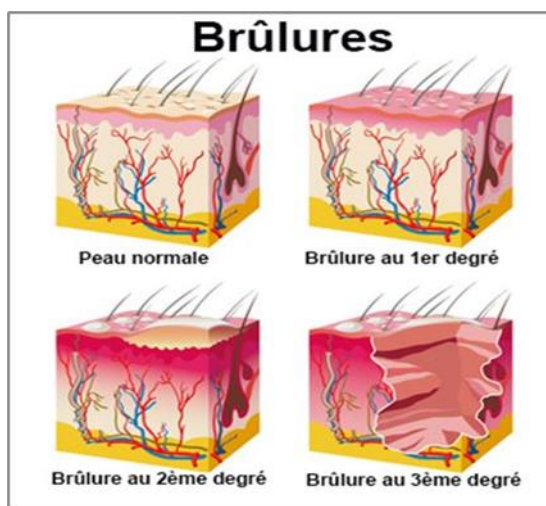


Figure I-4 Anatomie d'une peau normale et une peau brûlée (différents degrés de brûlures)  
(<https://www.docteurcllic.com/guide-montagne/brulure-en-montagne.aspx>).

## I.4. La cicatrisation normale : mécanismes

La cicatrisation est une réponse du revêtement cutané à toute atteinte à son intégrité. Son but est d'induire une réparation du tissu lésé. Elle se déroule en 3 phases comme indiqué ci-dessous (MELISSOPOULOS, LEVACHER, 2012).

### I.4.1. Phase initiale

#### I.4.1.1. Etape vasculaire

Suite au traumatisme, il y a une rupture vasculaire qui se traduit par un saignement. Ce dernier s'arrête très rapidement par vasoconstriction artériolaire au niveau des berges de la plaie. Puis, se produit une vasodilatation et une vasoperméabilité capillaire permettant aux cellules sanguines et aux composants plasmatiques de parvenir aux tissus lésés. Ainsi, les plaquettes adhèrent au collagène des parois vasculaires endommagées par l'intermédiaire de récepteurs à la fibronectine

Un réseau de fibrine entoure alors le clou plaquettaire, formant le caillot plaquettaire. (MELISSOPOULOS, LEVACHER, 2012).

### **I.4.1.2. Etape inflammatoire et détersion**

La réaction inflammatoire qui se produit entraîne :

- rougeur et chaleur, consécutives à la vasodilatation ;
- formation d'œdème lié à la vasoperméabilité ;
- manifestations douloureuses résultant de la pression tissulaire due à l'œdème, ce qui irrite les terminaisons nerveuses ;
- une réaction immunitaire se met alors en route, pour éliminer les débris cellulaires et combattre les microorganismes présents.

Les protéines dénaturées des tissus brûlés et les débris nécrotiques vont être éliminés. Pour cela, des enzymes protéolytiques (protéase, hydrolase, lysozyme, lactoferrine) produites par les cellules inflammatoires (polynucléaires et macrophages) vont intervenir et engendrer leur élimination.

L'utilisation de topiques détersifs et de moyens mécaniques (chirurgicaux) peuvent réduire la durée de cette phase. Le processus de cicatrisation de la brûlure est ainsi accéléré (**LAKHEL et al., 2008**).

## **I.4.2. Phase de réparation tissulaire**

### **I.4.2.1. Bourgeonnement**

Cette seconde phase a lieu juste après la phase de détersion. Les cellules inflammatoires diminuent au profit des cellules endothéliales et des fibroblastes ayant chacun un rôle bien particulier. En effet, les cellules endothéliales permettent 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.

Aussi, la présence de cytokines et de nombreux facteurs de croissance type FGF (Fibroblast growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), TGF $\alpha$  (Transforming growth factor alpha), TGF $\beta$  (Transforming growth factor beta), IGF1 (Insulin-like growth factor 1), interleukines, contribue à la formation d'un bourgeon charnu également appelé tissu de granulation. Le tissu de granulation est un tissu jeune et lâche qui comble la perte de substance dermique. Lorsque le bourgeon a comblé la perte de substance, la réparation épidermique se fait à partir des berges de la plaie ainsi que des reliquats épidermiques épargnés par la brûlure (**GACHIE, 2012**). Se met alors en place la phase d'épithélialisation.

### **I.4.2.2. Epithélialisation**

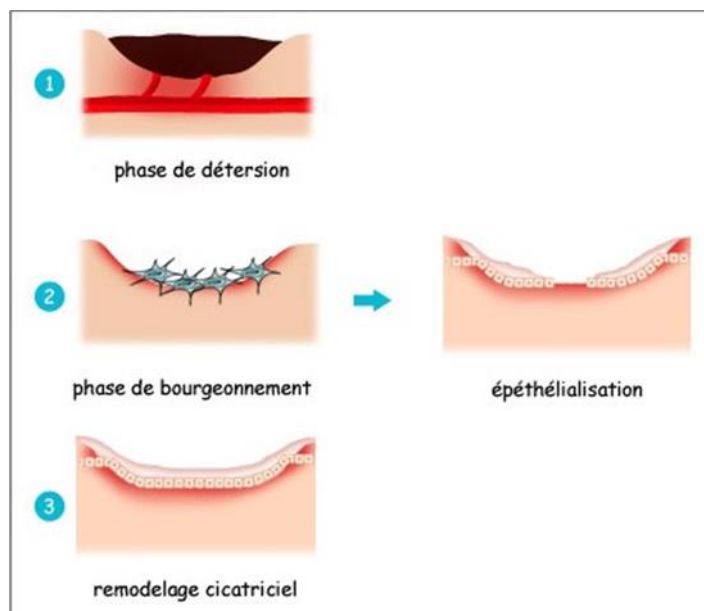
Dans un premier temps, les kératinocytes souches issus de la membrane basale, vont être mobilisés. Puis, stimulés par l'EGF (facteur de croissance épidermique), ils vont migrer le long des fibres de fibrine déposés par les cellules inflammatoires. Ils vont ensuite se multiplier jusqu'à

ce que le lit de la plaie soit recouvert. Un fois le derme entièrement réparé, les kératinocytes vont alors se différencier et former un nouvel épiderme (GACHIE, 2012).

### I.4.3. Phase de remodelage

C'est une phase qui dure en moyenne 18 mois. Cette période englobe 2 phases :

- une phase inflammatoire (4-6 mois) où la cicatrice est érythémateuse, prurigineuse et peut s'hypertrophier à ce moment-là ;
- une phase de remodelage (1 an) qui va permettre d'augmenter la résistance de la cicatrice de façon considérable. La cicatrice se stabilise et diminue d'épaisseur mais la rétraction cicatricielle se maintient. Une cicatrice non pathologique est stable dans le temps, régulière, non douloureuse et non adhérente au plan sous-jacent (GACHIE, 2012).



**Figure I-5** Principales phases de cicatrisation (<https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/dermatologie/cicatrisation/>).

## Partie 2 : Biomolécules marines et valorisation biotechnologique

### I.5. Introduction

La cicatrisation cutanée est un processus crucial pour la régénération des tissus et la guérison des lésions de la peau. A cet égard, le chitosane et le collagène marin, associés aux minéraux, se sont révélés être des polymères de choix. Le chitosane, dérivé de la chitine présente dans les carapaces de crustacés, et le collagène marin, extrait des poissons et autres organismes marins, offrent des avantages significatifs dans la cicatrisation cutanée. Le chitosane possède des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et stimule la régénération des tissus, tandis que le collagène marin fournit une structure et une élasticité essentielles à la réparation des tissus cutanés endommagés. L'ajout de minéraux renforce encore les effets bénéfiques de ces polymères, favorisant la prolifération cellulaire et la formation d'une matrice extracellulaire solide. Dans cette étude, nous explorerons les propriétés et les applications du chitosane, du collagène marin et des minéraux dans le contexte de la cicatrisation cutanée, mettant en évidence leur potentiel pour accélérer et améliorer la guérison des plaies, des ulcères et des brûlures, tout en favorisant la régénération et la santé de la peau.

### I.6. Le chitosane

#### I.6.1. Structure et origine

Le chitosane est un produit dérivé de la chitine, polysaccharide retrouvé dans l'exosquelette des crustacés (comme la crevette, le crabe et le homard), l'endosquelette des céphalopodes, chez les insectes (JEUNIAUX, 1988), ou encore dans la paroi cellulaire des champignons, levures et algues (CAUCHIE, 2002). La chitine est le deuxième polymère naturel le plus abondant sur terre après la cellulose (Roberts, 1992). L'obtention du chitosane se fait à partir de la désacétylation partielle de la chitine de façon chimique ou enzymatique (LAMARQUE, 2005).

Le procédé le plus utilisé est la désacétylation chimique de par son faible coût et sa facilité de mise en œuvre industrielle (MUXIKA et al., 2017). Après des traitements de déminéralisation et de déprotéinisation de la chitine, la désacétylation du chitosane est réalisée en présence d'hydroxyde de sodium (30 à 50%) à des températures supérieures à 90°C pendant plus d'une heure (Domard, 2001). Cette désacétylation est souvent réalisée sous une atmosphère d'azote afin d'éviter des réactions secondaires indésirables.

Le chitosane et la chitine sont des polysaccharides linéaires dont les unités répétitives, GlcN (unités D-glucosamine) et GlcNAc (unités N-acétyl-D-glucosamine), sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ , (1-4). Le degré d'acétylation (DA) représente la fraction molaire d'unités N-acétyl-D-glucosamine présentes dans le copolymère.

La chitine et le chitosane se différencient par leur comportement en milieux aqueux : la chitine est insoluble (RINAUDO, 2006) tandis que le chitosane est soluble dans des solutions faiblement acides suite à la protonation des fonctions amine des unités D-glucosamine. Ce changement de solubilité intervient autour d'un DA de 60% : il est généralement admis que le DA est inférieur à 60% pour le chitosane et supérieur à 60% pour la chitine (DOMARD, 2001). La masse molaire du chitosane varie en fonction de la source de la chitine et des conditions de désacétylation (MUXIKA *et al.*, 2017). En effet, les chaînes polymères sont sensibles aux températures élevées et l'étape de désacétylation peut lyser les chaînes de chitosane.

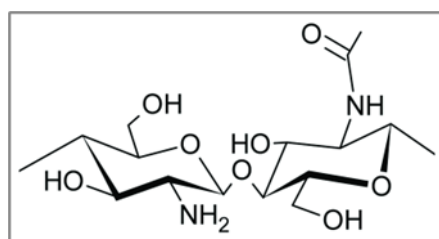


Figure I-6 Structure chimique du chitosane ([https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan\\_fig4\\_355787682](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan_fig4_355787682)).

## I.6.2. Propriétés physico-chimiques

### I.6.2.1. Le degré d'acétylation

Le degré d'acétylation est un paramètre que l'on peut moduler via une réaction de réacétylation du chitosane. Cette réaction est réalisée sur le chitosane à température ambiante, en solvant hydro-alcoolique légèrement acide et en utilisant de l'anhydride acétique. Ce réactif s'hydrolyse en présence d'eau et pour limiter cette réaction secondaire, on utilise du 1,2-propanediol qui augmente la viscosité du milieu et favorise la réaction sur les amines primaires. Cela permet ainsi d'augmenter le rendement de la réaction de réacétylation. Divers paramètres physico-chimiques des solutions de chitosane sont impactés par le DA, comme le rayon de giration, l'incrément d'indice de réfraction, la longueur de persistance du polymère, etc (Schatz *et al.*, 2003).

### I.6.2.2. La viscosité

La viscosité et le degré de désacétylation 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 (TAOUI, 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.6.2.3. La masse molaire**

La masse molaire du chitosane influence les propriétés physico-chimiques de ses solutions aqueuses comme leur viscosité, par exemple. Plus la masse molaire du polysaccharide sera élevée, plus les chaînes seront enchevêtrées (à concentration pondérale constante) et plus les solutions seront visqueuses.

Les variabilités mentionnées ci-dessus soulignent qu'il est important de caractériser précisément le chitosane avant de l'utiliser (TAOUINT, 2016).

### **I.6.2.4. 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.6.3. Les propriétés biologiques**

Le chitosane a de nombreuses applications biologiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Les différents travaux, reportés dans la littérature, permettent de mettre en évidence les diverses propriétés biologiques du chitosane.

### **I.6.3.1. La toxicité**

La toxicité du chitosane et des oligomères de chitosane a été évaluée dans différentes études. Par voie orale, la LD50 (dose létale) du chitosane est supérieure à 1500 mg.kg<sup>-1</sup> chez le rat et supérieur à 16000 mg.kg<sup>-1</sup> chez la souris (à titre de comparaison, chez la souris, la LD50 est de 12 000 mg.kg<sup>-1</sup> pour le saccharose). Par voie intraveineuse, l'administration de 8,6 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> d'oligomères de chitosane chez le lapin pendant 5 jours consécutifs ne provoque aucun effet pendant toute la durée de l'étude (HIRANO *et al.*, 1990). Aucune réaction allergique n'a été décelée lors de l'implantation, de l'injection ou d'ingestion de matériaux à base de chitosane (WAIBEL *et al.*, 2011).

### **I.6.3.2. La biocompatibilité**

La biocompatibilité est définie de manière très générale comme la capacité que possède un matériau en contact avec un système biologique à ne pas produire d'effets indésirables. La biocompatibilité relate les critères que doit remplir un matériau pour qu'il soit « accepté » par un système biologique quel que soit le type d'application auquel il est destiné (WILLIAMS, 2008).

De façon générale, la cytocompatibilité du chitosane et de la chitine est aujourd'hui bien admise. La cytotoxicité du chitosane a été vérifiée *in vitro* avec les fibroblastes, les kératinocytes, les chondrocytes, les ostéoblastes et les cardiomyocytes (HOWLING *et al.*, 2001) (CHATELET *et al.*, 2001).

### I.6.3.3. La biodégradabilité

Le chitosane peut être dégradé par des enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre les unités constitutives du polymère. Chez les mammifères, le chitosane est majoritairement dégradé *in vivo* par le lysozyme, une enzyme non spécifique (VÅRUM *et al.*, 1997). De plus, la littérature recense l'existence d'une enzyme spécifique : la chitosanase (SOMASHEKAR, JOSEPH, 1996). Présente chez les plantes comme chez l'homme, la chitosanase hydrolyse le chitosane présent dans certains champignons pathogènes et constitue un élément de défense.

Plusieurs travaux ont montré que la dégradation enzymatique du chitosane dépend de la valeur de son degré d'acétylation, de la distribution des unités acétylées et de la masse molaire du polymère (VÅRUM *et al.*, 1997).

### I.6.3.4. La bio-activité du chitosane

Le chitosane est connu pour posséder de nombreuses propriétés biologiques : antimicrobien, anti-inflammatoire, antioxydant, anticancéreux, antidiabétique, neuro-protecteur, hémostatique et mucoadhésif. Les matériaux à base de chitosane sont donc particulièrement bien adaptés pour l'ingénierie tissulaire (Croisier, Jérôme, 2013).

Comme pour les propriétés physico-chimiques, l'activité biologique du chitosane dépend de ses caractéristiques structurales (DA, Mw, etc.) (CHATELET *et al.*, 2001). Par exemple, Chatelet *et al.* (2001) ont étudié le comportement et l'évolution de fibroblastes et de kératinocytes lors de leur mise en contact avec des films de chitosane de différents DA (entre 2% et 50%). Ils ont observé que plus le DA était élevé, plus l'adhésion cellulaire sur les films était faible. Ceci est en corrélation avec la diminution des fonctions amines protonées. De plus, les fibroblastes adhéraient deux fois plus que les kératinocytes aux films de chitosane ; l'adhésion cellulaire dépend donc de l'affinité de chaque type cellulaire avec le matériau.

Les propriétés biologiques du chitosane dépendent aussi d'autres facteurs comme la forme physique du matériau utilisé (poudre, solution, hydrogel, etc.) et celle-ci doit être adaptée à l'application concernée. Tandis que les poudres de chitosane peuvent être utilisées en thérapie génique, les hydrogels physiques permettent de mimer la structure de la matrice extracellulaire et sont très utilisés en ingénierie tissulaire (TIBBITT, ANSETH, 2009). Dans le cadre de cette étude, la forme « hydrogel physique » a été sélectionnée et nous allons présenter dans la partie qui suit les différentes méthodes qui permettent de former des hydrogels physiques de chitosane. Les voies de gélification présentées ci-après ne concernent que des gels formés à partir de chitosane non modifié.

## I.7. Le collagène

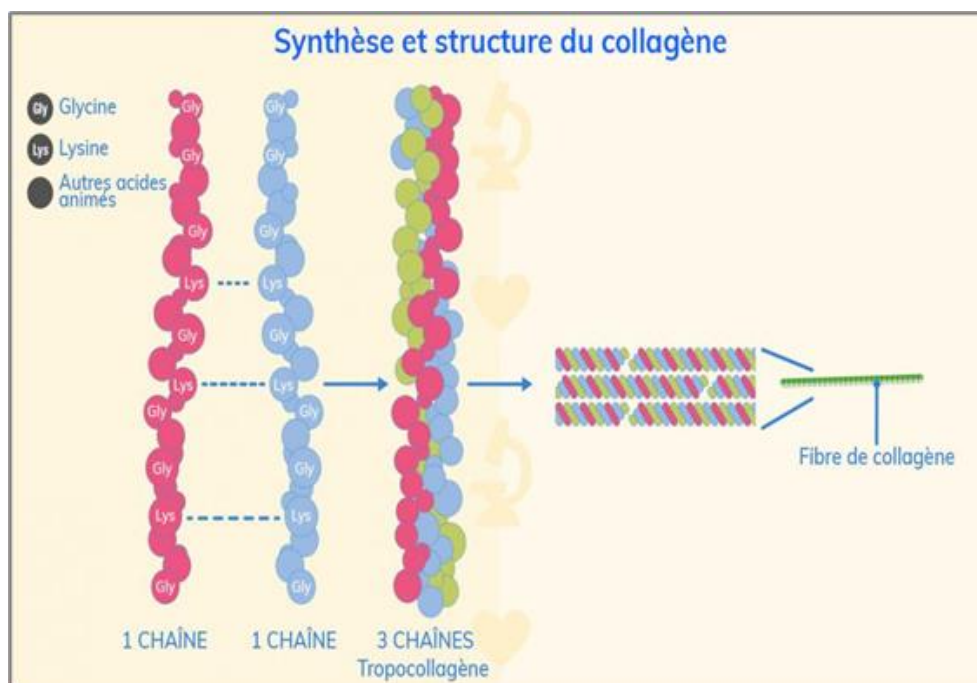
### I.7.1. Définition et structure

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.

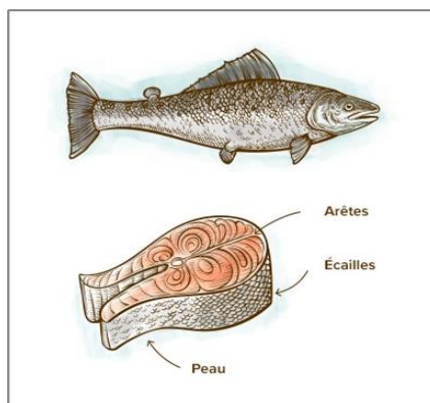
Ces protéines ont pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement et sont indispensables au processus de cicatrisation. C'est la protéine la plus abondante du règne animal, représentant le quart environ de la masse protéique des mammifères. Il est présent dans les os, le cartilage, 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 (Figure I-7). Le collagène comporte trois chaînes alpha ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et/ou  $\alpha 3$ ) associées en triple hélice, laquelle triple hélice de collagène est qualifiée de chaîne gamma ( $\gamma$ ). 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  $\alpha 1$  à une chaîne  $\alpha 2$ .

Le collagène marin est extrait de peaux, d'arêtes ou d'écailles des poissons qui représentent 30% des coproduits issus de la transformation des produits de la mer (Figure I-8).



**Figure I-7** Structure du collagène. (<https://www.pensersante.fr/collagene-fibre-structurante-corps-humain>)



**Figure I-8** Collagène de poissons (marin). (<https://www.dieta-natura.com/plantes-actifs/collagene-marin.html>)

### I.7.2. Types de collagène

Il existe différents types. Ces derniers sont consignés dans le Tableau I-1 suivant.

**Tableau I-1** Les différents types de collagène (PARIENTE et *al.*, 2005).

Type		Forme moléculaire	Forme polymérisée	Distribution tissulaire
Formant des fibrilles	I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Fibrille	Os, peau, tendons, ligaments, cornée, organes internes (90% du collagène corporel)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrille	Cartilage, disque intervertébral, notochorde, humer vitrée
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrille	Peau, vaisseaux sanguins, organes internes
	V	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$ et $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha (V)$	Fibrille (avec type I)	Idem type I
	XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha(XI)$	Fibrille (avec type II)	Idem type II
Associé aux fibrilles	IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha(IX)$	Association latérale avec fibrilles de type II	Cartilage
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Association latérale avec fibrilles de type I	Tendons, ligaments, certains autres tissus
Formant des réseaux	IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	Réseau de type feuillet	Lame basale
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fibrilles d'ancrage	En dessous de l'épithélium squameux stratifié
Transmembranaire	XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Inconnue	Hémidesmosomes
Autres	XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	Inconnue	Lame basale autour des vaisseaux sanguins

### I.7.3. Caractéristiques physico-chimiques (PARIENTE et *al.*, 2005)

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) ( $\approx 300$  kD).

#### **I.7.4. Propriétés pharmacologiques (PARIENTE et al., 2005)**

Les principales utilisations du collagène marin sont :

- En cosmétique, il est utilisé comme hydratant et tenseur. Il est très proche du 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, il est utilisé pour :
  - La réalisation d'éponges hémostatiques, pansements cicatrisants,
  - La création de peaux artificielles,
  - L'obtention de matériaux de reconstitution osseuse,

Les gels de collagène hydratés associés à des fibroblastes permettent d'obtenir un derme équivalent. Ce tissu est ensuiteensemencé 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.

#### **I.7.5. Propriétés biologiques du collagène**

L'intérêt premier pour le collagène est qu'il est un substrat pour les cellules et plus particulièrement pour les fibroblastes et influence la migration, l'attachement, l'adhésion et la différenciation cellulaire. En effet, les cellules sont capables de reconnaître le collagène grâce aux récepteurs intégrines présents sur leurs membranes.

Il existe deux sortes d'interactions avec le collagène (**HEINO et al., 2009, PARENTEAU et al., 2010**)

- Les interactions directes cellules-collagène qui mettent en jeu des récepteurs cellulaires qui reconnaissent spécifiquement une séquence de peptide de la molécule de collagène (glycoprotéines, intégrines)

- Les interactions indirectes cellules-collagène via d'autres interactions cellules-matrice qui entraînent une stabilisation des cellules au sein de la MEC (fibronectine, laminine, RDG qui se lie aux intégrines)

Ces propriétés biologiques expliquent le large intérêt qu'a suscité le collagène pour la fabrication d'hydrogel, seul ou comme ajout.

## **I.8. Les minéraux**

Les coquilles de bivalves, tels que les moules, les huîtres et les palourdes, contiennent divers minéraux et peuvent être utilisées en biotechnologie pour différentes applications :

- Carbonate de calcium : le carbonate de calcium est le principal composant minéral des coquilles de bivalves, constituant généralement plus de 95% de leur composition. Il est utilisé dans diverses applications en biotechnologie, telles que :
  - en tant que matériau de substrat pour la culture de cellules et de tissus en laboratoire,
  - dans la production de matériaux biomimétiques pour la régénération osseuse,
  - comme additif dans les milieux de culture pour favoriser la croissance cellulaire.
- Magnésium : le magnésium est également présent en petites quantités dans les coquilles de bivalves.

Il peut être extrait et utilisé pour :

- la fabrication de biomatériaux, tels que des implants médicaux résorbables,
- la production d'additifs alimentaires enrichis en magnésium.
- Strontium : certains coquillages peuvent accumuler du strontium à des concentrations significatives.

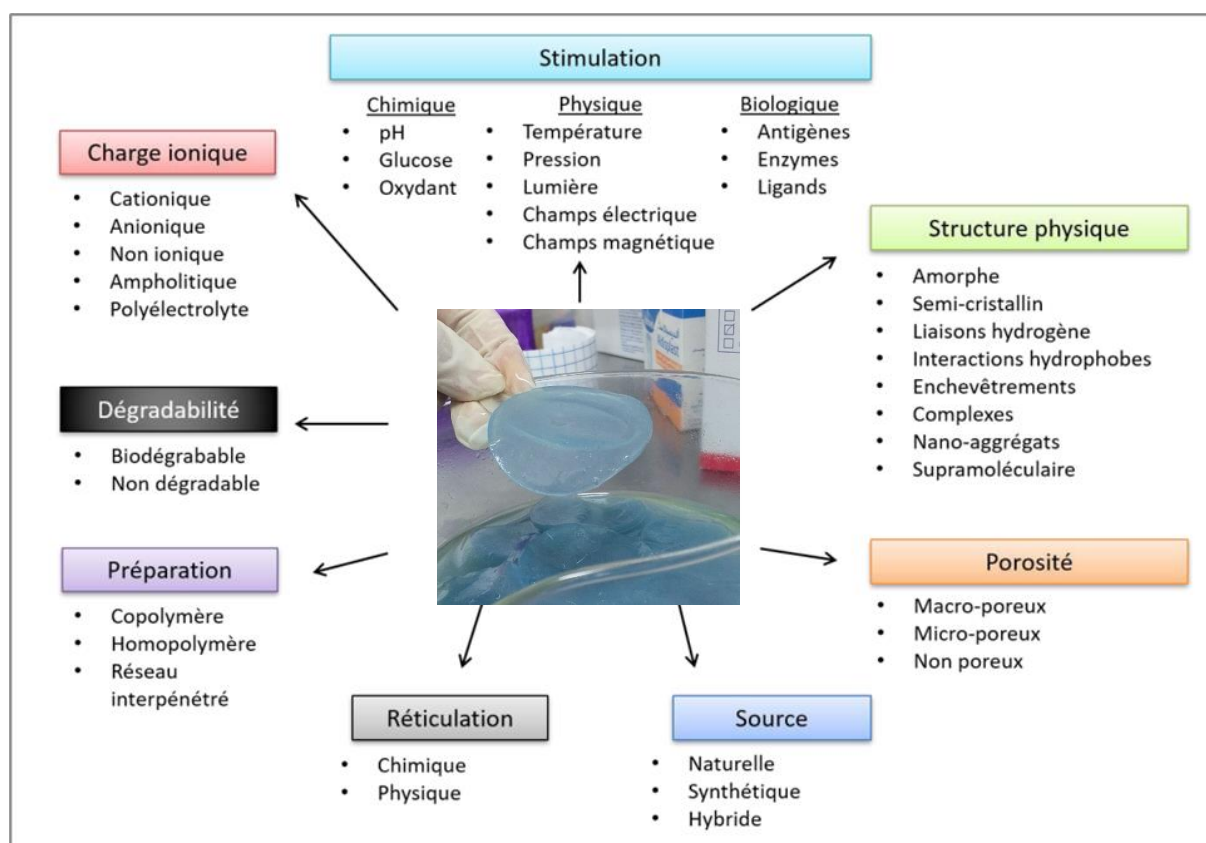
Le strontium extrait des coquilles peut être utilisé pour :

- la fabrication de matériaux dentaires, tels que les ciments dentaires et les composites,
- la préparation de biomatériaux pour la régénération osseuse.
- Silice : bien que moins abondante que le carbonate de calcium, la silice est également présente dans les coquilles de certains bivalves. Elle peut être utilisée pour :
  - la fabrication de matériaux composites renforcés par des fibres de silice,
  - la production de supports de culture pour les microorganismes en biotechnologie.

## **I.9. Les hydrogels de chitosane-collagène**

### **I.9.1. Définition d'un hydrogel**

Depuis 2007, selon IUPAC, un gel est défini comme un réseau polymère ou un réseau colloïdal non fluide dont l'ensemble du volume est gonflé par un liquide (ALEMAN *et al.*, 2007). On utilise le terme d'hydrogel pour nommer le matériau dans le cas où le liquide est de l'eau. Cette définition générale du terme « hydrogel » permet d'englober de nombreux matériaux avec des structures, des propriétés physico-chimiques et biologiques très différentes. Il n'existe pas de classification officielle des hydrogels et ils peuvent être différenciés selon plusieurs critères (Figure I-9).



**Figure I-9** Classification des principaux types d'hydrogel (liste non exhaustive). (SUN *et al.*, 2015)  
[Photo de notre hydrogel physique à base de chitosane-collagène (préparé au laboratoire de l'ENSSMAL)]

Les hydrogels peuvent aussi être définis et caractérisés en fonction de leurs propriétés rhéologiques (ROSS-MURPHY, 1994). En effet, ALMDAL *et al.* (1993) donnent une définition d'un gel : « Un gel est un matériau mou, solide, ou semblable à un solide de deux composants ou plus, dont l'un est un liquide présent en quantité substantielle. » (ALMDAL *et al.*, 1993).

Les auteurs précisent la définition d'un gel en utilisant une analyse mécanique dynamique en cisaillement et en s'intéressant à l'évolution des modules rhéologiques. On distingue les gels dits « faibles » des gels dits « forts » en fonction de leur comportement rhéologique sur une gamme de fréquences de cisaillement appliquée (ROSS-MURPHY, 1994, KAVANAGH, ROSS-MURPHY, 1998).

### **I.9.2. Propriétés mécaniques**

Traditionnellement, des analyses mécaniques dynamiques sont utilisées pour caractériser ces matériaux hydrogel : cisaillement, traction, et/ou compression (STAMMEN *et al.*, 2001). Ces analyses permettent d'évaluer la rigidité des hydrogels à travers la mesure de leurs modules d'élasticité.

### **I.9.3. Propriétés de diffusion**

L'évaluation des propriétés de diffusion d'un hydrogel est primordiale pour son utilisation dans de nombreuses applications biomédicales et pharmaceutiques. En effet, elle permet de mieux comprendre l'incorporation de principes actifs dans la matrice et ainsi de prédire leur vitesse de relargage. Elle permet également de connaître la vitesse d'apport en oxygène et nutriments à l'intérieur de l'hydrogel (FITZGERALD *et al.*, 2015).

Il existe plusieurs méthodes pour étudier les propriétés de diffusion d'un hydrogel. Par exemple, dans le cas où l'hydrogel sera utilisé pour la vectorisation de principes actifs, l'étude de la cinétique de relargage de molécules initialement contenues dans l'hydrogel est souvent utilisée. On retrouve également des méthodes physiques comme la résonance magnétique nucléaire ou encore plus récemment la redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP en anglais, pour Fluorescence Recovery After Photobleaching) en utilisant la microscopie confocale (FAIVRE ET *al.*, 2018).

### **I.9.4. Les formes des hydrogels**

#### **I.9.4.1. Les hydrogels injectables**

Le terme « hydrogels injectables » désigne des formulations injectées sur le site à traiter et gélifiant *in situ*. Ce type d'hydrogel peut être formé soit par réticulation chimique (agents réticulants, réactions polymère-polymère, ...), soit par réticulation physique (réaction thermosensible des polymères, réaction au pH, ...). Par exemple, LU *et al.* (2008) ont développé une formulation gélifiant *in situ* thermosensible à base de chitosane couplé à du 1,2 époxybutane (5% m/m) et comprenant des cellules souches embryonnaires. Les résultats ont montré une bonne implantation et un maintien des cellules souches sur le tissu infarci ainsi qu'une conservation de la fonction cardiaque (Lu *et al.*, 2008).

Le fait que ces hydrogels injectables puissent être positionnés sur la zone lésée sans nécessiter de chirurgie invasive potentiellement dangereuse fait de ces gels une forme couramment étudiée pour l'ingénierie tissulaire cardiaque et constitue l'un de leurs principaux avantages par rapport aux gels pré-formés. Ces types d'hydrogel sont généralement injectés directement sur la zone infarctée assez rapidement après l'infarctus (environ 2 semaines après, donc en phase aiguë), de façon à limiter le remodelage ventriculaire amincissant la paroi myocardique. Ils sont également utilisés en tant que supports pour l'administration d'agents thérapeutiques et de cellules (HUANG *et al.*, 2015).

### **I.9.4.2. Les patches hydrogel**

Les patches hydrogel sont des pansements médicaux spécialement conçus pour favoriser la cicatrisation cutanée et le traitement des brûlures du troisième degré. Ils sont fabriqués à partir d'un matériau hydrogel qui contient une grande quantité d'eau, ce qui leur confère des propriétés uniques.

L'hydrogel est un polymère réticulé qui peut absorber et retenir une quantité importante d'eau. Cette capacité d'absorption permet au patch hydrogel de maintenir une hydratation optimale de la plaie, ce qui favorise la régénération des tissus et accélère le processus de cicatrisation.

Pour les brûlures du troisième degré, qui sont les plus graves, les patches hydrogel offrent plusieurs avantages. Tout d'abord, ils protègent la plaie contre les infections en formant une barrière physique contre les bactéries et les autres agents pathogènes. De plus, l'hydrogel crée un environnement humide et favorable à la cicatrisation en maintenant un niveau d'humidité optimal dans la plaie. Cela favorise la migration cellulaire, la prolifération des cellules et la régénération des tissus.

En plus de favoriser la cicatrisation, les patches hydrogel soulagent également la douleur associée aux brûlures. L'hydrogel a des propriétés analgésiques qui apaisent la sensation de brûlure et réduisent l'inconfort ressenti par le patient.

L'application des patches hydrogel est relativement simple. Ils sont généralement présentés sous forme de feuilles ou de pansements prédécoupés, prêts à être appliqués sur la plaie. Avant l'application, la plaie est généralement nettoyée et désinfectée. Ensuite, le patch hydrogel est placé délicatement sur la surface de la plaie et fixé en place à l'aide d'un pansement ou d'une bande adhésive.

Il est important de noter que les patches hydrogel ne conviennent pas à tous les types de plaies. Ils sont particulièrement efficaces pour les brûlures du troisième degré et les plaies chroniques à faible exsudat (production de liquide par la plaie), mais ils peuvent ne pas être adaptés à d'autres types de blessures. En résumé, les patches hydrogel sont des dispositifs médicaux utilisés pour la cicatrisation cutanée et le traitement des brûlures du troisième degré. Leur capacité à maintenir une hydratation optimale de la plaie favorise la régénération des tissus, réduit la douleur et protège contre les infections (SUN *et al.*, 2015).

### **I.9.5. Les hydrogels de chitosane-collagène**

Un mélange de chitosane et de collagène pourrait s'avérer fort intéressant pour pallier à la fois les limites des hydrogels de chitosane et celles des hydrogels de collagène. Plusieurs matériaux à base de chitosane et collagène de type I ont ainsi été étudiés pour de nombreuses applications en médecine régénérative de tissus tels que les os, les ligaments, la peau et les vaisseaux sanguins (Wang *et STEGEMANN*, 2011). Ces travaux ont montré que le collagène permet d'améliorer les interactions entre les cellules et la matrice (DANG *et al.*, 2017). De son côté, le chitosane permet

d'augmenter les propriétés mécaniques du collagène et de diminuer sa cinétique de dégradation. En effet des molécules polycationiques telles que le chitosane favorisent la formation d'interactions électrostatiques entre les molécules de collagène, via ses nombreux groupements amines et carboxyles qui sont chargés négativement à pH neutre (DANG *et al.*, 2017). Des liaisons hydrogènes se forment également entre le chitosane et le collagène et ces liens sont suffisamment résistants pour stabiliser la structure du mélange et augmenter fortement les propriétés mécaniques des gels de collagène.

Il est intéressant de préciser que, tout comme le chitosane, le collagène peut gélifier à 37°C en présence de Béta Glycérophosphate grâce à la création de liaisons hydrogènes et d'attractions électrostatiques entre le chitosane, le collagène, le BGP et les molécules d'eau (DANG *et al.*, 2017, Moreira *et al.*, 2016, WANG ET STEGEMANN, 2010).

De nombreuses équipes de chercheurs se sont penchées sur l'étude des propriétés mécaniques, de la porosité et de la dégradation d'hydrogels de chitosane-collagène (Wang et Stegemann, 2010, 2011).

Le Tableau I-2 présente les avantages à ajouter du collagène dans les hydrogels de chitosane et inversement.

**Tableau I-2** Avantages des gels hydrides de chitosane-collagène

Avantage de l'ajout de collagène aux gels de chitosane	Avantage de l'ajout de chitosane aux gels de collagène
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de la porosité</li> <li>- Augmentation de l'interconnexion entre les pores</li> <li>- Augmentation de l'adhésion, de la prolifération et de la différenciation cellulaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cinétique de gélification plus rapide</li> <li>- Augmentation de la résistance et du module de Young</li> <li>- Dégradation plus lente</li> <li>- Diminution de la contraction du gel en présence de cellules</li> </ul>

## Chapitre II. **Matériel et méthodes**

**II.1. Matériel**

**II.1.1. Matériel biologique :**

Dans le contexte de cette étude, les échantillons biologiques employés sont les suivants :

- Carapaces de crevettes
- Coquilles de moules, d’huitres et os de seiches
- Peaux de poissons
- Rats Wistar

**Tableau II-1** Matériels biologiques (A et B)



**II.1.2. Matériel non biologique**

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

**Tableau II-2** Le matériel non biologique utilisé.

Appareillage et matériels de laboratoire	Réactifs	Excipients
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mixeur</li> <li>• Balance de précision (shimadzu AUW 220 D Uni Bloc)</li> <li>• Etuve (memmert)</li> <li>• Creusets, spatules,</li> <li>• Thermomètre</li> <li>• Four à moufle (wise therm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réactif de biuret</li> <li>• Acétone</li> <li>• Ethanol</li> <li>• Eau distillée</li> <li>• Alcool chirurgical</li> <li>• Hcl</li> <li>• NaOH</li> <li>• Solution NaCl saturée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Huile de soja</li> <li>• Conservateur</li> <li>• Agar agar</li> <li>• Gélatine</li> <li>• Pigment</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dessiccateur</li> <li>• pH mètre</li> <li>• Agitateur magnétique</li> <li>• Plaque chauffante</li> <li>• Appareil de Soxhlet (huber minichiller)</li> <li>• Rote à vapeur (Ika hb 10)</li> <li>• Bec bunsen</li> <li>• Maillet</li> <li>• Ciseaux</li> <li>• Poinçon</li> <li>• Becher</li> <li>• Éprouvettes</li> <li>• Micropipette</li> <li>• Écouvillons, Tubes à essai</li> <li>• Pipettes pasteur</li> <li>• Centrifugeuse</li> <li>• Membrane de dialyse spectrapor, Fil alimentaire</li> <li>• Spectrophotomètre UV-visible (shimadzu UV)</li> <li>• Bocaux de conditionnement stériles</li> <li>• Lames de bistouris stériles</li> <li>• Seringues à insuline</li> <li>• Coton, Pince</li> <li>• Chalumeau, poinçon</li> <li>• Pansements stériles</li> <li>• Paire de ciseaux</li> <li>• Papier aluminium, Papier cuisson</li> <li>• Film alimentaire, Boites de pétries</li> <li>• Anesthésie (Thiopental)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide acétique</li> <li>• Milieu de culture gélosé Tergitole</li> <li>• Chapman</li> </ul>	
---	---	--

## II.2. Echantillonnage

Diverses ressources marines, telles que les carapaces de crevettes, les peaux de sole, de raie ont fait l'objet de cette étude. La collecte de la matière première a été effectuée, en février 2022, aux niveaux des pêcheries, des ports de pêche et des restaurants. Quant aux Coquilles de seiches, d'huitres creuses, de moules et de pelures d'oignon proviennent de la ferme aquacole « Cultmare ».

## II.3. Production et caractérisation du chitosane

### II.3.1. Identification des espèces de crevettes collectées

L'identification des espèces échantillonnées 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.3.2. Prétraitement des carapaces de crevettes

Le prétraitement des carapaces de crustacés commence par un rinçage à l'eau claire afin d'éliminer les résidus de sang, d'épiphytes et de sable. Ensuite, un deuxième rinçage est effectué à l'eau distillée. Les carapaces sont ensuite séchées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Elles sont ensuite broyées 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 son utilisation.

### II.3.3. Détermination de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes

La détermination de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes a été réalisée au laboratoire LBCM 2 de l'ENSSMAL.

#### II.3.3.1. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau a été effectuée en utilisant la méthode de référence (**AOAC, 1980**). Elle est basée sur le calcul de la perte de masse due au séchage de la poudre dans une étuve à 105°C pendant 24 heures, jusqu'à ce que le poids se stabilise. Le résultat obtenu est exprimé en pourcentage.

#### Mode opératoire

Les creusets vides ont été pesés et leur poids initial (M0) a été noté ; puis 2g de chaque échantillon sec a été pesé et le poids de l'ensemble creuset + échantillon a été pesé et noté (M1).

Les échantillons ont été placés dans une étuve à 105°C jusqu'à ce que leur poids se stabilise (pendant 24h), les échantillons secs ont été laissés dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement et le poids final des échantillons secs a été noté (M2). Enfin, la teneur en eau a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau H\%} = \frac{M1 - M2}{M1 - M0} \times 100$$

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.3.3.2. Détermination de la teneur totales en matière minérale

La teneur en matière minérale a été déterminée en utilisant une méthode référentielle sur des échantillons secs qui ont été préalablement étuvés à 105°C pendant 24h. La méthode implique

l'incinération des échantillons dans un four à moufle à 600°C pendant 4h, (AOAC, 1990) jusqu'à ce que les cendres soient complètement blanchies.

### Mode opératoire

Le creuset vide a été pesé et noté (M0), puis une quantité de 2g de poudre de crevettes séchées préalablement à 105°C pendant 24h a été pesée et noté (M1) après a été placé dans le four à moufle à 600°C pendant 4h.

Après les 4h le creuset a été retiré et placé dans un dessiccateur puis a été pesé pour déterminer la masse des cendres après refroidissement et noté (M2).

La teneur en matière minérale est calculée en utilisant la formule suivante :

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

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.3.3.3. Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Biuret modifiée et optimisée, C'est un dosage colorimétrique, les liaisons peptidiques réagissent avec les ions cuivriques (provenant du sulfate de cuivre, un réactif de la réaction) et forment un complexe de coloration bleu-violacée en milieu alcalin.

### Mode opératoire

- Préparer une série de tubes énumérés ;
- Préparer une solution mère de BSA à 1 % ;
- Dissoudre l'échantillon (1g poudre de carapaces de crevettes) dans un volume déterminé d'eau distillée ;
- Ajouter dans les tubes de la gamme étalon des volumes graduels de solution de BSA ;
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à volume final soit constant et bien mélanger ;
- Ajouter 1 ml de solution de NAOH ;
- Ajouter un volume déterminé du réactif de Biuret ;
- Incuber à température ambiante de 30 à 90min ;
- Prélever une partie de la solution contenue dans les tubes à essais afin de remplir la cuve aux trois quarts ;
- Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde de 545 nm.
-

## Lecture

Les valeurs obtenues permettent de tracer la courbe d'étalonnage des absorbances en fonction des concentrations en protéines,  $A = f[\text{protéines}]$ . Cette dernière permet la détermination de la teneur totale en protéines des carapaces de crevettes étudiées.

### II.3.3.4. Détermination de la teneur en lipides totaux

Les lipides totaux sont extraits à l'aide de la méthode de Soxhlet, qui est une méthode gravimétrique ou l'échantillon est introduit dans une cartouche de cellulose, puis l'extraction est réalisée en continu en utilisant de l'éther diéthylique bouillant à une température de 35°C. (El Houda, 2017)

Au cours du processus, l'éther diéthylique dissout progressivement les matières grasses présentes dans l'échantillon. Le solvant chargé en matières grasses retourne ensuite dans le ballon par des déversements successifs. Étant donné que seul le solvant peut s'évaporer, les matières grasses s'accumulent dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète.

Une fois l'extraction terminée, l'éther diéthylique est éliminé à l'aide du rota-vapeur et la matière grasse est récupérée dans le ballon séché qui est pesé (Sahoré et Abouattier, 2016).

#### Mode opératoire

Mettre en marche le réfrigérant à 2°C, puis peser un ballon vide et noter (P0).

Peser 2g de poudre de carapaces de crevettes dans une cartouche de cellulose ensuite placer le dans la chambre d'extraction

Prévoir un échantillon blanc contenant uniquement le solvant (pour confirmer l'absence de composés lipidiques ou d'impuretés).

Ajouter 160 ml d'éther éthylique puis chauffer le ballon à 60°C et laisser l'extraction se dérouler pendant 4 heures.

Une fois le temps écoulé, placer le ballon dans un rota-vapeur à 60°C pour concentrer les lipides tout en éliminant le solvant.

Peser le ballon contenant les lipides et le noté (P1).

La teneur en lipides est calculée 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 contenant l'échantillon après passage au rota-vapeur

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

### II.3.4. Extraction de la chitine et du chitosane

La chitine est le deuxième polymère naturel le plus important au monde, les principales sources exploitées sont deux crustacés marins, la crevette et le crabe (Truong *et al.*, 2007). Le chitosane est dérivé de la chitine. Sa morphologie à l'état solide natif, les méthodes d'extraction, d'identification et de caractérisation ainsi que ces applications sont étudiées.

Dans cette étude, la méthode d'extraction est chimique et a été mise au point après une synthèse de ce qui est décrit dans la littérature, elle comprend les étapes suivantes :

- Dépigmentation et délipidation
- Déminéralisation
- Déprotéinisation et désacétylation

Un protocole d'extraction du chitosane à partir des carapaces de crustacés est mise en point par Haddab et Kortbi (2020) ; Guesmi et Hennous (2021). Et est schématisé comme suit :

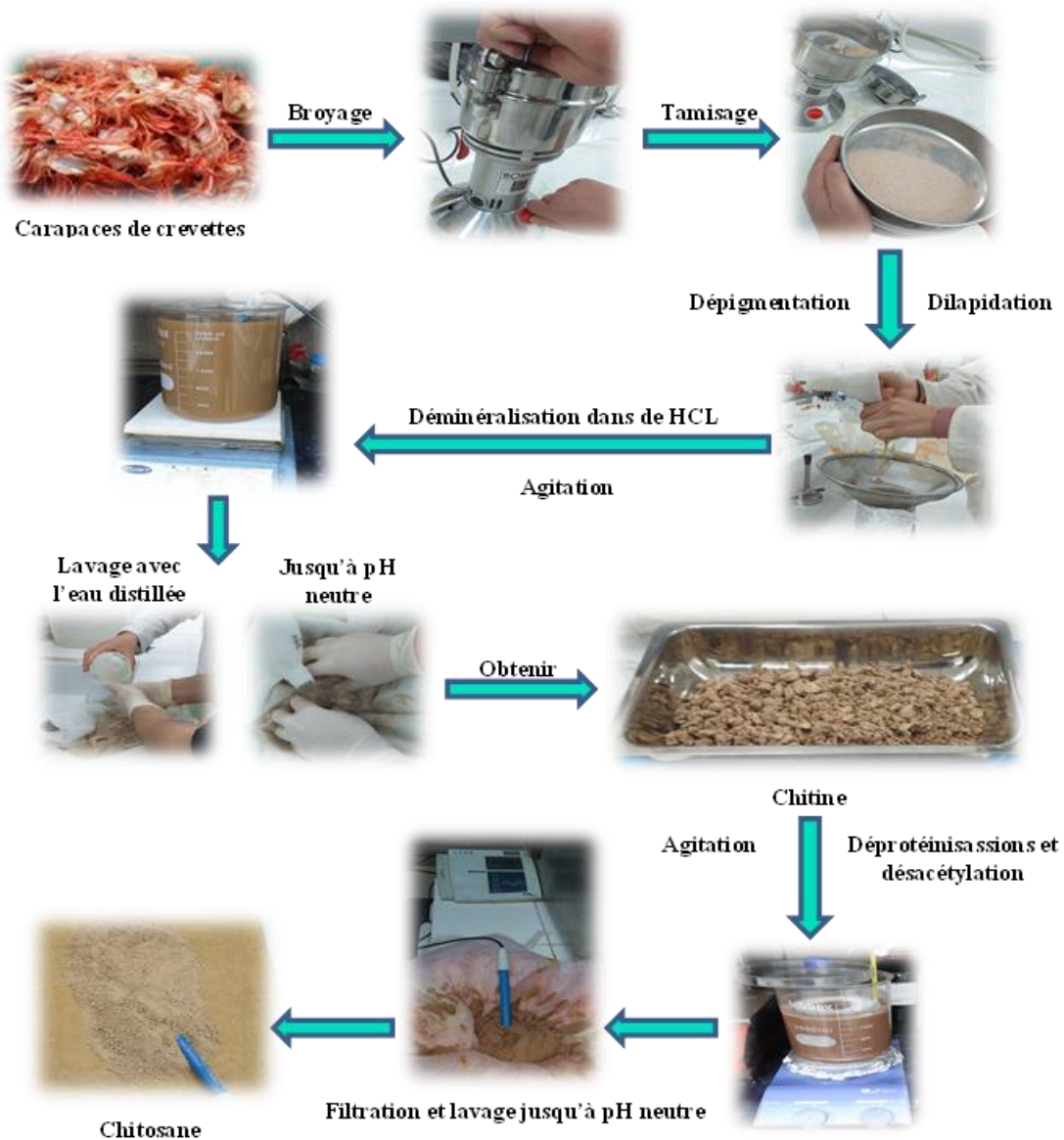


Figure II-1 Schéma général d'extraction du chitosane

### II.3.5. Caractérisation du chitosane produit

#### II.3.5.1. Le rendement massique

Le chitosane est obtenu à partir de la chitine par l'élimination des groupes acétyles présents. Le rendement massique de cette conversion peut être calculé en utilisant la formule mentionnée par SAHNOUNE et OULD RABAH (2022) en suivant la formule ci-dessous :

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

Avec : **Mi** : la masse initiale de poudre de crevette en g

**Mf** : la masse finale de chitosane en g

#### II.3.5.2. Test de solubilité

Une quantité de 0.1 g de chitosane en poudre est dissoute dans 10 ml d'une solution d'acide acétique (1%) sous agitation constante pendant 3H à température ambiante jusqu'à ce qu'elle se dissolve complètement (Fernandez-Kim, 2004). Contrairement à la chitine, qui est insoluble dans l'acide acétique à 1% en raison de l'absence de groupement amine et/ou d'un faible degré de désacétylation.

#### II.3.5.3. Calcul du degré de déminéralisation

Le degré de déminéralisation se réfère à la quantité de minéraux qui ont été éliminés du chitosane. Le degré de déminéralisation est calculé suivant la formule ci-après : (Rao et al., 2000)

$$DM = \frac{(AO M0) - (Ar Mr)}{(AO M0)} \times 100$$

Avec : Mo et Mr sont 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 ci-dessus.

#### II.3.5.4. Calcul du degré de déprotéinisation

Le degré de déprotéinisation est déterminé à l'aide de la formule établie par Rao et al. (2000), qui sert à évaluer l'efficacité du traitement de déprotéinisation:

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

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 méthode de Biuret, décrite précédemment, est utilisée pour déterminer la teneur en protéines.

### II.3.5.5. Détermination de la viscosité

L'analyse de la viscosité a été effectuée au niveau du laboratoire CRAPC de BouIsmaïl. La viscosité dynamique et cinématique du chitosane est déterminée à l'aide d'un viscosimètre de la marque AntonPaar 445 inside SVM3001 Autosampler: Xsample 530. Le Chitosane a été mis en solution dans de l'acide acétique à (1%), et une gamme de solutions de chitosane à différentes concentration a été préparée.

Le principe est de placer le liquide à étudier entre deux cylindres coaxiaux (l'un mobile, l'autre fixe).

Lorsque le cylindre mobile est entraîné en rotation, il se crée un gradient de vitesses à l'intérieur du fluide, proportionnel à la vitesse de rotation. Le fluide exerce alors une contrainte sur le cylindre mobile en lui imposant une certaine résistance, directement mesurée par un capteur. (MEYER, 2018).

### II.3.5.6. Calcule du degré de désacétylation

#### a. FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)

##### Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique utilisée en chimie analytique. Elle est considérée comme un outil analytique rapide, non destructif, puissant qui permet d'étudier la structure et la composition chimique de petites molécules (Abidi, 2021). Elle est liée à la vibration des liaisons interatomiques. Elle consiste à irradier l'échantillon avec un rayonnement infrarouge. Lorsque la fréquence du rayonnement correspond à une fréquence de vibration des molécules exposées, il se produit un phénomène d'absorption. Il en résulte un pic d'absorption sur le spectre d'absorbance (Ahmed Hared, 2007).

##### Mode opératoire

1 mg de poudre de chitosane séché est mélangé avec 130 mg de KBr (Bromure de potassium). Le mélange est comprimé en un disque de KBr (8 tonnes pendant 5 minutes). La résolution spectrale est de  $4 \text{ cm}^{-1}$  (Sari-Chmayssem, et al., 2015). Le degré de désacétylation du chitosane a été déterminé par la formule suivante (Brugnerotto, et al., 2001) :

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 \cdot DA$$

Avec  $DA = 100 - DDA$

$A_{1320}$  : l'absorbance au nombre d'onde  $1320 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à l'amide III.

$A_{1420}$  : l'absorbance au nombre d'onde  $1420 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à la déformation symétrique de  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$ .

$DA$  : Degré d'acétylation.

#### b. Résonance magnétique nucléaire RMN

## Principe

La RMN 1H peut être utilisée pour identifier le chitosane via un déplacement chimique particulier des protons. Elle ne nécessite pas de courbe d'étalonnage ni de standards et n'est pas affectée par la teneur en eau. Cette technique, permet de déterminer la structure d'une molécule organique mettant en jeu les atomes d'hydrogène. En exposant l'échantillon à un champ magnétique, les atomes d'hydrogène s'excitent et puis retournent à l'état initial tout en apparaissant sous forme de pics sur un graphique (spectre). L'analyse du spectre obtenu par RMN permet de déterminer avec précision le DD du chitosane (LE DEVEDEC, 2008, BUSCHMANN et al., 2013).

## Mode opératoire

- Préparer une solution de 5 mg du chitosane dans 600 µl d'oxyde de deutérium (D2O) et chauffer jusqu'à obtention d'une solution homogène.

- Soumettre l'échantillon à un champ magnétique dans un appareil BRUKER de 400MHz à 70°C

Lecture Le DD est évalué à partir de l'intégration des intensités des pics correspondant au groupement méthyle de la N-acétylglucosamine et de celle des protons H2 à H6 du cycle glucosidique selon l'équation :

$$DD\% = 1 - \frac{\frac{1}{3} \times I_{HAc}}{\frac{1}{6} \times I(H2 - H6)} \times 100$$

Où : I<sub>HAc</sub> est l'intensité intégrale de du pic correspondant aux protons du groupement acétyle (CH<sub>3</sub>) ; I (H<sub>2</sub>-H<sub>6</sub>) est la somme des intensités intégrées des protons H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub> (VO, 2013).

## II.4. Préparation et caractérisation des poudres des bivalves et de seiches

### II.4.1. Prétraitement

Le prétraitement des coquilles des bivalves et des os de seiche comprend les étapes suivantes.

#### Nettoyage

- Rincez soigneusement les coquilles des bivalves et de seiches à l'eau froide puis à l'eau distillée pour éliminer toute saleté, épiphytes ou impureté présente à leur surface.

#### Séchage

- Étalez les coquilles des bivalves et de seiches sur une grille ou une surface propre.
- Laissez-les sécher à l'air libre dans un endroit bien aéré.

#### Broyage

- Utilisez un mortier et un mixeur pour broyer les coquilles des bivalves et de seiches séchées en une poudre fine.

### Tamissage

- Tamiser les poudres obtenues à travers un tamis dont le diamètre des mailles est de 200 micromètres.

### Stockage

- Transférez la poudre de bivalves et de seiches dans des boîtes propres, secs.
- Conservez la poudre dans un endroit sec, à l'abri de l'humidité et de la lumière directe du soleil.
- Étiquetez clairement les boîtes avec le nom de l'échantillon et la date de préparation.

## II.4.2. Caractérisation des poudres des coquilles des bivalves et de seiches

### II.4.2.1. La teneur en matière minérale

Les poudres des coquilles des bivalves et de seiches, séchées préalablement à 105°C pendant 24h, ont été incinérées au four à moufle comme décrit précédemment (AOAC, 1990).

La teneur en matière minérale de chaque poudre est calculée en utilisant la formule suivante :

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

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



**Figure II-2** Les cendres des poudres de bivalves et de seiches après incinération dans four à moufle

### II.4.2.2. La teneur en carbonate de calcium

#### Principe

Le dosage du carbonate de calcium est basé sur l'attaque par l'acide chlorhydrique (HCl) dilué d'un échantillon d'une masse donnée à pression et température standard (Figure II-3). Le volume de CO<sub>2</sub> est mesuré dans un tube manométrique après attaque de l'échantillon à l'acide chlorhydrique (HCl) suivant la réaction suivante :  $\text{CaCO}_3 + 2 \text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$

L'eau saturée en sel est utilisée pour éviter la perte de CO<sub>2</sub> qui réagit avec les molécules d'eau selon la réaction suivante :  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  (DEWAZ et ER, 11982 ; ZERROUKI, 2022)

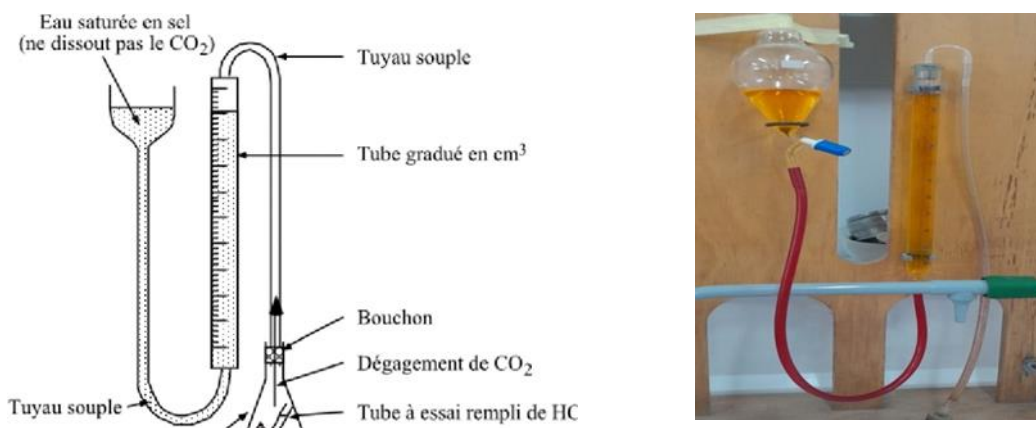


Figure II-3 Calcimètre de Bernard

#### Mode opératoire

- Préparer une solution saturée de NaCl.
- Tarer la balance puis peser 0.25g de l'échantillon broyé. Peser le carbonate de calcium pur (faire une série de pesée allant de 0.1 à 05 g).
- Remplir le tube gradué au même niveau que la solution saturée en NaCl de l'ampoule du calcimètre et noter la division correspond au v1 sur le tube gradué.
- Introduire 0.2 g de carbonate pur ou 0.25 g de l'échantillon (poudre de bivalves ou de coquille de seiche) à étudier dans l'erenmeyer.
- Remplir un petit tube avec de l'acide chlorhydrique (HCl 4M) et l'introduire dans l'erenmeyer avec une pince et avec précaution pour ne pas le verser.
- Boucher l'erenmeyer avec le bouchon relié au tube gradué de calcimètre de Bernard.
- Renverser l'acide contenu dans le tube sur l'échantillon.
- Agiter de temps en temps l'erenmeyer pour activer la réaction. A la fin de l'effervescence on note la division correspond au V2 sur le tube gradué.

Le volume de CO<sub>2</sub> dégagé est la différence des volumes V2-V1.

#### Lecture des résultats

La correction du volume de CO<sub>2</sub> (V) par rapport à la température est donnée par l'équation suivante :

$$V_0 = \frac{V}{(1+\alpha t)}$$

Avec : V<sub>0</sub> : volume à 0°C

V : volume à température T

α : coefficient de correction 1/273

T : température ambiante

Masse des carbonates de calcium (g) : M= 0.00045.V<sub>0</sub>

Teneur en CaCO<sub>3</sub> (%) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{CaCO}_3 (\%) = \frac{M_{\text{CaCO}_3}}{M_T} \times 100$$

Avec : M CaCO<sub>3</sub> = masse totale des carbonates de calcium (g)

M masse totale de l'échantillon (g)

## II.5. Extraction du collagène

### II.5.1. Traitement des peaux

Les peaux ont été lavées avec de l'eau du robinet pour éliminer toute trace de sang. Ensuite, la chair collée a été enlevée à l'aide d'un bistouri et de ciseaux. D'autres rinçages sont effectués pour éliminer toute trace de chair, suivi d'un dernier rinçage avec eau distillée à pH neutre. Enfin, les peaux ont été mises à sécher à une température de 35°C pendant 48 heures. Une fois complètement sèches, les peaux ont été découpées à l'aide d'une paire de ciseaux, puis broyées dans un mixeur.



Figure II-4 Peaux de poissons découpées avec des ciseaux



**Figure II-5** Peaux de poissons Broyée avec un mixeur

### **II.5.2. Méthode d'extraction du collagène marin**

Dans ce travail, le collagène a été extrait à l'acide une méthode modifiée basée sur celle décrite par SAHNOUN Alicia et OULD RABAH Yasmine Djouher (2022).

Un protocole d'extraction du collagène à partir des peaux des poissons est schématisé comme suit :



Figure II-6 Diagramme général d'extraction du collagène

### II.5.3. Caractérisation du collagène produit

#### II.5.3.1. Test de biuret

Dans ce travail, une méthode de dosage colorimétrique des protéines a été utilisée, basée sur la formation d'un complexe entre les ions cuivre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et les protéines. Cette réaction se produit dans un milieu alcalin. Si la couleur devient violette, le test est considéré comme positif, indiquant

la présence de protéines. En revanche, si la couleur reste bleue, le test est négatif, ce qui signifie qu'il n'y a pas ou il y a très peu de protéines détectées (Lablack, 2012).

### Mode opératoire

Dans un petit bécher, le collagène extrait (0,5 ml) est introduit, suivi de l'ajout de 3 à 4 gouttes de NaOH. Ensuite, des gouttes de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) sont ajoutées au mélange. Cela conduit à la formation d'un mélange violet en présence de protéines. Le résultat est ensuite comparé à un témoin positif contenant la protéine de référence BSA, ainsi qu'à un témoin négatif contenant de l'eau distillée.

### II.5.3.2. Test à la xanthoprotéine

#### Principe

Le test xanthoprotéique est une méthode biochimique utilisée pour caractériser et identifier les acides aminés contenant des groupes phénoliques ou indoliques. L'acide aminé principalement ciblé est le tryptophane, qui est présent en concentration élevée dans le collagène.

Ce test repose sur l'identification de la présence de cycles benzéniques activés lorsqu'on chauffe la protéine avec de l'acide nitrique concentré ( $\text{HNO}_3$ ). Sous l'effet de cette réaction de nitration, un produit de couleur jaune se forme. Après l'addition d'une solution alcaline, le précipité devient orange en raison de la formation d'un sel (Lablack, 2012).

#### Mode opératoire

- Dans un tube à essai, 1 ml de la solution de collagène est placé. Ensuite, 3 gouttes d'acide nitrique concentré ( $\text{HNO}_3$ ) sont ajoutées. Le tube est chauffé à ébullition à l'aide d'une pince sur un bec Bunsen jusqu'à ce qu'un précipité blanc de collagène dénaturé se forme. Ensuite, 2 gouttes d'ammoniaque sont ajoutées. Après l'addition de l'ammoniaque, le précipité change de couleur et devient jaune orangé.

### II.5.3.3. Rendement massique du collagène marin

Rendement massique du collagène marin est calculé suivant la formule ci-dessous :

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

Avec : **Mi (initiale)** : la masse de peaux de poissons en g

**Mf (finale)** : la masse du collagène lyophilisé en g

### II.5.3.4. Détermination du poids moléculaire du collagène marin par SDS PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique de séparation des protéines basée sur leur taille à l'aide d'un gel de polyacrylamide et du dodécylsulfate de sodium la méthode réalisée est selon **Laemmli (1970)**

#### Principe de SDS-PAGE

Le principe de l'électrophorèse SDS-PAGE repose sur l'utilisation du dodécylsulfate de sodium (SDS) pour dénaturer les protéines et les charger négativement. Le SDS est un tensioactif qui se fixe aux protéines et les solubilise en se liant à leurs régions hydrophobes.

Les protéines ainsi dénaturées et chargées négativement migrent dans un gel de polyacrylamide lorsqu'un champ électrique est appliqué.

Le gel de polyacrylamide est préparé avec une concentration adaptée pour permettre la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. La concentration en acrylamide et le rapport acrylamide/bis-acrylamide déterminent la porosité du gel, ce qui permet de cibler la gamme de poids moléculaire des protéines à séparer. Un gel dense est utilisé pour séparer les protéines de faible poids moléculaire, tandis qu'un gel plus lâche est utilisé pour les protéines de haut poids moléculaire.

Pour garantir des conditions de dénaturation totale, un réducteur de pont disulfure, tel que le  $\beta$ -mercaptoéthanol, est ajouté à l'échantillon, suivi d'une chauffe à 100°C. Cela rompt les liaisons hydrogène et les ponts disulfures des protéines, assurant ainsi leur dénaturation complète.

Lors de l'électrophorèse SDS-PAGE, les protéines chargées négativement migrent à travers le gel en fonction de leur taille. Les protéines de plus petite taille se déplacent plus rapidement et se séparent des protéines de plus grande taille. Ainsi, une séparation en fonction de la masse moléculaire apparente est obtenue.

Il est important de noter que dans le cas du collagène, à côté des chaînes  $\alpha$ , des dimères de chaînes  $\alpha$ , notés " $\beta$ ", sont également migrés dans le gel.

En utilisant cette technique, les protéines séparées peuvent être visualisées en colorant le gel, et leur taille relative peut être estimée en comparant leur migration à celle de marqueurs de poids moléculaire connus.

#### Mode opératoire

##### Préparation des plaques

- Laver soigneusement une plaque support et une plaque fine en verre avec de l'éthanol, puis les sécher.
- Installer les plaques sur le support de montage et vérifier l'étanchéité avec de l'eau déionisée.
- Remplir les plaques avec du gel de migration jusqu'à environ 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 en retournant les plaques.
- Ajouter le gel de concentration à l'aide d'une micropipette jusqu'à environ 2-3 mm du bord supérieur.

- Aspirer les bulles d'air présentes.
- Placer un peigne à 10 puits sur les plaques et laisser polymériser le gel de concentration.

### Préparation des cuves à électrophorèse

- Transférer les plaques sur le support prévu pour l'électrophorèse, en plaçant les plaques fines vers l'intérieur.
- Insérer le support dans la cuve.
- Remplir la cuve avec du tampon de migration (1X) jusqu'au ras des plaques.

### Préparation des échantillons

- Diluer les solutions de collagène dans de l'acide acétique 500 mM aux dilutions appropriées (1/2, 1/5, 1/10).
- Pour chaque échantillon, mélanger 10 µl de solution échantillon avec 10 µl de tampon échantillon (Tampon Laemmli) dans un eppendorf.
- Vortexer et centrifuger l'échantillon pendant 2 minutes à 5000 g.
- Fermer hermétiquement les eppendorfs et les placer dans un bain d'eau bouillante pendant 3 minutes.
- Ensuite, mettre les eppendorfs dans de la glace pendant 5 minutes, suivies d'une centrifugation de 2 minutes à 5000 g.

### Dépôts des échantillons

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

### Migration

- Recouvrir la cuve avec son couvercle en respectant les polarités des électrodes.
- Relier les électrodes au générateur.
- Effectuer la migration en deux temps :
  1. a. Régler le générateur sur 80 volts et le mettre en marche pour une période de 10 à 20 minutes, permettant ainsi la concentration des protéines dans une seule ligne.
  2. b. Ensuite, régler le générateur sur 160 volts pour démarrer la migration réelle.
- Arrêter la migration lorsque le front de migration (Bleu de bromophénol) est proche du bas de la plaque.

### Coloration

- Démouler les gels avec précaution.
- Placer chaque gel dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie.
- Agiter doucement les gels dans la solution de coloration pendant 1 heure pour permettre la fixation du colorant aux protéines.
- Retirer la solution de bleu de Coomassie.

### Décoloration/lavage

- Pour une décoloration rapide, prendre les gels et les placer dans une solution de décoloration rapide.
- Agiter les gels dans la solution de décoloration pendant 1 heure pour éliminer l'excès de colorant.
- Jeter la solution de décoloration devenue bleutée.

### Décolorant de conservation

- Ajouter 50 à 100 ml de décolorant de conservation aux gels.
- Agiter les gels dans le décolorant de conservation pendant 1 nuit pour éliminer davantage le colorant.
- Jeter le décolorant.

### Réhydratation

- Placer les gels dans de l'eau déionisée afin de les laver du décolorant et de leur permettre de reprendre leur taille initiale.

### Lecture

- Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique au sein du gel.
- La détermination de la masse moléculaire peut être réalisée en utilisant un marqueur de poids moléculaire de référence.
- Le rapport frontal (RF) est calculé en utilisant la relation suivante :  $RF = \text{Distance parcourue par la protéine} / \text{Distance de migration du bleu de bromophénol}$ .

## **II.6. Préparation des patchs et du gel**

Les poudres des matières premières ont été stérilisées avant toutes manipulations dans un autoclave à 120C° pendant 20min

### **II.6.1. Préparation des patchs**

Des patchs (Hydrogel physique) ont été préparés et mis au point au laboratoire LBCM2 suivant ces étapes :

#### **Mode opératoire**

- Préparation de poudre des bivalves et de seiche : des quantités équivalentes de poudre de seiche, d'huitre, de moules ont été mélangé dans une boîte stérile.
- Ensuite ce mélange de poudre des bivalves et de seiche (sources des minéraux) est ajouté pour ajuster le pH.
- Préparation de la solution chitosane : une masse M de chitosane est mise en suspension dans une solution acide acétique. Le mélange a été soigneusement agité jusqu'à homogénéisation.
- Préparation de la solution collagène : une quantité déterminée de collagène est dissoute dans une solution acide acétique sous agitation, jusqu'à ce que le mélange soit homogène.
- Préparation de la solution gélifiante : la poudre d'agar-agar a été dissoute dans de l'eau distillée. Le mélange a été chauffé jusqu'à ébullition et soigneusement agité. Lorsque le mélange est en ébullition, la poudre de gélatine est ajoutée et le mélange est continuellement agité jusqu'à ce qu'il soit homogène.

La préparation des patchs est faite suivant le diagramme ci-dessous :

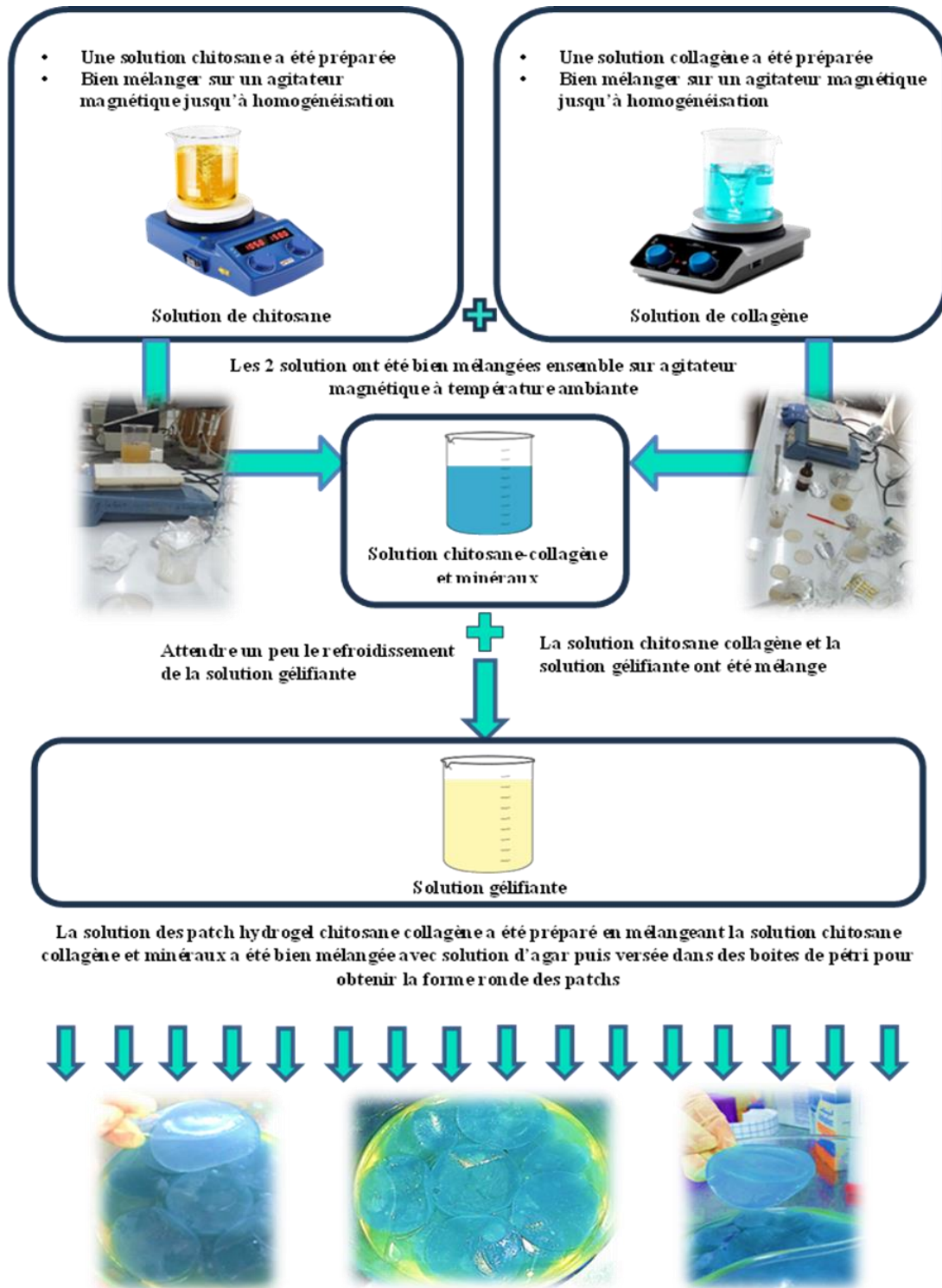


Figure II-7 Diagramme général de production des patchs-hydrogels

### II.6.2. Préparation du gel

Un gel (Hydrogel liquide) a été préparé et mis au point au laboratoire LBCM2 suivant ces étapes :

- Préparation de la solution chitosane : Tout d'abord, une solution acide acétique 10% a été préparée. Ensuite le chitosane a été dissous dans cette solution acide acétique et bien

mélangé, avec chauffage jusqu'à homogénéisation. Après homogénéisation, le mélange de poudre des bivalves et de seiche est ajouté.

- Préparation de la solution collagène
- Mélange des deux solutions chitosane –minéraux et collagène.

La préparation du gel est réalisée selon le diagramme suivant :

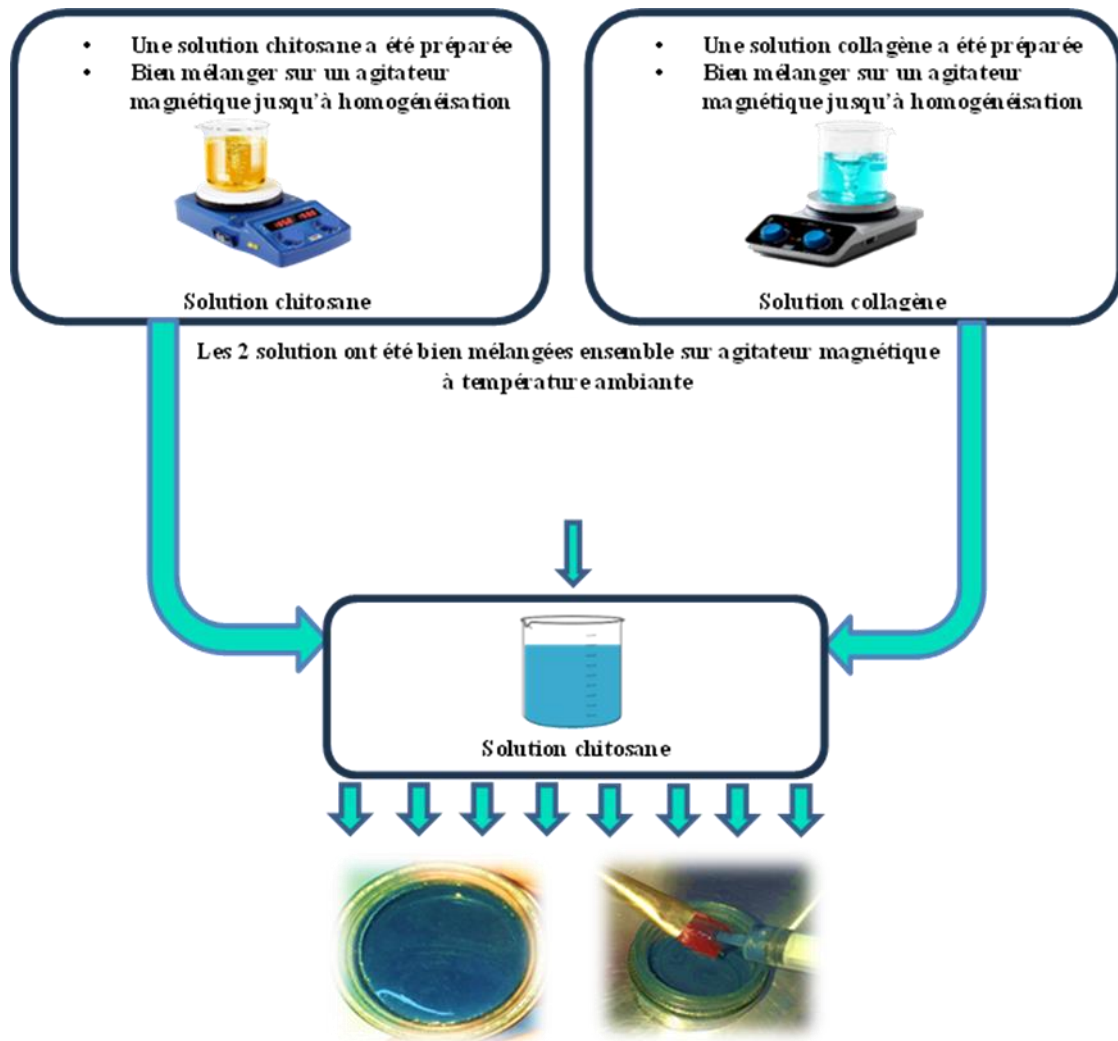


Figure II-8 Diagramme général de production du gel

### II.6.3. Détermination des propriétés pharmacologiques des patches et du gel préparés

#### II.6.3.1. Test de l'activité cicatrisante in vivo

##### Etude macroscopique

L'évaluation de l'activité cicatrisante des patches et du gel a été effectuée sur 3 lots (lot 01 : T-, lot 02 : T+ et lot 03 : Echantillon) de 4 rats mâles adultes de souche Wistar pesant entre 180g et 220g.

Le choix de limiter le nombre de rats à 4 par lot au lieu de 10 a été fait en respectant les principes des 3R établis par Russell et Burch en 1959 pour promouvoir la protection animale dans la recherche scientifique.

Les 3R se réfèrent aux initiales des directives suivantes :

- Remplacer les modèles animaux par d'autres méthodes lorsque cela est possible.
- Réduire le nombre d'animaux utilisés dans les expériences.
- Raffiner les conditions d'élevage, de soins et les méthodes utilisées lors des procédures afin de minimiser ou d'éliminer toute douleur ou souffrance.

En prenant cette décision, l'objectif était de trouver un équilibre entre la nécessité de mener l'expérience et la volonté de respecter les principes éthiques de protection animale.

### Mode opératoire

#### ➤ Anesthésie

Les rats ont été soumis à une anesthésie par injection intrapéritonéale d'une dose de Kétamine.

Dans le but de réduire les souffrances des animaux pendant l'expérience, il est essentiel de s'assurer que les rats sont inconscients lors de l'induction des brûlures. Cela a été vérifié en effectuant les tests suivants :

- Réflexe du retrait : Tirer délicatement une patte et pincer l'extrémité ; l'animal retire sa patte. Ce réflexe, qui indique si l'animal ressent ou non la douleur, doit être absent avant de commencer l'expérience.
- Efforts respiratoires : la respiration s'affaiblit et devient essentiellement abdominale.

En réalisant ces tests, on peut s'assurer que les rats sont effectivement inconscients pendant l'induction des brûlures, ce qui contribue à minimiser les souffrances animales pendant l'expérience. (Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires OSAV).



Figure II-9 Injection de l'anesthésiant Kétamile

Une fois l'animal est bien endormi la peau de la zone dorsale a été épilée à la main, en évitant les blessures.



**Figure II-10** Rats anesthésiés épilés à la main

➤ Induction des brûlures

Une brûlure thermique de troisième degré est induite en chauffant préalablement un poinçon métallique au chalumeau pendant 1 minute, puis en l'appliquant sur le dos de l'animal pendant 10 secondes. **(Chader, 2019)**

Les surfaces brûlées des rats sont traitées quotidiennement avec un gel et des patches préparées pendant une durée de 27 jours. Pendant le traitement, les lésions ont été couvertes avec des compresses stériles et fixées avec du sparadrap.

Les mesures suivantes sont mises en place pour garantir ces conditions d'asepsie :

- La paillasse été propre et le matériel désinfecté.
- Chaque rat est logé individuellement dans des cages, qui sont changées quotidiennement pour maintenir un environnement propre et pour éviter le cannibalisme.
- Les rats reçoivent une alimentation ordinaire pendant toute la durée de l'expérience.
- Température et humidité suivie quotidiennement.






**Figure II-11** Induction des brûlures et nettoyage de croûte formée

➤ Traitements

Après l'induction de la brûlure, les rats de chaque lot ont reçu quotidiennement pendant 27 jours une application topique du gel et des patchs pour le lot 01 (échantillon), du sérum salé pour le lot 02 (Témoin-) et du Madécassol pour le lot 03 (Témoin+) comme indiqué dans le Tableau II-3, Figure II-12 et Figure II-13

**Tableau II-3** Répartition et traitements des plaies chez les rats

N° de lot	Sexe et nombre des rats	Traitement	Image
Lot N° 01	4 rats males	Gel et patch (Hydrogel) Echantillon	
Lot N° 02	4 rats males	Sérum salé Témoin négatif	
Lot N° 03	4 rats males	Madecassol Témoin positif	



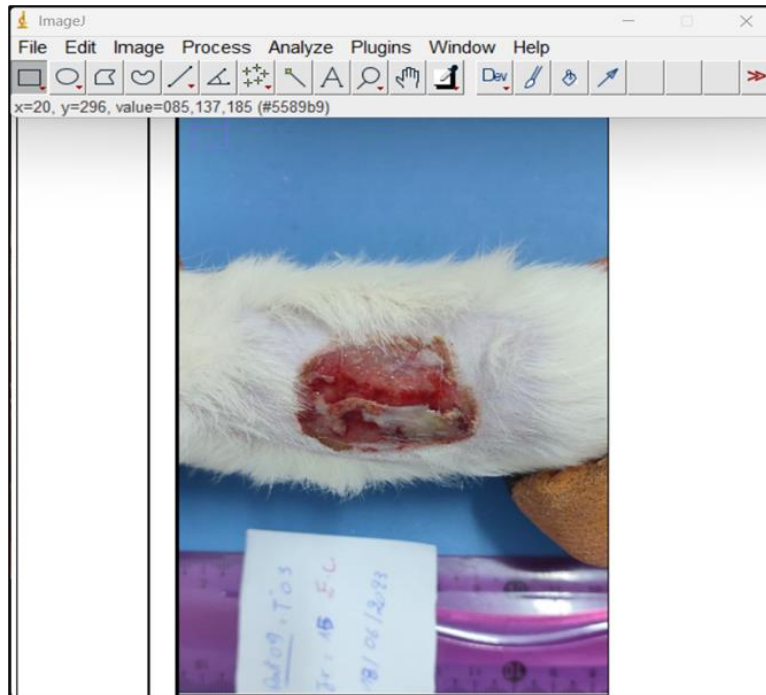
**Figure II-12** Traitement avec le gel



**Figure II-13** Traitement avec les patches

➤ Suivi des brûlures

Les brûlures ont été examinées et photographiées tous les jours dans des conditions constantes, et les surfaces ont été mesurées à l'aide du logiciel de traitement d'images Image J. (Figure II-14)



**Figure II-14** Mesure de surface brûlée avec logiciel Image J

- Calcul du pourcentage de la réduction de la surface brûlée

Le pourcentage de réduction de la surface brûlée par rapport à la surface initiale a été mesuré en utilisant la méthode décrite par Kim *et al.* (2008) en appliquant la formule suivante :

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

Avec : **Si (initiale)** : surface initiale de la brûlure (en cm<sup>2</sup>)

**Sf (finale)** : surface finale de la brûlure (en cm<sup>2</sup>)

- Analyse statistique

Une analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Excel pour les résultats obtenus. Les moyennes et les variances ont été soumises à une analyse de la variance ANOVA à un facteur. Les valeurs obtenues permettent de déterminer si les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

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

## Étude histologique

L'étude histologique par microscopie photonique est la discipline de la biologie qui consiste en lecture au microscope de coupes fines (3-5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur en moyenne) permettant l'examen des différents tissus d'un organisme. Dans le cadre de cette étude, en plus de l'étude macroscopique, l'étude histologique de la cicatrisation des brûlures des peaux de rats.

Découper une partie la peau traitée des rats suivants : rat 02 du lot traité avec le gel et les patches / rat 01 du lot traité avec du sérum salé / rat 03 du lot traité avec Madecassol / et un rat saint non brûlé. (Figure II-15)



**Figure II-15** Echantillonnage des peaux des rats

-Fixation : Elle a pour buts de conserver le mieux possible les constituants cellulaires et de prévenir la décomposition post-mortem. La fixation est peut-être réalisée à l'aide d'agents chimiques pris isolément (éthanol, formol, acide picrique). Mettre la pièce anatomique dans un bain de formol à 4% entre 24h et 48h. (Figure II-16)



**Figure II-16** Les 04 échantillons dans du formol à 4%

□ L'inclusion donne aux pièces la consistance nécessaire à leur débitage en coupes sans déformer l'architecture cellulaire. La substance utilisée dans le cas présent est la paraffine. L'ensemble du

- Déshydratation, éclaircissement et imprégnation :

- Un bain d'alcool à 70° pendant 20 minutes.
- Deux bains d'alcool à 90° pendant 20 minutes chacun.
- Trois bains d'alcool à 100° pendant 20 minutes chacun.
- Trois bains de xylène pendant 10 minutes chacun.
- Un bain de paraffine à 56°C pendant 1 heure.
- Un bain de paraffine à 56°C pendant 24 heures.

- Inclusion et formation des blocs (utilisation de cassettes et de barres de Leuckart).

- Réalisation de coupes de tissus de 3 à 5 µm sur une lame gélatinée.

- Déparaffinage et réhydratation :

- Bain de xylène pendant 2 minutes.
- Bains d'alcool à 100°, 90° et 70° pendant 2 minutes chacun.
- Lavage à l'eau courante.

- Coloration :

- Bain d'hématoxyline pendant 5 minutes.
- Bain d'éosine pendant 2 minutes et 30 secondes.

- Redéshydratation :

- Bains d'alcool à 70°, 90° et 100° pendant 2 minutes chacun.
- Bains de xylène pendant 1 minute chacun.

- Montage entre lame et lamelle avec la résine Eukitt.

- Observation microscopique.

➤ Préparation de l'eau gélatinée :

- Dissoudre 0,4 g de gélatine dans 100 ml d'eau distillée.
- Ajouter 1 grain de thymol à la solution.
- Coloration topographique : Hématoxyline-Éosine
- Préparation de solution A : Mélanger 1,6 ml d'acide sulfurique concentré avec 2 g d'alun de fer et 100 ml d'eau distillée. Solution B : Dissoudre 1 g d'hématoxyline dans 100 ml d'alcool à 100%.
- Mélanger les solutions A et B et incubé pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité.
- Filtrer la solution.

- Préparation du Colorant acide : Éosine
- Préparer une solution aqueuse d'éosine à 1% en dissolvant 1 g d'éosine dans 100 ml d'eau distillée.

## Chapitre III. **Résultats et discussion**

### III.1. Production et caractérisation du chitosane produit

#### III.1.1. Identification des espèces de crevettes

L'identification des espèces de crustacés repose sur divers critères distinctifs décrits dans la fiche FAO (Fischer, 1987). En ce qui concerne les crevettes, on tient compte de la morphologie du rostre et du telson. Les espèces qui ont été identifiées sont présentées dans la Figure III-1



A : *Aristeus antennatus* (crevette rouge)



B : *Parapenaeus longirostris* (crevette rose)

**Figure III-1** Espèces de crevettes identifiées (A et B).

La crevette rouge se distingue par sa coloration rouge vif. Elle présente généralement des bandes ou des motifs noirs sur son corps. La crevette rose est plus pâle en couleur, généralement rose pâle à rose orangé. Elle est souvent plus petite que la crevette rouge. La différence entre la crevette rouge et la crevette rose ne se limite pas uniquement à la couleur. Bien que la couleur soit un élément distinctif, il existe d'autres différences entre ces deux espèces de crevettes (taille et apparence générale).

#### III.1.2. Composition biochimique globale des coproduits de crevettes

La composition chimique globale des carapaces des espèces de crevettes *Parapenaeus longirostris* et *Aristeus antennatus* collectées a été déterminée et comparée aux études antérieures qui ont porté sur les mêmes espèces. (Figure III-2)

**Tableau III-1** Données comparatives de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes

Teneurs (%) /MS	Présente étude	Sahnoun et Ouldrabeh (2022)	Guesmi et Hennous, (2021)	Haddab et Kortbi, (2020)	Kefil, (2020)
Teneurs en eau (%)	16.37± 0.07	19.38	11.57	14.61	10.5
Teneur en minéraux (%)	38.63± 0.45	49.75	39.88	37.49	32.6
Teneur en protéines (%)	9.2± 1.01	9.9	8.3	28.96	24.26
Teneur en lipides (%)	6.19± 1.04	6	11.04	6.99	8.7

### III.1.2.1. Taux d'humidité (teneur en eau)

Selon le Tableau III-1, la teneur en eau du mélange des coproduits de crevettes *Parapenaeus longirostris* et *Aristeus antennatus* est de 16.37% du poids sec. Cette valeur est inférieure à la teneur en eau mentionnées par Sahnoun et Ouledrabe (2022) qui est de (19,38%), mais supérieure à celle de Haddab et Kortbi (2020) (14,61%) et de Kefil (2020) (10,5%) pour les mêmes espèces. De plus, elle est également supérieure au pourcentage d'humidité relevé par Guesmi et Hennous (2021) (11,57%) qui ont travaillé spécifiquement sur la crevette rose (*Parapenaeus longirostris*). Ceci est probablement dû aux différentes méthodes de séchage employées, pour certain le séchage adopté est le séchage à l'air libre pour d'autre il s'agit d'un séchage ventilé et dans le présent travail, nous avons opté pour le séchage à l'air libre et dans une étuve à 70° C.

### III.1.2.2. Teneur en matières minérale

La teneur en matière minérale du mélange des coproduits de crevettes est de 38.63% qui est inférieur à celle de Sahnoun et Ouled rabe (2022) qui est de 49.63% et Guesmi et Hennous (2021) qui été de 39,88%, toute fois elle reste supérieure à toutes les autres valeurs enregistrées par, Kortbi (2020) ont rapporté une teneur de 37,49%, Kefil (2020) a trouvé une teneur de 32,26%. Les carapces des crustacés sont riches en minéraux et en carbonates de calcium. Néanmoins, les taux des cendres varient en fonction des saisons et des zones et l'habitat des crustacés.

### III.1.2.3. Teneur totale en lipides

Les carapces de crevettes présentent une faible teneur en composés lipidiques, comme indiqué dans le Tableau III-1 La valeur obtenue est de 6.19% concorde avec celle relevée par Sahnoun et Ouledrabe (2022) (6%) et Haddab et Kortbi (2020) (6,99%). Cependant, elle est inférieure à celle rapportée par Guesmi et Hennous (2021), qui était de 11,04% et Kefil (2020) (8.7%).

### III.1.2.4. Teneur en protéine

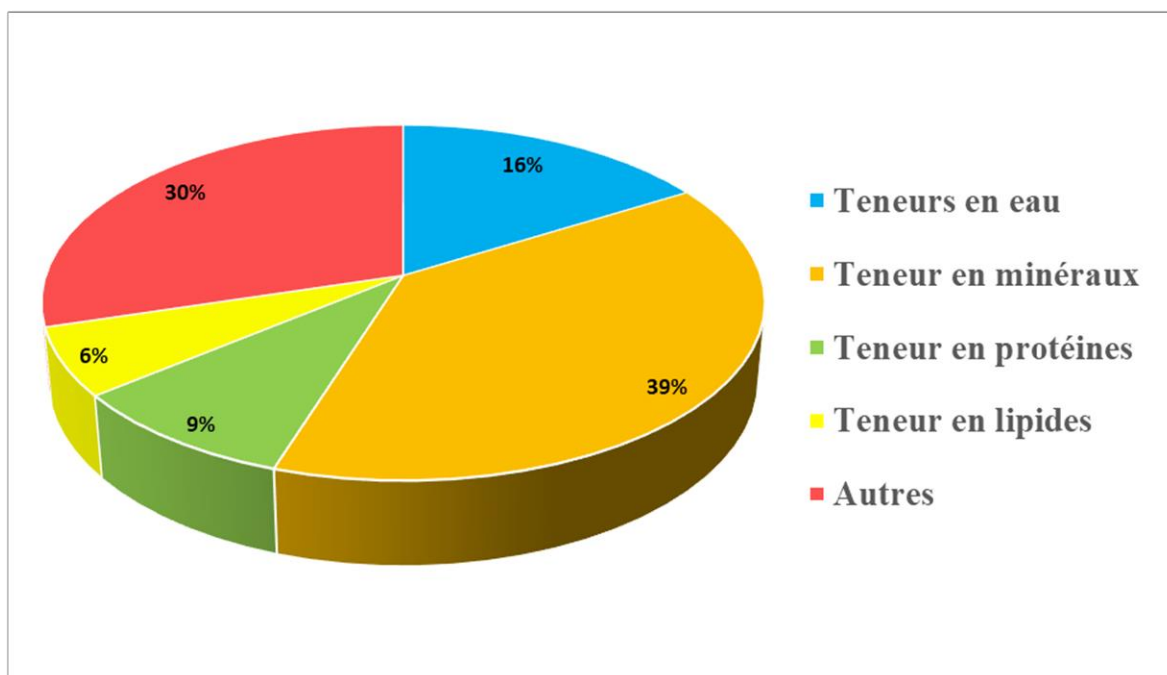
La teneur en protéines de l'échantillon est de 9.2% qui est entre celle de Guesmi et Hennous (2021) (8,3%) et à celle de Sahnoun et Ouledrabe (2022) (9,9%). Cependant, elle représente moins du tiers des taux rapportés par Haddab et Kortbi (2020) (28,96%) et Kefil (2020) (24,26%).

Une possible explication de cette importante différence réside probablement dans la décortication et le bon nettoyage des carapces des crevettes. Lors du processus de nettoyage, toute la chair adhérent à la carapace et au telson a été soigneusement extraite dans le but de faciliter et d'optimiser l'étape de déprotéinisation.

La composition biochimique globale des coproduits de crustacés, comme les crevettes, peut varier en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge, des saisons et des conditions environnementales. Ces variations peuvent également se produire au sein d'un même individu. Les crevettes muent régulièrement pour se débarrasser de leur ancien exosquelette et en développer un nouveau, ce qui

peut contribuer à la variabilité observée dans les teneurs en protéines, lipides et minéraux dans les différents travaux.

Dans le cadre de cette étude, il a été constaté que les coproduits de crevettes, résultant du mélange des deux espèces, présentaient des quantités significatives de cendres (minéraux), suivies de protéines et de lipides-pigments. La fraction restante serait probablement constituée de chitine, un composant caractéristique 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.1.3. Caractérisation du chitosane produit

#### III.1.3.1. Rendement massique

Le rendement massique du chitosane produit est consigné dans le Tableau III-2 et la Figure III-3.

**Tableau III-2** Rendement massique du chitosane obtenu à partir des coproduits de crevettes rapportés dans la littérature

	Présente d'étude (crevettes)	Sahnoun et ouledrabe, (2022)	Guesmi et Hennous, (2021)	Heddab et Kortbi, (2020)	Kefil, (2020)
Rendement d'extraction	15.16%	11.88%	11.13%	9.6%	6.84%

Le rendement massique du chitosane obtenu après les étapes de déminéralisation, déprotéinisation et désacétylation des coproduits de crevettes (*Parapenaeus longirostris* et *Aristeus antennatus*) s'élève à 15,16%. Cette valeur est supérieure à celle Sahnoun et Ouledrabe (2022) qui a été de 11,88% et celle obtenue par Guesmi et Hennous (2021) qui était de 11,13% aussi, le taux obtenu

est meilleur à ceux rapportés par Haddab et Kortbi (2020) et par Kefil (2020), qui étaient respectivement de 9,6% et 6,84%.



**Figure III-3** Pesée du chitosane produit à partir de 600 g des carapaces de crevettes

### III.1.3.2. Solubilité

Selon les observations effectuées lors du test de solubilité, le chitosane produit à partir des carapaces de crevettes se dissout parfaitement dans l'acide acétique à 1%. La solution obtenue présente une apparence translucide et une viscosité élevée, comme la montre la Figure III-4. Ces caractéristiques indiquent clairement que la désacétylation de la chitine a été réalisée avec succès.



**Figure III-4** Solubilisation du chitosane extrait de crevettes dans l'acide acétique

Le chitosane est typiquement insoluble dans l'eau et les solutions alcalines. Il est cependant, soluble dans les solutions minérales ou organiques diluées, excepté dans l'acide sulfurique et à un moindre degré dans l'acide phosphorique (**Chenite et al., 2001**). La solubilisation du chitosane dans les solutions acides est dû à la présence des groupes aminés résultant de la désacétylation de la chitine. Ces groupes aminés permettent au chitosane d'interagir avec les molécules d'acide acétique par des interactions ioniques ou polaires, ce qui le rend soluble. En revanche, la chitine,

qui ne possède pas ces groupes amino, reste insoluble dans l'acide acétique en raison des liaisons hydrogène fortes entre les chaînes de polymères de N-acétylglucosamine (Rinaudo *et al.*, 1993).

### III.1.3.3. La teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale du chitosane produit est de 4.55% inférieure à la valeur limite 5%.

### III.1.3.4. La teneur en Protéines

La teneur en protéines du chitosane produit est de 1,58%, elle est relativement faible ce qui indique une bonne déprotéinisation. Cependant, il est important de noter que la teneur en protéines peut varier en fonction des méthodes de mesure utilisées.

### III.1.3.5. Le degré de déminéralisation et de déprotéinisations

Pour évaluer l'efficacité des traitements de déminéralisation et de déprotéinisation appliqués aux coproduits de crevettes, nous avons mesuré la teneur en protéines et la teneur en matière minérale du chitosane produit. Les résultats sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau III-3** Le degré de déminéralisation et de déprotéinisation

	Le chitosane produit
DM (%)	98.6
DP (%)	97

L'attaque acide appliquée à la poudre de crevettes a entraîné une déminéralisation d'environ (**98,6%**), un taux nettement supérieur à celui rapporté précédemment par Sahnoun et Oulderabeh (2022) qui est de 23,35%, ainsi qu'à ceux rapportés par Haddab et Kortbi 53,31% et Kefil 36%. Cependant, ce taux reste inférieur au degré de déminéralisation de 100% enregistré par Guesmi et Hennous, qui correspond à une élimination complète des matières minérales.

Par ailleurs, La déprotéinisation de la chitine en utilisant une base forte a donné un bon rendement de (**97%**). Ce pourcentage est nettement supérieur à celui rapporté précédemment par Sahnoun et Oulderabeh (2022) qui est de 18,4%, ainsi qu'à celui rapporté par Guesmi et Hennous 63,2%. Cependant, il reste inférieur à celui rapporté par Haddab et Kortbi (2020) 100%. Il est à noter que le degré de déprotéinisation dépend de la concentration en NaOH utilisée et de la température du traitement.

### III.1.3.6. Degré de déacétylation du chitosane extrait

Le degré de désacétylation du chitosane produit a été déterminé par spectroscopie FTIR et par RMN 1H.

#### a. FTIR

La spectroscopie FTIR a été effectuée dans une gamme de fréquences de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  sur des pastilles de KBr contenant le chitosane produit. Les résultats de la caractérisation révèlent une série de pics d'absorption qui sont représentés dans la figure ci-dessous :

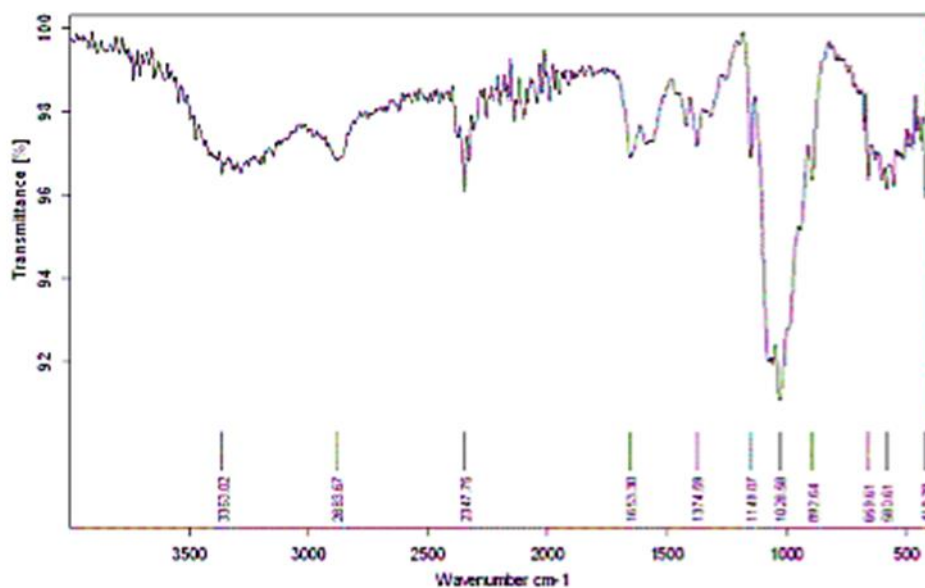


Figure III-5 Spectre FTIR du chitosane extrait

Le spectre obtenu par FTIR a mis en évidence les liaisons qui caractérisent le Chitosane notamment les liaisons (O-H) dans les régions 3300 et 1155  $\text{cm}^{-1}$ , les liaisons (C-H) dans les régions 2879  $\text{cm}^{-1}$ , 2922 et 2888  $\text{cm}^{-1}$ , les liaisons C=O aux pics 1660, et aussi les liaisons (N-H) dans les régions 1643, 1594  $\text{cm}^{-1}$ .

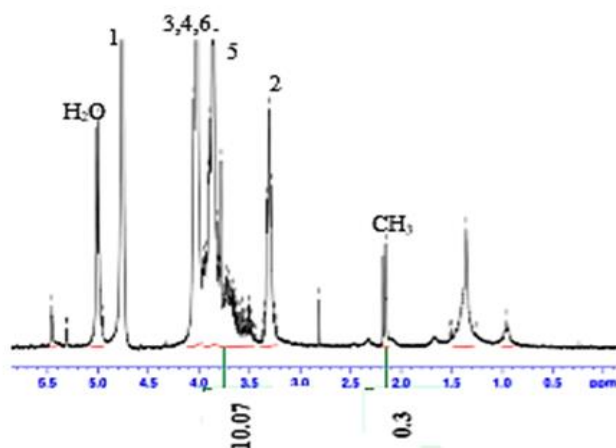
D'après le spectre FTIR, le DDA du chitosane extrait à partir des co-produits de crevettes est de 96.4 %.

Selon **Li et al. (2005)**, un DDA élevé (>70%) indique que le chitosane est de bonne qualité. En solution, la viscosité de ce polymère dépend du DD. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante (**Zemmouri, 2008**).

## b. RMN

En général, le spectre RMN  $^1\text{H}$  du chitosane montre des pics allant de 0.5 à 5 ppm (chaînes aliphatiques).

Le graphique ci-dessous (Figure III-6) révèle la présence des unités glucosamine et acétyl glucosamine qui diffèrent par les déplacements chimiques des protons liés aux carbones 1, 2 et 5. Les autres protons ont des déplacements chimiques identiques. À partir des spectres obtenus, le degré de désacétylation (DD) peut être déterminé en comparant l'intégralité du pic de résonance à 2 ppm environ, correspondant aux protons du  $\text{CH}_3$  du groupe acétyl, par rapport aux protons H2-H6 du cycle glucosidique, situés entre 3 et 4,4 ppm (VO, 2013). Le degré de désacétylation (DD) du chitosane extrait par voie chimique est de 95.01%.



**Figure III-6** Spectre RMN 1H du chitosane extrait

Le spectre de l'extrait chitosane est similaire avec ce qui décrit dans la littérature mais avec de légers décalages dans les déplacements chimiques des atomes en partie par million (ppm). Cela est vraisemblablement dû à la différence dans la concentration de l'échantillon dissout dans l'eau lourde. Cette similarité confirme que la molécule extraite est du chitosane.

Les résultats obtenus dans la présente étude ainsi que ceux des travaux antérieurs sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III-4** Degré de désacétylation du chitosane produit

DDA (%) Chitosane extrait	Présente étude	Haddab et Kortbi (2020)	Hennous et Guesmi (2021)	Khiat et Herguema (2022)
Par FTIR	96.01 %	80.31 %.	-	-
Par RMN	95.4 %	-	98.8%	94.4 %.

Le DDA du chitosane produit par Hennous et Guesmi (2021) est de 98.8%, ce résultat est largement supérieur à ceux obtenus 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 dé-acétylation et la déprotéinisation de la chitine.

Néanmoins, les valeurs de DDA du chitosane relevées par FTIR et RMN dans la présente étude, sont très proches, ce qui conforte les résultats obtenus et ce qui permet de conclure que le chitosane produit est de très bonne qualité.

### III.1.3.7. La Viscosité

La viscosité dynamique est une grandeur physique qui caractérise la résistance à l'écoulement laminaire d'un fluide incompressible. La viscosité dynamique, la viscosité cinématique ainsi que la masse volumique du chitosane produit sont reportés dans le tableau suivant. (Tableau III-5).

**Tableau III-5** Résultats des paramètres rhéologiques du chitosane produit

Paramètres	Taux
Viscosité dynamique. (mPa.s))	6,4041
Viscosité cinématique. (mm <sup>2</sup> /s)	6,4037
RDV	---
Précision de la Viscosité	Précis
Taux de Cisaillement	664,4
Force de cisaillement	4,255
Masse Volumique	1,00006
Précision de la Masse Vol.	Ultraprécis
Masse volumique	1005,10
Densité spécifique	1,0061

La viscosité du chitosane produit dépend essentiellement de la concentration, de sa masse molaire, de sa température ainsi que de son DD. Plus il est désacétylé, plus il y a des groupements amine libres et plus il est soluble, et plus sa viscosité est importante. (KASAAI, 2009).

## III.2. Caractérisation des poudres de bivalves et de seiches

### III.2.1. La teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale totale des poudres de coquilles de bivalves provenant de la ferme aquacole (*Mytilus galloprovincialis*, *Magallana gigas* précédemment *Crassostrea gigas* et *Anomia ephippium*) et des os de seiches récoltées au niveau des ports de pêche et des pêcheries (*Sepia officinalis*) est illustrée dans le tableau suivant :

**Tableau III-6** La teneur en matière minérale des poudres de bivalves et de seiches

Les poudres	Poudre de Moules <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Poudre des <i>Huitres creuses</i> <i>Magallana gigas</i>	Poudre de pelure d'oignon <i>Anomia ephippium</i>	Poudre des os de seiches <i>Sepia officinalis</i>
La teneur en matière minérale (%)	95%	86%	96%	87%

Selon le Tableau III-6, il existe des fluctuations dans la teneur en matières minérales des co-produits (coquilles et os) des mollusques ; cette variation est dûe :

- Aux variations selon les espèces
- Aux conditions environnementales et leur habitat
- Aux variations saisonnières.
- A la taille et au stade de croissance de ces espèces

### III.2.2. La teneur en carbonate de calcium

Les taux de carbonates de calcium des os de seiche et de des coquilles des huitres creuses sont consignés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III-7** Teneur en carbonates de calcium des os de seiche et de des coquilles des huitres creuses

Echantillons	Teneur en CaCO <sub>3</sub> (%)
Carbonates de calcium pur	100 %
Os de seiche (poudre)	97.9 %
Coquille des huitres creuses (poudre)	96.5 %

Au regard, du Erreur ! Source du renvoi introuvable., les résultats obtenus corroborent avec ce qui est décrit par **Cheikh Ndiaye (2007)**.

L'os de seiche est fait d'aragonite qui est une espèce minérale de la famille des carbonates de formule CaCO<sub>3</sub> avec des traces de Sr ; de Pb, de Fe, de P, de Cu et de Zn.

On retrouve également en faible quantité de la matière organique. Ses propriétés contribuent à une reminéralisation profonde de l'organisme. Elle constitue aussi la nacre et les perles d'huîtres, moules ou autres coquillages, et une partie du squelette de la plupart des coraux durs et les récifs coralliens. Cette molécule se transforme lentement en calcite. Les coquillages sont généralement formés pour moitié de calcite et pour l'autre moitié d'aragonite.

La poudre brute des coquilles est utilisée dans le traitement de dysenterie et comme apport minéral et vitaminique dans l'alimentation du bétail. (**Cheikh Ndiaye, 2007**)

La poudre de coquille d'huître renferme environ 95% de carbonate de calcium. Le carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) contient en fait 40% de calcium (Ca). Ce dernier est essentiel à la solidité des os. Les 5% restant de minéraux sont des oligo-éléments : magnésium (Mg), potassium (K), soufre (S), brome (Br), iode (I), silicium (Si), phosphore (P), fluor (F), lithium (Li), zinc (Zn), fer (Fe), cuivre (Cu), aluminium (Al), manganèse (Mn) et sodium (Na). Elle est utilisée en médecine pour atténuer ou palier à beaucoup de maux. En effet, elle est souvent incluse dans bien des remèdes de la médecine chinoise (anxiété, insomnie, épilepsie, migraine, accidents vasculaires cérébraux, palpitations, agitations nocturnes, etc. Dans certains cas, il faut calciner la coquille pour développer l'absorption d'acidité dans l'estomac (par exemple, dans le cas d'ulcères gastriques).

Ces poudres riches en minéraux sont incorporées dans les produits cosmétiques pour revitaliser et entretenir la peau. (Aquideas, 2019)

### III.3. Caractérisation du collagène extrait

#### III.3.1. Test du Biuret

Trois essais ont été réalisés pour cette expérience : un témoin négatif utilisant de l'eau distillée, un témoin positif utilisant une protéine de référence appelée BSA, et l'échantillon test contenant du collagène extrait. Les résultats obtenus ont montré la formation d'un complexe de couleur mauve entre les ions cuivre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et les liaisons covalentes présentes dans le collagène (Figure III-7). Cette observation confirme que le test est positif et indique la présence de collagène. Ces résultats concordent avec ceux précédemment rapportés par (Lablack, 2012 ; Oulhiz, 2018 et Lassoued et al., 2022).

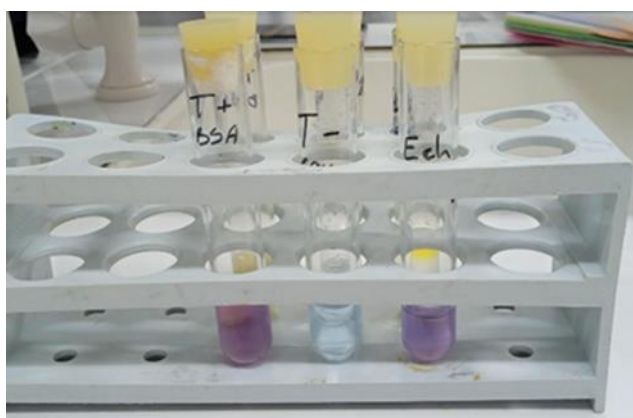


Figure III-7 Mise en évidence de la présence du collagène par la méthode du biuret

#### III.3.2. Test à la xanthoprotéine

Idem, trois essais ont été réalisés : un témoin négatif utilisant de l'eau distillée, un témoin positif utilisant une protéine de référence appelée BSA, et l'échantillon contenant du collagène extrait. Le résultat obtenu a révélé la formation d'un complexe jaune orangé, qui témoigne de la réaction de nitration lors du chauffage du collagène avec de l'acide nitrique concentré ( $\text{HNO}_3$ ) (Figure III-8). Cette observation confirme que le test est positif, indiquant ainsi la présence de collagène, ce qui est cohérent avec les descriptions antérieures de (Lablack, 2012 ; Lassoued et al., 2022 et Oulhiz, 2018).



Figure III-8 Mise en évidence de la présence du collagène avec le test xanthoprotéine

### III.3.3. Rendement massique

Le rendement massique du collagène extrait et lyophilisé est de 20,9%. La valeur obtenue est supérieure à celle obtenue par Lablack (2012) (19,53%), et inférieure à celle relevée par Ould Rabah et Sahnoun (2022) (21%) et Nagai et Suzuki (2000) (50%). Le rendement d'extraction du collagène marin dépend de la l'espèce (nature de la peau et des écailles) et du mode extraction.

### III.3.4. Le poids moléculaire (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

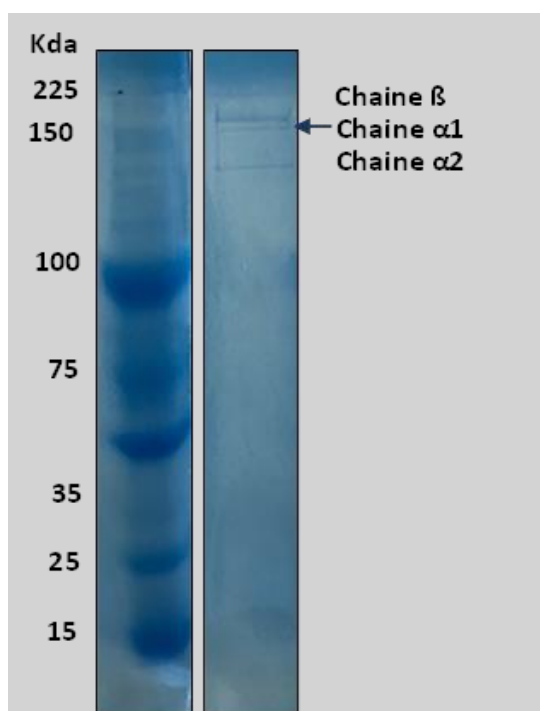


Figure III-9 Profil électrophorétique du collagène extrait en présence de dodécyl sulfate de sodium.

Piste 1 : marqueurs de haut poids moléculaire ; piste 2 : collagène marin extrait (échantillon).

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

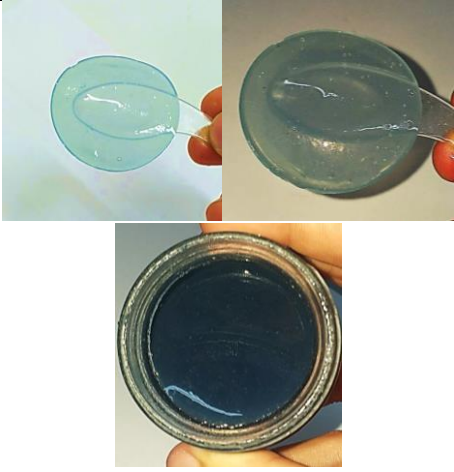
Ces résultats obtenus correspondent aux travaux rapportés dans la littérature (Nagai *et al.*, 2004, Jongjareonrak *et al.*, 2005 ; Kittiphattanabawon *et al.*, 2005).

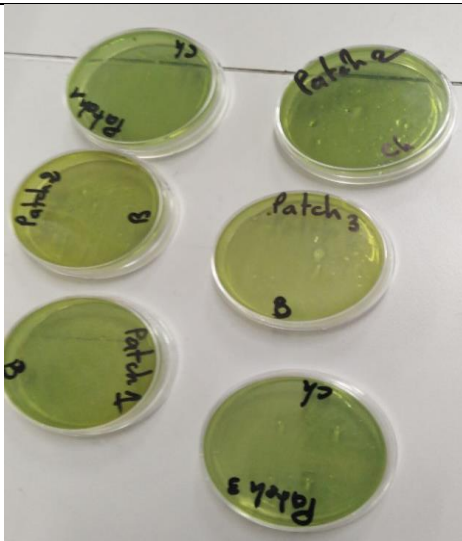
### III.4. Caractérisation des patches et gels produits

#### III.4.1. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des patches et du gel préparés

Les hydrogels chitosane-collagène (patches et gel) sont destinés à être utilisés dans différentes conditions (froid, chaleur et humidité). Pour s'assurer de sa stabilité, l'hydrogel a été stocké à +10°C, et son suivi a été effectué pendant plus d'un mois. Les différents tests sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

**Tableau III-8** Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des patches et du gel préparés

<p><u>Aspect macroscopique :</u></p> <p>J01 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Les patches</u> sont ronds, lisses et humides, avec une épaisseur de <b>1mm</b> et une surface de <b>96,1 cm<sup>2</sup></b>, couleur bleu clair ou jaune.</li> <li>• <u>Le gel</u> est visqueux, non rugueux, avec une couleur bleu foncé, prend la forme du contenant</li> </ul> <p>J30 :</p> <p>Les patches et le gel sont restés stables, avec absence de toute contamination (moisissures et de bactéries). L'aspect des deux produits est resté stable.</p>	
<p>Le <b>pH</b> des patches et du gel est de 7</p>	

<p><u>Contrôle qualité microbiologique :</u> Absence de l'ensemble des germes testés (coliformes totaux, coliformes fécaux, staphylocoques et des Pseudomonas). Absence également des levures et moisissures.</p>	
---	--









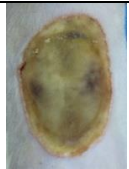
### III.4.2. Activité cicatrisante de l'hydrogel (patchs et gel)










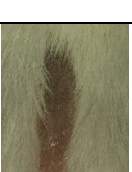
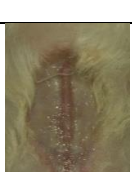


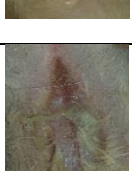

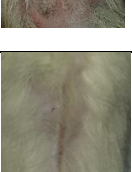


#### III.4.2.1. Description macroscopique de la cicatrisation

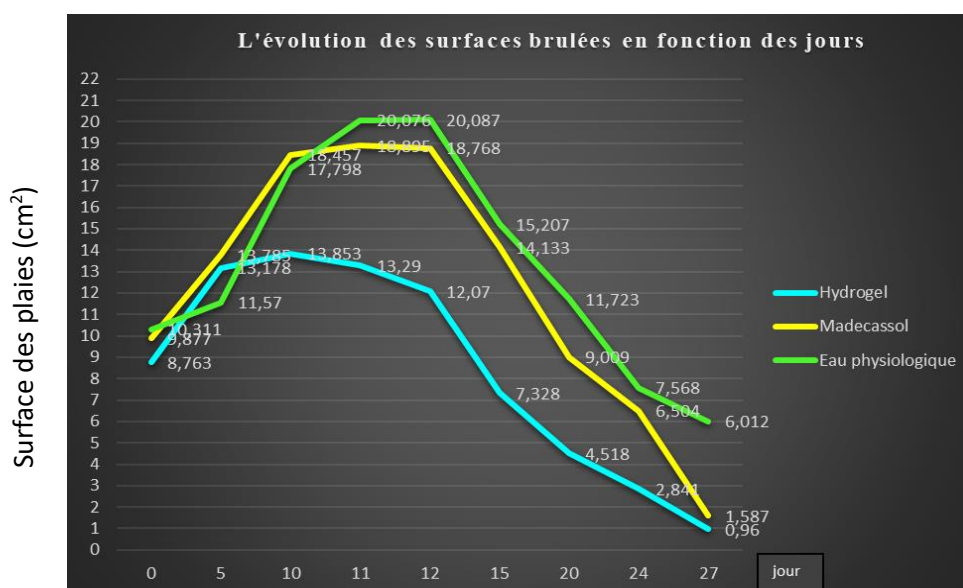
L'activité cicatrisante de l'hydrogel préparé a été évaluée sur des brûlures du 3<sup>ème</sup> degré sur un lot de 04 rats mâles adultes de souche Wistar, deux lots ont été utilisés à titre comparatif (témoin positif : la crème commerciale "Madécassol" et le témoin négatif : eau physiologique).

La description macroscopique des brûlures traitées et la variation de la superficie de la plaie (cm<sup>2</sup>) pendant 27 jours sont rapportées dans le Tableau III-9 et la Figure III-10

**Tableau III-9** Descriptions macroscopiques des brûlures traitées avec l'hydrogel, la crème Madécassol et l'eau physiologique durant 27 jours (les surfaces (cm<sup>2</sup>) des plaies mesurées par le logiciel Image J).

Jour	Surfaces (cm <sup>2</sup> ) de R2 (Ech)	Images R2 (Ech)	Surfaces (cm <sup>2</sup> ) de R3 (M)	Images R3 (M)	Surfaces (cm <sup>2</sup> ) de R3 (M)	Images R1 (T)
J 0 : 06/06/2023	8.763		9.877		10.311	
J 5 : 11/06/2023	13.178		13.785		11.570	
J 10 : 16/06/2023	13.853		18.457		17.798	

J11 : 17/06/2023	13.290		18.895		20.076	
J12 : 18/06/2023	12.017		18.768		20.087	
J 15 : 21/06/2023	7.328		14.133		15.207	
J 20 : 26/06/2023	4.518		9.009		11.723	
J 24 : 30/06/2023	2.841		6.504		7.568	
J 27 : 03/06/2023	0.960		1.587		6.012	



**Figure III-10** Evolution des surfaces brûlées en cm<sup>2</sup> durant 27 jours de traitement avec l'hydrogel, la crème Madécassol et l'eau physiologique

D'après la figure III-9, la cicatrisation pour les trois 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 10 à 12 jours.

-Pour l'hydrogel, la surface de la plaie passe d'une moyenne de 8,76 cm<sup>2</sup> à j0 à une moyenne de 13,85 cm<sup>2</sup> à j10.

-En ce qui concerne, le témoin (+) (Madécassol), la surface passe de 9,88 cm<sup>2</sup> à J0 à une moyenne de 18,9 cm<sup>2</sup> à J11.

-Quant au témoin (-) (Eau physiologique), elle passe de 10,31 cm<sup>2</sup> à J0 à 20,09 cm<sup>2</sup> à J12.

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 détersion. 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 (10 jours pour l'hydrogel, 11 jours pour Madecassol et 12 jours pour l'eau physiologique), une diminution progressive des surfaces est notée pour atteindre une moyenne de 0,96 cm<sup>2</sup> pour l'hydrogel au J27, 1,59 cm<sup>2</sup> pour le témoin (+) (Madecassol) et 6,01 cm<sup>2</sup> pour le témoin (-) (eau physiologique), ce qui correspond à un pourcentage de réduction des surfaces des brûlures de :

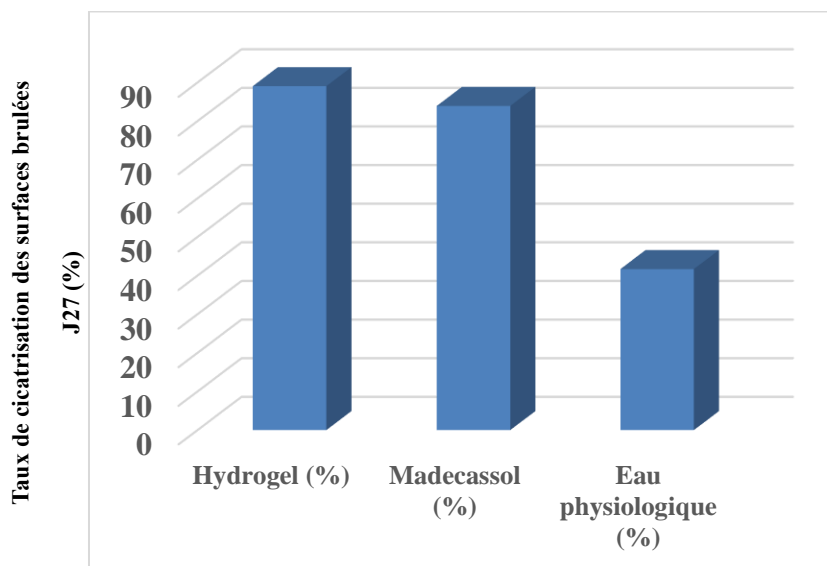
- 89,06 % pour l'hydrogel
- 83,93 % pour la crème commerciale (Madécassol)
- 41,69 % seulement pour l'eau physiologique

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, ni sulfuration des plaies n'ont été observées, ce qui indique une bonne qualité de reconstitution.

### Étude comparative

Les mesures des surfaces des plaies ont été utilisées pour évaluer l'effet cicatrisant de l'hydrogel préparé à partir des produits et coproduits marins. (Figure III-11)



**Figure III-11** Taux de réduction des surfaces brûlées après 27 jours de traitement

A travers les résultats obtenus, on constate une efficacité de l'hydrogel dans la réduction des plaies avec une différence non significative ( $p > 0,05$ ) entre les surfaces des plaies traitées avec l'hydrogel préparé et les surfaces des plaies traitées au Madécassol (témoin +), et une différence significative ( $0,05 > p > 0,01$ ) entre les surfaces des plaies traitées avec l'hydrogel et les surfaces des plaies traitées avec de l'eau physiologique (témoin -)

Ces résultats sont très prometteurs puisque l'hydrogel préparé à base de coproduits marins semble être aussi efficace que la crème commerciale "Madécassol".

En outre, le début de cicatrisation a été observé très tôt pour l'hydrogel à base de biomolécules marines comparativement à la crème commerciale et à l'eau physiologique. La deuxième phase de bourgeonnement et d'épidermisation est observée au J10 de traitement avec l'hydrogel, au J11 d'application de la crème Madecassol, et au J12 de traitement avec de l'eau physiologique.

**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 néo tissus.

Il semblerait que l'hydrogel préparé dans la présente étude a permis une meilleure cicatrisation et une réduction de la surface brûlée plus importante que l'application du chitosane préparé par **Haddab et Kortbi (2020)**.

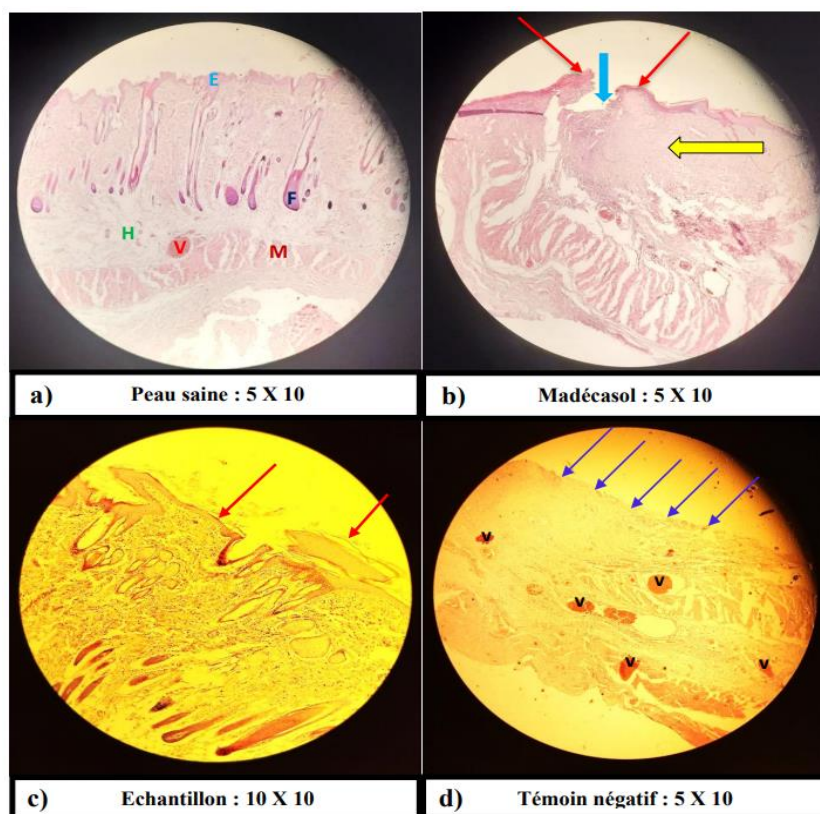
En plus du chitosane, l'hydrogel contient du collagène et des minéraux marins, dont le rôle dans la régénération de la peau et la stimulation des fibroblastes n'est plus à démontrer, ce qui vraisemblablement a contribué à la réduction des plaies et la cicatrisation rapide. En effet, le collagène a la particularité d'être humide mais de sécher lorsqu'il est appliqué sur les plaies. Il présente donc plusieurs avantages dont le caractère hypo-allergène et hydratant.

De même les minéraux marins riches en magnésium, en silice stimuleraient la division cellulaire et la régénération de la peau.

Enfin, c'est l'action synergique de ces trois composants majeurs de l'hydrogel qui semblent être à l'origine de la rapide cicatrisation des plaies.

### III.4.3. Résultats des coupes histologiques

Les coupes histologiques des peaux de rats brûlés au 3<sup>ème</sup> degré et traités avec l'hydrogel à base des trois biomolécules marines (chitosane, collagène et minéraux marins) (d) sont comparées à celles des rats brûlés au 3<sup>ème</sup> degré et traités par le madécassol (b), au témoin négatif (sans traitement) (c) et sont confrontées aux tissus cutanés des rats sains (a). (Figure III-11)



**Figure III-12** Coupes histologiques colorées à l'H et à l'E des tissus cutanés de rats sains (a) et rats brûlés au 3<sup>ème</sup> degré et traités au madécassol (b) (témoin positif), à l'eau physiologique (témoin négatif) (c) et à l'hydrogel (d) au grossissement X 50 (a,b,c) et au grossissement X100 (d).

La figure **III-12 (a)** représente une peau saine observée au grossissement X 50 : on distingue clairement les différents constituants d'une peau sans lésion (**E** : Épiderme, **D** : Derme, **F** : Follicule pileux, **H** : Hypoderme, **V** : Vaisseaux sanguins et **M** : Muscle)

La figure **III-12 (b)** représente une peau traitée au madécassole observée au grossissement X 50, on observe les deux bords de l'épiderme nouvellement formé (**flèche rouge**), un tissu de granulation (**flèche bleue**) mais aussi une ulcération (**flèche jaune**)

La figure **III-12 (c)** représente une peau traitée à l'hydrogel à base de biomolécules marines observée au grossissement X 100, on note le nouveau tissu de granulation ainsi qu'une ré-épithétisation, on distingue les deux bords de l'épiderme (**flèche rouge**) avec absence d'ulcération. Il a fallu augmenter le grossissement pour distinguer la peau saine de la peau traitée à l'hydrogel préparé.

La figure **III-12 (d)** représente une peau non traitée (témoin négatif) observée au grossissement X 50, on constate l'absence totale de l'épithélium et la présence d'un nombre élevé de vaisseaux (**V**), signe de la persistance de la réaction inflammatoire.

Ces résultats suggèrent que le traitement à l'hydrogel à base de chitosane- collagène et minéraux marins a eu une influence bénéfique sur la cicatrisation des plaies. Ainsi, le milieu de cicatrisation humide est dû au chitosane qui contient plus de 90% d'eau et qui accélère l'effet du collagène. Il a été rapporté que ce polysaccharide naturel permet la régénération des éléments tissulaires des plaies cutanées et stimule l'activité et/ou a la capacité de stimuler la prolifération fibroblastique qui libère l'interleukine-V et la production de collagène de type III, la stimulation de la migration des macrophages et l'augmentation de l'épanchement qui forme de la fibrine épaisse. (**Dupasquier 2011 ; Nacer Khodja et al.,2013**).

## Conclusion et perspectives

L'objectif principal de cette étude est la valorisation biotechnologique des produits et des coproduits marins en vue de la préparation d'un hydrogel ayant des propriétés pharmacologiques, notamment cicatrisante. L'hydrogel est formulé en utilisant des coproduits marins tels que le chitosane extrait des carapaces de crevettes et le collagène extrait de la peau de poissons ainsi que des ingrédients supplémentaires tels que les coquilles bivalves (huitres, moules) et les os de seiches. Les résultats de cette étude mettent en évidence les points suivants :

- Les cendres, les polysaccharides et les protéines sont les composants majeurs présents dans les carapaces de crevettes.
- Le chitosane obtenu par voie chimique est de haute qualité (DDA) 94.4 à 95.01 %, avec une excellente solubilité dans l'acide acétique à 1%.
- Les rendements d'extraction du chitosane et du collagène sont satisfaisants et ils sont dans l'ordre de 15.4 % et 20.9%
- L'hydrogel préparé présente des caractéristiques physico-chimiques appropriées, avec un pH équivalent à celui de la peau 5.5- 6.5, une excellente stabilité, une consistance adéquate et conforme à la pharmacopée européenne.
- L'évaluation du pouvoir cicatrisant de l'hydrogel sur des brûlures du 3<sup>ème</sup> degré montre une efficacité supérieure à celle du Madécassol, avec une réduction significative de la surface des plaies (89,06 %) après 27 jours.
- L'étude comparative a montré que les plaies traitées avec l'hydrogel chitosane- collagène cicatrisaient le 10<sup>ème</sup> jour, tandis que celles traitées avec le madécassol cicatrisaient le 11<sup>ème</sup> jour. L'analyse histologique a montré que le nouveau tissu de granulation et l'épithélialisation progressaient mieux dans les plaies traitées avec l'hydrogel chitosane-collagène.

Ces résultats confirment que les coproduits marins sont une source précieuse de biomolécules bioactives aux propriétés pharmacologiques multiples.

Dans les perspectives futures, il serait intéressant de :

- Approfondir l'étude de l'activité cicatrisante au-delà de la période de 27 jours afin d'évaluer l'efficacité à long terme de l'hydrogel.
- Réaliser une étude histologique approfondie des brûlures traitées avec l'hydrogel pour comprendre les mécanismes de cicatrisation.
- Optimiser la formulation de l'hydrogel en ajustant les concentrations de chitosane et d'autres principes actifs marins pour maximiser leur efficacité.

- Évaluer l'activité antibactérienne de l'hydrogel pour vérifier son potentiel dans le traitement des infections cutanées.
- Améliorer la formulation galénique de l'hydrogel en développant un gel qui facilite l'absorption cutanée des principes actifs.
- Purifier les extraits de coproduits marins afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique.
- Approfondir la caractérisation des propriétés pharmacologiques du chitosane, en évaluant ses effets analgésiques, antioxydants, antidiabétiques et antihypertensifs.
- Explorer les activités biologiques des autres constituants des coproduits marins, tels que les protéines, les pigments et les minéraux, pour identifier de nouvelles applications potentielles.

Ces perspectives permettront de renforcer les connaissances sur l'utilisation de l'hydrogel à base de coproduits marins et de maximiser son potentiel en tant que produit pharmaceutique possédant des propriétés thérapeutiques diverses et bénéfiques.

## Références bibliographiques

- Alemán, J. (2007).** Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry*. 79(10) : p.p. 1801-1829.
- Almdal, K., et al., (1993).** Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polymer gels and networks*. 1(1) : p.p. 5-17.
- AQUIDEAS. (2019).** Valeur des coquilles d'huitres. [En ligne]. [Consulté le 09/06/2023]. Disponible sur : <http://www.aquideas.fr> > article45.
- Biologie de la peau.** [En ligne]. [Consulté le 05/06/2023]. Disponible sur : <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10>
- Carter D. W., (2020).** Le manuel MSD version pour les professionnels de la santé. [En ligne]. [Consulté le 15/06/2023]. Disponible sur le web : <https://www.msmanuals.com/fr/professional/blessures-empoisonnement/brulures/brulures>
- Cauchie, H.-M., (2002).** Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiologia*. 470(1-3) : p.p. 63-95.
- Chatelet, C., O. (2001).** Damour, and A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 22(3) : p.p. 261-268.
- Cheikh Ndiaye N. (2007).** Procède de production d'un détartrant buccodentaire à base d'os de seiche (*Octopus vulgaris*). Brevet. Priority claimed from OA1200600248. P. 11.
- Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N. (2001).** Caractérisation rhéologique de solutions thermogélifiantes de chitosane/glycérol-phosphate. *Rheological Polymers*. 46. p.p.39-47.
- Cherry for Life Science.** Santé sur net. [En ligne]. [Consulté le 11/06/2023]. Disponible sur : <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/dermatologie/cicatrisation/>
- Claeyssen, (2009).** Zinc et brûlure. Grenoble. Université de Grenoble. Vol. version 1
- COURTOIS J., (2006).** "Aïe, ça brûle !!": une approche psychomotrice du vécu de la douleur auprès de grands brûlés. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- Croisier, F. and C. Jérôme, (2013).** Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 49(4) : p.p 780-792.
- Dang, Q., Liu, K., Zhang, Z., Liu, C., Liu, X., Xin, Y., . . . Fan, B. (2017).** Fabrication and evaluation of thermosensitive chitosan/collagen/ $\alpha$ ,  $\beta$ -glycerophosphate hydrogels for tissue regeneration. *Carbohydr Polym*, 167, p.p. 145-157. Doi : 10.1016/j.carbpol.2017.03.053
- DARTIAL Y., (2010).** L'intérêt du thermalisme et de ses produits dermocosmétiques dans la prise en charge des séquelles de lésions cicatricielles de brûlures. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- DEWAZ M. et ER C. (1982).** Méthode rapide de caractérisation des dolomies et calcaires magnésiens : la gaz-volumétrie. *Bulletin de la Société géographique de Liège*, No 18, 18ème année, p.p. 41-48.
- DIETI NATURA.** [En ligne]. [Consulté le 28/06/2023]. Disponible sur : <https://www.dieti-natura.com/plantes-actifs/collagene-marin.html>
- Docteurclik.** [En ligne]. [Consulté le 11/06/2023]. Disponible sur : <https://www.docteurclik.com/guide-montagne/brulure-en-montagne.aspx>

- Domard, A. and M. Domard, (2001).** Chitosan : structure-properties relationship and biomedical applications, in *Polymeric biomaterials*, T. Francis, Editor. p.p 187-212.
- Dupasquier F., (2011).** Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré. [En ligne]. [Consulté le: 02/07/2023]. 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 20/05/2023]. Disponible sur le web : [https://ressources.unisciel.fr/formulation\\_cosmetique/co/formulations.html](https://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/formulations.html)
- EISENBERG C., MAYEUR P., (2001).** Institut de formation en soins infirmiers. Soins infirmiers en urgences, réanimation et transfusion. Brûlures. Douleur. Paris : Ellipses.
- El Houda H. N., (2017).** Evaluation de la qualité organoleptique, hygiénique et nutritionnelle du tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (L., 1758).
- Faivre, J., et al., (2018).** Bioinspired microstructures of chitosan hydrogel provide enhanced wear protection. *Soft matter*. 14(11) : p.p. 2068-2076.
- Fernandez-Kim S. O., (2004).** Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols.
- 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.
- Fitzgerald, M.M., et al., (2015).** Tunable stress relaxation behavior of an alginate-polyacrylamide hydrogel : comparison with muscle tissue. *Biomacromolecules*. 16(5) : p.p. 1497-1505.
- FONTAINE E. (2012).** Application de la thérapie cellulaire au traitement des grands brûlés. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- GACHIE E. (2012).** L'expansion cutanée : revue rétrospective sur 25 ans d'utilisation. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- GIRARDEAU F., (2009).** Roselyne, Marie. Le pharmacien face aux brûlures : conseils et traitements à l'officine en 2009. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen.
- Groupe Madeinfutura. (2001).** Futura-Sciences. [En ligne]. [Consulté le 20/06/2023]. Disponible sur le web : <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-peau-7189/>
- Guesmi K., Hennous M. (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 et de master en sciences de la mer, option : Biotechnologie Marine. Dely ibrahim. ENSSMAL. p. 99.
- 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 et de master en sciences de la mer, option : Biotechnologie Marine. Dely ibrahim. ENSSMAL. p. 98.
- Hafsa J., Smach M. A., et al., (2016).** Antioxidant and antimicrobial properties of chitin and chitosan extracted from *Parapenaeus Longirostris* shrimp shell waste. *Ann. Pharm. Fr.* 74, p.p.27–33.
- Heino, J., Huhtala, M., Kapyla, J., & Johnson, M. S. (2009).** Evolution of collagen-based adhesion systems. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(2), p.p. 341-348. Doi : 10.1016/j.biocel.2008.08.021. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790075>
- Hirano, S., et al., (1990).** Chitosan : a biocompatible material for oral and intravenous administrations, in *Progress in biomedical polymers*, Springer. p.p 283-290.
- Howling, G.I., et al., (2001).** The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 22(22) : p.p 2959-2966.
- Huang, N.F., et al., (2005).** Injectable biopolymers enhance angiogenesis after myocardial infarction. *Tissue engineering*. 11(11-12) : p.p 1860-1866.

- Janssens C., (2022).** Le traitement des brûlures chez les mammifères par la peau de tilapia. These Médecin Vétérinaire. Faculté de Médecine Vétérinaire de Liege. p. 39. URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/14961>
- Jeuniaux, C., et al., (1988).** Sources of chitin, estimated from new data on chitin biomass and production. *Chitin and chitosan* : p.p. 3-11.
- Kavanagh, G.M. and S.B. Ross-Murphy, (1998).** Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science*. 23(3) : p.p. 533-562.
- Kefil S., (2020).** Valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes : Etude du pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire du chitosane.
- Khiat M., Herguema Y. (2022).** Valorisation biotechnologique des coproduits de crustacés : étude de l'efficacité du traitement avec du chitosane et de l'irradiation UV dans l'élimination de *Legionella pneumophila*. Mémoire d'ingénieur et de master en sciences de la mer, option : Biotechnologie Marine. Dely ibrahim. ENSSMAL. p. 98.
- Kim S.K., Rajapakse N., Shahidi F., (2008).** Production of bioactive chitosan oligosaccharides and their potential use as nutraceuticals. In : C.S. Barrow, F (Ed.) *Marine nutraceuticals and functional foods*. Nutraceutical Science and Technology, New York, p.p. 183- 196.
- 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).
- LACROIX F.,** L'épiderme de la peau - Tête à modeler. [En ligne]. [Consulté le 20/06/2023]. Disponible sur le web : <http://www.teteamodeler.com/sante/soleil/vichy/peau7.htm>
- 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. Université de Bordeaux – UFR des Sciences Pharmaceutiques. p. 122.
- LAKHEL A., PRADIER J-P., BRACHET M., DUHOUX A., DUHAMEL P., FOSSAT S. et al. (2008).** Chirurgie des brûlures graves au stade aigu. *EMC - Techniques chirurgicales - Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique*. 3(3) : p.p. 1–36.
- Lamarque, G., et al., (2005).** New route of deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. *Biomacromolecules*. 6(3) : p.p. 1380-1388.
- Lassoued J., Ben Slimane E., Sadok S., Bejaoui N., (2022).** Extraction du collagène à partir du byssus de la moule *Mytilus gallprovincialis*. Nagai et Suzuki (2000).
- LE DEVEDEC (2008).** Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés. Mémoire de maîtrise. Chimie. Canada : Université du Québec, p. 12. [En ligne]. [Consulté le : 15/06/2023]. Disponible sur le web : <https://archipel.uqam.ca/959/1/M10234.pdf>.
- Li, Jin & Du, Yumin & Yang, Jianhong & Feng, Tao & Li, Aihua & Chen, Ping. (2005).** Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*. 87(3). p.p. 441-448. Doi : 10.1016/j.polymdegradstab.2004.09.008.
- Lu, W.-N., et al., (2008).** Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. *Tissue Engineering Part A*. 15(6) : p.p. 1437-1447.
- Mecheddou C., Barr K., (2018).** Valorisation des carapaces des crevettes dans la dépollution des eaux : Extraction du chitosane et optimisation des procédés.
- MELISSOPOULOS A., (2012).** LEVACHER C. La peau : structure et physiologie. Paris : Éditions Tec & doc.
- Moreira, C. D., Carvalho, S. M., Mansur, H. S., & Pereira, M. M. (2016).** Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 58, p.p. 1207-1216. Doi : 10.1016/j.msec.2015.09.075. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26478423>
- Muxika, A., et al., (2017).** Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International journal of biological macromolecules*. 105 : p.p. 1358-1368.

- Nacer Khodja, A.; Mahlous, Med; Tahtat, Dj.; Benamer, S.; Larbi Y., S.Chader, Henni; Mouhoub, L.; Sedgelmaci, M.; Ammi, N.; Mansouri, M.ed Benslimane; M.aameri, S.(2013).** *Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn : Pharmacological and toxicological tests. Burns, 39(1), p.p. 98–104.* Doi : 10.1016/j.burns.2012.05.021
- Oulhiz, A. (2018).** 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.*). Thèse de doctorat. Ecologie et environnement marin. Algérie. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. p.p. 14-22-23. [En ligne]. [Consulté le 16/06/2023]. Disponible sur le web : <http://ebiblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13260>.
- Özogul F., Hamed I., Özogul Y., Regensteinc J. M., (2018).** Crustacean By-products 7.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010).** Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), p.p. 1863-1887. Doi : 10.3390/ma3031863
- Pariente, J.-L., Villars, F., & Conort, P. (2005).** Les matériaux biologiques. *Progrès en Urologie*, 15, p.p. 964-972.
- Penser Santé.** [En ligne]. [Consulté le 24/06/2023]. Disponible sur le web : <https://www.pensersante.fr/collagene-fibre-structurante-corps-humain>
- RAFFOUL W., BERGER M. (2006).** Les brûlures : de l'ébouillement à l'électrisation - définitions et traitement. CHU Vaudois, Lausanne. [En ligne]. [Consulté le 12/07/2023]. Disponible sur le web : <http://www.medicalforum.ch/docs/smf/archiv/fr/2006/2006-10/2006-10-534.pdf>
- Research Gate GmbH.** [En ligne]. [Consulté le 11/07/2023]. Disponible sur le web : 4-Coupe histologique de la peau faisant apparaître le derme papillaire... | Download Scientific Diagram (researchgate.net)
- ResearchGate GmbH.** [En ligne]. [Consulté le 11/07/2023]. Disponible sur le web : 3 : Illustration de la Jonction DermoÉpidermique3. Cette jonction... | Download Scientific Diagram (researchgate.net)
- ResearchGate GmbH, (2008).** [En ligne]. [Consulté le 11/07/2023]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan\\_fig4\\_355787682](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-chitosan_fig4_355787682)
- ResearchGate GmbH, (2008).** [En ligne]. [Consulté le 11/07/2023]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/figure/Linnervation-cutanee-Dapres-BASFd\\_fig7\\_342622254](https://www.researchgate.net/figure/Linnervation-cutanee-Dapres-BASFd_fig7_342622254)
- Rinaudo, M., (2006).** Chitin and chitosan : properties and applications. *Progress in polymer science*. 31(7) : p.p. 603-632.
- Roberts, G.A., Chitin chemistry. (1992).** Macmillan International Higher Education.
- Rochet J., Wassermann D., et al., (1998).** Rééducation et réadaptation de l'adulte brûlé. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. p. 27.
- Ross-Murphy, S.B., (1994).** Rheological characterization of polymer gels and networks. *Polymer Gels and Networks*. 2(3-4) : p.p. 229-237.
- SAHNOUNE, OULD RABAH (2022).** Préparation d'une variété d'émulsions à base de biomolécules marines aux propriétés pharmacologiques (cicatrisantes, anti-inflammatoires et antibactériennes). Mémoire d'ingénieur et de master en sciences de la mer, option : Biotechnologie Marine. Dely ibrahim. ENSSMAL.
- Sahoré A. D., Abouattier J. L., (2016).** Quelques méthodes d'analyse biochimique de produits alimentaires. <https://www.connaissances-savoirs.com/>
- Schatz, C., et al., (2003).** Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules*. 4(3) : p.p. 641-648.
- ScienceDirect.** La peau. [En ligne]. [Consulté le 02/07/2023]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0515370022000799>
- Somashekar, D. and R. Joseph, (1996).** Chitosanases—properties and applications : a review. *Bioresource technology*. 55(1) : p.p. 35-45.
- Stammen, J.A., et al., (2001).** Mechanical properties of a novel PVA hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials*. 22(8) : p.p. 799-806.

- Sun, X. and S.S. Nunes, (2015).** Overview of hydrogel-based strategies for application in cardiac tissue regeneration. *Biomedical Materials*. 10(3) : p.p. 034005.
- Taouint A. N., (2016).** Préparation de chitosane à partir de la biomasse marine. Application au conditionnement des boues urbaines. Thèse de Magister. Université de Tizi-ouzou.
- Tibbitt, M.W. and K.S. Anseth, (2009).** Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*. 103(4) : p.p. 655-663.
- Truong T. O., Hausler R., Monette F., Niquette P., (2007).** Valorisation des résidus industriels de pêches po... – *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science –Érudit*. [En ligne]. [Consulté le 13/07/2023]. Disponible sur le web : [//www.erudit.org/en/journals/rseau/1900-v1-n1-rseau1812/016170ar/abstract/](http://www.erudit.org/en/journals/rseau/1900-v1-n1-rseau1812/016170ar/abstract/) (accessed 6.27.22).
- Vårum, K.M., et al., (1997).** In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate research*. 299(1-2) : p.p. 99-101.
- Waibel, K.H., et al., (2011).** Safety of chitosan bandages in shellfish allergic patients. *Military medicine*. 176(10) : p.p. 1153-1156.
- Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010).** Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with bêta-glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(14), p.p. 3976-3985. Doi : 10.1016/j.biomaterials.2010.01.131. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170955>
- Wang, L., & Stegemann, J. P. (2011).** Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration. *Acta Biomater*, 7(6), p.p. 2410-2417. Doi : 10.1016/j.actbio.2011.02.029. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345389>
- Wassermann, D., (2002).** Critères de gravité des brûlures. *Épidémiologie, prévention, organisation de la prise en charge. Pathologie Biologie* 50, p.p. 65–73.
- Williams, D.F., (2008).** On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 29(20) : p.p. 2941-2953.
- Zemmouri, H. (2008).** Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale Polytechnique, Alger. ENP.
- ZERROUKI M. (2022).** Mesure de la matière organique et des carbonates de calcium dans les sédiments marins. Polycopie de TP. Document interne. Ecole nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral. p. 13.

# Annexes

## Annex A Images des manipulations



Figure A.1 Broyage et tamisage de poudre de crevettes

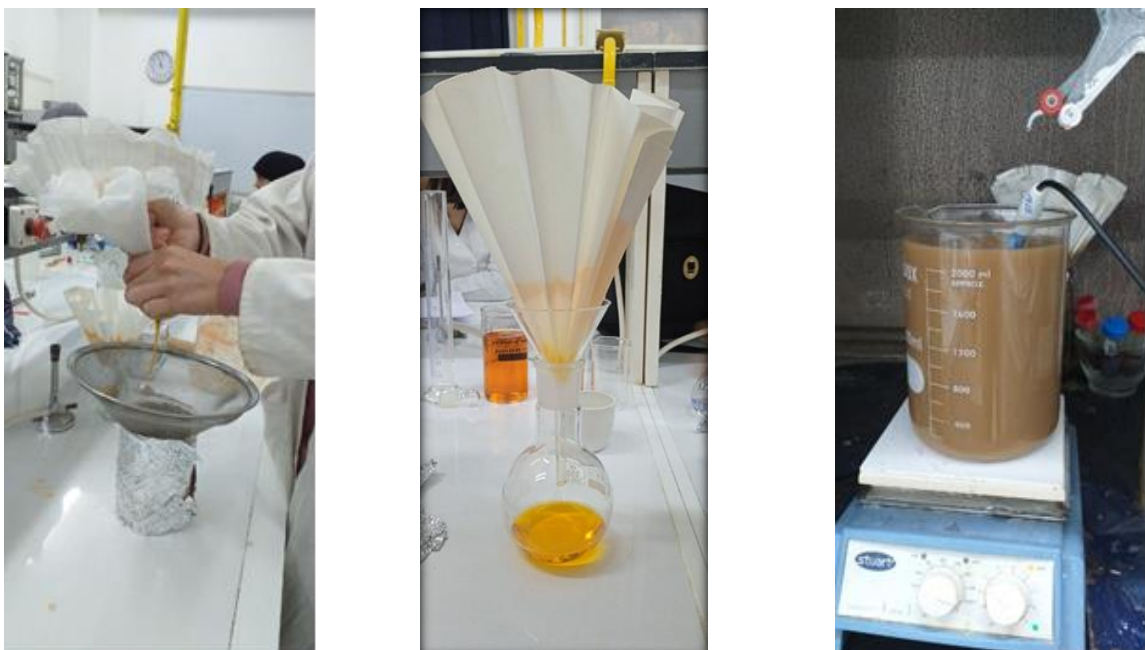


Figure A.2 Dépigmentation et déminéralisation



Figure A.3 Lavage et ajustement du pH



Figure A.4 Découpage et broyage des peaux des poissons



Figure A.5 Collagène après lyophilisation



Figure A.6 Collagène dans des boudins de dialyse



Figure A.7 Collagène concentré dans (eau + NaCl)

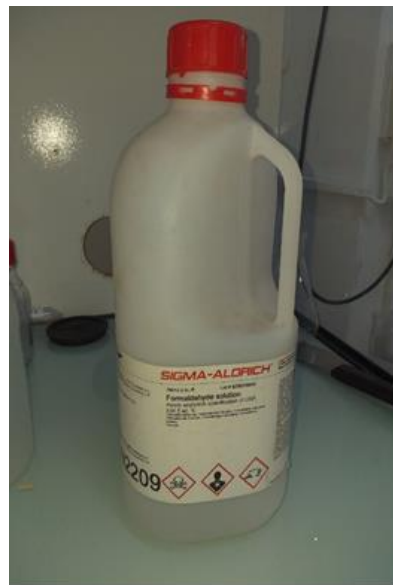
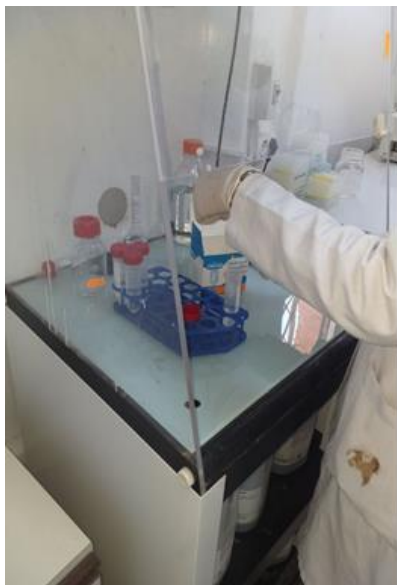


Figure A.8 : Préparation du formaldéhyde à 4%



Figure A.9 Application du gel et de patch sur les rats brûlés



Figure A.10 Extracteur de Soxhlet



Figure A.11 Four à moufle



Figure A.12 Centrifugeuse



Figure A.13 Disposition des 12 rats au sein de l'animalerie de l'ANPP

## Annex B Business Model Canvas (BMC)

### B.1 Introduction

Le Business Model Canvas (BMC) est conçu pour nous aider à visualiser et à planifier les différents aspects de notre entreprise, de sa proposition de valeur à sa structure de coûts en passant par ses sources de revenus. Grâce à cette méthode de conception, nous pourrions mieux comprendre comment notre entreprise peut créer de la valeur, atteindre ses clients cibles et générer des revenus durables. Plongeons maintenant dans les détails de votre BMC pour notre entreprise innovante.



Figure B.1 Business Model Canvas

### B.2 Propositions de la valeur.

- Hydrogel à base de biomolécules marines offrant un pouvoir cicatrisant efficace pour les brûlures du 3ème degré
- Prix compétitif : le fait que notre hydrogel cicatrisant à base de biomolécules marines offre un rapport qualité-prix attractif par rapport aux autres produits sur le marché. On a proposé un prix compétitif qui rend notre solution plus accessible aux hôpitaux, aux cliniques spécialisées et aux patients
- Sécurité et non-toxicité : le fait que notre l'hydrogel est fabriqué à partir d'ingrédients naturels et ne contient pas de substances nocives, offrant ainsi une solution sûre et non toxique pour les patients.
- Durabilité environnementale : notre projet a un aspect écologique, on utilise des ressources renouvelables et des déchets marins, contribuant ainsi à la préservation de l'environnement

- Réduction du temps de cicatrisation et minimisation des risques d'infection : notre hydrogel a la capacité d'accélérer le processus de cicatrisation des brûlures du 3ème degré, réduisant ainsi la durée de guérison et permettant aux patients de récupérer plus rapidement.
- Réduction de la douleur : le pouvoir analgésique de notre hydrogel, qui peut aider à réduire la douleur associée aux brûlures, améliorant ainsi le confort des patients pendant le processus de guérison.
- Prévention des cicatrices : les propriétés de notre hydrogel favorisent la régénération tissulaire et la réduction des cicatrices, offrant ainsi aux patients une meilleure apparence esthétique après la guérison.
- Facilité d'application : la simplicité d'utilisation de notre hydrogel, qui peut être facilement appliqué par les professionnels de la santé ou même par les patients eux-mêmes, offrant ainsi une solution pratique pour les soins des brûlures.

### **B.3 Segment de clientèle.**

- Patients souffrant de brûlures graves : notre principal segment de clientèle est constitué des personnes qui ont subi des brûlures du 3ème degré. Cela peut inclure des patients de différents groupes d'âge et de divers milieux socio-économiques. On peut cibler des patients individuels ainsi que des familles à la recherche d'une solution efficace pour la cicatrisation des brûlures graves.
- Pharmacies, hôpitaux et cliniques spécialisés dans les soins des brûlures : Il peut s'agir d'hôpitaux de traumatologie, de centres de brûlés, de centres de chirurgie plastique ou de cliniques spécialisées. On peut collaborer avec ces institutions pour fournir notre hydrogel cicatrisant et établir des relations durables avec les professionnels de la santé.
- Fabricants de produits médicaux : on peut explorer des partenariats potentiels avec des fabricants de produits médicaux qui pourraient être intéressés par l'intégration de notre hydrogel cicatrisant dans leurs gammes de produits existantes. Cela peut inclure des entreprises spécialisées dans les produits de soins de la peau, les pansements médicaux ou les fournitures médicales utilisées dans les soins des brûlures.
- Services d'urgence médicale : on peut établir des partenariats avec les services d'urgence médicale, tels que les ambulances et les services médicaux d'urgence, afin de fournir notre hydrogel cicatrisant aux professionnels médicaux sur le terrain. Cela leur permettra de commencer rapidement le traitement des brûlures graves dès les premiers instants après l'incident.

### **B.4 Canaux de distribution**

- Vente directe aux établissements de santé : on peut proposer des ventes en gros directes aux hôpitaux, aux cliniques et aux établissements de santé qui utilisent notre hydrogel cicatrisant de manière régulière. On peut négocier des contrats à long terme pour assurer un approvisionnement continu.

- Plateformes en ligne (réseaux sociaux) : on utilise les réseaux sociaux pour vendre notre hydrogel cicatrisant directement aux consommateurs. Cela offre une commodité supplémentaire pour les patients qui préfèrent acheter des produits médicaux en ligne.

- Livraisons à domicile.

## **B.5 Relation Client**

- Réseaux sociaux

- Support client personnalisé : on peut fournir des canaux de communication tels que des lignes téléphoniques dédiées, des courriels ou des chats en ligne, afin que les patients puissent obtenir facilement des réponses et se sentir soutenus tout au long de leur processus de guérison.

- Collecte de feedback et amélioration continue : on encourage les patients et les professionnels de la santé à partager leurs expériences et leurs commentaires sur l'efficacité de notre hydrogel cicatrisant. On peut utiliser ces retours pour améliorer continuellement notre produit et nos services, démontrant ainsi notre engagement envers la satisfaction des clients.

- Sensibilisation et éducation : On peut organiser des événements, des séminaires ou des webinaires pour sensibiliser les professionnels de la santé et les patients aux avantages de notre hydrogel cicatrisant. On peut partager des études de cas, des témoignages de patients et des informations médicales pertinentes pour renforcer la confiance dans votre produit.

## **B.6 Activités Clés**

- Gestion de la chaîne d'approvisionnement pour l'obtention des déchets des espèces marines

- Recherche et développement : Effectuer des recherches approfondies pour améliorer constamment la formulation de notre hydrogel cicatrisant, explorer de nouvelles biomolécules marines et évaluer leur efficacité dans la cicatrisation des brûlures.

- Production et fabrication : Mettre en place des processus de production efficaces pour fabriquer notre hydrogel cicatrisant en respectant les normes de qualité et de sécurité. Cela comprend l'acquisition des matières premières, la formulation du produit, le contrôle de la qualité et la gestion des stocks.

- Vente et distribution : Établir des canaux de vente et de distribution efficaces pour mettre notre hydrogel cicatrisant à la disposition des professionnels de la santé et des patients. Cela peut impliquer des partenariats avec des distributeurs, des grossistes, des pharmacies et d'autres acteurs du secteur de la santé.

- Surveillance du marché et veille concurrentielle : Suivre les tendances du marché, surveiller la concurrence et rester à l'affût des avancées scientifiques et technologiques dans le domaine de la cicatrisation des brûlures. Cela permet d'adapter notre stratégie et notre offre en conséquence.

## B.7 Ressources clés

- Infrastructures et installations :

- Installation de production équipée des équipements nécessaires pour fabriquer l'hydrogel cicatrisant de manière efficace et conforme aux normes de qualité.
- Espaces de bureau pour les opérations administratives et le personnel de soutien.

- Technologie et équipement :

- Équipements de laboratoire pour effectuer des analyses et des tests de qualité sur les matières premières et les produits finis.
- Équipements de production pour mélanger, formuler et conditionner l'hydrogel cicatrisant.

- Matières premières :

- Approvisionnement en produits chimiques tels que l'Acétone, NAOH, HCL...
- Accords d'approvisionnement avec des fournisseurs de déchets marins, tels que des entreprises de transformation des produits de la mer, des industries de la pêche, des fermes aquacoles et des restaurants pour obtenir les matières premières nécessaires.

- Ressources humaines :

- Ingénieurs spécialisés dans le domaine de la cicatrisation des brûlures pour la recherche et le développement de notre hydrogel cicatrisant.
- Personnel de production pour fabriquer l'hydrogel selon les normes de qualité requises.
- Personnel de vente et de marketing pour promouvoir et commercialiser notre produit.

- Financement :

- Capital initial pour les investissements initiaux, tels que l'achat d'équipements, les frais de recherche et développement, et le démarrage des activités.
- Flux de trésorerie pour couvrir les coûts opérationnels, tels que les salaires, les matières premières, les frais généraux, le marketing et la promotion.

## B.8 Partenaires clés

- Distributeurs et grossistes : on a identifié des distributeurs et des grossistes spécialisés dans le secteur médical et de la santé. Ces partenaires peuvent nous aider à atteindre efficacement les différents marchés et à élargir notre portée géographique.

- Laboratoires de recherche et de développement : on peut collaborer avec des laboratoires de recherche et de développement spécialisés dans les biomatériaux et la cicatrisation des brûlures. Ces partenariats peuvent nous aider à améliorer notre hydrogel cicatrisant, à mener des études cliniques et à valider scientifiquement son efficacité.

- Fabricants et fournisseurs d'équipements médicaux : on peut établir des relations avec des fabricants et des fournisseurs d'équipements médicaux pour nous assurer que notre hydrogel cicatrisant est compatible avec les dispositifs et les instruments utilisés dans les traitements des

brûlures. Cela peut inclure des pansements spécifiques, des appareils de mesure de la cicatrisation ou d'autres technologies médicales connexes.

- Partenariats avec des industries de la pêche et de la transformation des produits de la mer, des restaurants et des fermes aquacoles pour obtenir des déchets d'espèces marines riches en biomolécules

- Partenaires de marketing et de communication : on peut collaborer avec des agences de marketing et de communication spécialisées dans le secteur médical pour développer des stratégies de marketing ciblées, créer du contenu pertinent et promouvoir notre hydrogel cicatrisant auprès des professionnels de la santé et des patients.

- Ministère de la Santé

- Ministère chargé de l'industrie pharmaceutique.

## **B.9 Structure de coûts**

- Coûts fixes

- Loyer ou location de locaux : Il s'agit du coût fixe associé à la location de notre espace de production et de bureau.

- Salaires et charges sociales du personnel permanent : Ces coûts sont fixes car ils restent les mêmes, indépendamment de la quantité de production.

- Assurance : Les primes d'assurance sont des coûts fixes qui doivent être payés régulièrement pour assurer la couverture de notre entreprise.

- Coûts variables

- Matières premières : Les coûts des matières premières utilisées pour la production de notre hydrogel cicatrisant sont des coûts variables, car ils varient en fonction du volume de production.

- Emballage : Les coûts liés à l'emballage du produit peuvent varier en fonction du nombre d'unités produites.

- Frais de transport : Les frais de transport pour l'acheminement des matières premières et des produits finis peuvent varier en fonction de la distance et du volume

- Coûts semi-variables

- Maintenance et réparation : Les coûts d'achat d'équipements sont considérés comme des coûts fixes, mais les coûts de maintenance et de réparation peuvent varier en fonction de l'utilisation et de l'usure.

- Marketing et publicité : Les dépenses de marketing peuvent varier en fonction de la stratégie de promotion et du volume de vente.

- Factures (eau – électricité - gaz ...)

Coût du projet (DA)			
Equipements	Machines	28 000 00,00	33 000 00,00
	Verrerie	5 000 00,00	
Fonds de roulement	Loyer	7 200 00,00	73 300 00,00
	Assurance	1 000 00,00	
	Salaires et charges sociales	25 000 00,00	
	Produits chimiques	20 000 00,00	
	Matières premières	6 100 00,00	
	Emballage	5 000 00,00	
	Factures	1 800 00,00	
	Transport	6 000 00,00	
	Marketing	1 200 00,00	
	<b>Total (Coût du projet)</b>		

Tableau B.1 • Coût annuel du projet

Budget d'ouverture (DA)				
		Passifs	Actifs	
ressources permanentes	6 300 00,00	Capital social	33 000 00,00	Equipements
	100 000 00,00	Dettes à long et moyen terme (ANAD)		
Ressources périodiques				
			73 300 00,00	Fonds de roulement (trésorerie)
	<b>106 300 00,00</b>		<b>106 300 00,00</b>	<b>Total</b>

Tableau B.2 Budget d'ouverture

Montant (DA)	Catégorie de charge	les charges (coûts) variables	Montant (DA)	Catégorie de charge	les charges fixes	
6 100 00,00	Matières premières		1 000 00,00	Assurance		
20 000 00,00	Produits chimiques		7 200 00,00	Loyer		
1 800 00,00	Factures		25 000 00,00	Salaires et charges sociales		
5 000 00,00	Emballage		6 600 00,00	Amortissements		
6 000 00,00	Transport		1 200 00,00	Marketing		
<b>38 900 00,00</b>	<b>Total</b>			<b>41 000 00,00</b>		<b>Total</b>

79 900 00,00	Coût total (DA)
28 820	Ventes (produit)
2 77	Prix de revient (DA)

**Tableau B.3** Charges fixes et Charges variables (pour une année)

### B.10 Sources de revenus

- Vente directe de l'hydrogel cicatrisant : Générez des revenus en vendant directement notre hydrogel cicatrisant aux professionnels de la santé, aux hôpitaux, aux cliniques et aux centres de traitement des brûlures.
- Vente en ligne : on peut créer des Créez des comptes sur les réseaux sociaux pour vendre notre hydrogel cicatrisant directement aux consommateurs. Cela nous permettra d'atteindre un public plus large et de générer des revenus supplémentaires.
- Contrats de distribution avec des partenaires : on peut établir des contrats de distribution avec des partenaires, tels que des distributeurs médicaux, des grossistes ou des entreprises spécialisées dans la distribution de produits médicaux. Ces partenaires peuvent être responsables de la commercialisation, de la vente et de la distribution de notre hydrogel cicatrisant dans des régions spécifiques, des marchés cibles ou des canaux de vente particuliers. En établissant des relations solides avec des partenaires de distribution bien établis, on peut étendre rapidement la portée de notre produit et générer des revenus supplémentaires grâce à leur expertise et à leur réseau de clients.
- Produits complémentaires : on peut développer des produits complémentaires tels que des pansements spécifiques qui peuvent être utilisés en conjonction avec notre hydrogel cicatrisant. Cela nous permettra de diversifier nos sources de revenus et de créer une offre plus complète pour nos clients.

<b>Rendement (DA)</b>			
100 %	144 100 00,00	Chiffre d'affaire C.A	1
27%	38 900 00,00	charges variables C.V	2
73%	105 200 00,00	marge sur charges variables M/CV	3
28%	41 000 00,00	charges fixes CF	4
45%	64 200 00,00	Résultat	5
	56 160 64,63 DA	Seuil de rendement (chiffre d'affaires minimum)	6
	11233 produits	Seuil de rendement (quantité)	7

**Tableau B.4** Rendement

### B.11 Le business model canvas (BMC)

Le tableau suivant formalise, en toute simplicité, le modèle d'affaires de notre projet :

Partenaires clés	Activités Clés	Propositions de valeur	Relation Client	Clients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Distributeurs médicaux pour l'expansion de la distribution et grossistes</li> <li>- Laboratoires de recherche et de développement pour l'amélioration du produit</li> <li>- Fabricants et fournisseurs d'équipements médicaux.</li> <li>- Partenariats avec des industries de la pêche et de la transformation des produits de la mer et des restaurants pour obtenir des déchets d'espèces marines riches en biomolécules</li> <li>- Partenaires de marketing et de communication pour développer des stratégies de marketing ciblées et créer du contenu pertinent</li> <li>- Ministère de la Santé</li> <li>- Ministère chargé de l'industrie pharmaceutique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Production et fabrication de l'hydrogel à grande échelle</li> <li>- Gestion de la chaîne d'approvisionnement de matières premières</li> <li>- Commercialisation et sensibilisation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hydrogel à base de biomolécules marines offrant un pouvoir cicatrisant efficace pour les brûlures du 3ème degré</li> <li>- Prix compétitif : il offre un rapport qualité-prix attractif par rapport aux autres produits sur le marché</li> <li>- Ne contient pas de substances nocives, offrant ainsi une solution sûre et non toxique pour les patients</li> <li>- Utilisation de ressources durables et d'ingrédients naturels provenant de déchets d'espèces marines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réseaux sociaux</li> <li>- Collecte et analyse des commentaires des patients.</li> <li>- Service clientèle</li> <li>- Sensibilisation et éducation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Patients souffrant de brûlures graves (brûlures du 3ème degré)</li> <li>- Hôpitaux et cliniques spécialisés dans les soins des brûlures</li> <li>- Fabricants de produits médicaux</li> <li>- Pharmacies</li> <li>- Services d'urgence médicale</li> </ul>
	<p><b>Ressources clés</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Installation de production d'hydrogel</li> <li>- Équipements de laboratoire et produits chimiques</li> <li>- Déchets d'espèces marines</li> <li>- Personnel qualifié en recherche, production et vente</li> <li>- Financement.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réduction du temps de cicatrisation et minimisation des risques d'infection</li> <li>- Réduction de la douleur, prévention des cicatrices et facilité d'application</li> </ul>	<p><b>Canaux</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sur place</li> <li>- Vente en ligne</li> <li>- Livraisons</li> </ul>	
<b>Coûts</b>		<b>Revenus</b>		
Equipements : 33 000 00,00 DA - Machines – Verrerie Fonds de roulement : 73 300 00,00 DA - Loyer - assurance - Salaires et charges sociales du personnel - Matières premières - Produits chimiques - Emballage- Transport - Factures - Maintenance et réparation - Marketing et publicité Coût du projet : 106 300 00,00 DA (Capital social : 6 300 00,00 DA)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ventes directes d'hydrogel cicatrisant aux hôpitaux, cliniques, fabricants de produits médicaux, pharmacies et services d'urgence médicale (ou vente en ligne)</li> <li>- Contrats de distribution avec des partenaires</li> <li>- Produits complémentaires (patches – pommades ...)</li> </ul> Prix de revient : 277 DA / produit Prix de vente : 500 DA / produit		

Figure B.2 Business Model Canvas

### B.12 Conclusion

En conclusion, le Business Model Canvas que nous avons élaboré pour notre entreprise met en évidence les principaux éléments nécessaires à la réussite de notre projet d'hydrogel cicatrisant pour les brûlures 3ème degrés. En vous concentrant sur notre proposition de valeur unique, notre segment de clientèle ciblé, nos canaux de distribution efficaces, nos relations clients solides, nos partenariats clés et nos principales ressources, on peut développer une entreprise solide et durable. De plus, en utilisant un modèle de tarification flexible et en explorant différentes sources de revenus, on peut maximiser les opportunités de croissance et de rentabilité. En utilisant le BMC comme guide, on peut continuer à affiner et à ajuster notre modèle d'entreprise tout en gardant une vue d'ensemble claire de notre projet.



## Résumé

Ce mémoire présente une étude sur le développement d'un hydrogel novateur à partir de coproduits marins en vue de favoriser la cicatrisation des brûlures du troisième degré. Ces coproduits ont été utilisés pour extraire des biomolécules à haute valeur ajoutée, notamment le chitosane extrait des carapaces de crustacés et le collagène obtenu à partir des peaux de poissons tels que le poisson cochon, la seiche et la sole. D'autres ressources marines, telles que les minéraux des bivalves tels que les moules et les huîtres ont également été incorporées. Une caractérisation biochimique des biomolécules extraites des coproduits marins a été réalisée, suivie d'un contrôle de qualité du produit fini. L'objectif de cette recherche était de valoriser ces ressources marines sous-utilisées tout en offrant une solution efficace pour la guérison des brûlures graves.

Le chitosane s'est révélé parfaitement soluble dans une solution d'acide acétique à 1%, avec un rendement massique de 15,16%. Le collagène a été identifié grâce aux tests du biuret et xanthoprotéique, ainsi qu'à l'électrophorèse SDS-PAGE. Son rendement d'extraction s'élève à 20,9%. Le processus de développement de l'hydrogel a impliqué différentes étapes, allant de l'extraction et de la purification des biomolécules marines à la formulation du patch et du gel cicatrisant. L'aspect macroscopique et microscopique de ce dernier est satisfaisant, il présente également une stabilité élevée, une distribution homogène et un pH neutre. Des essais pré-cliniques ont été réalisés sur des rats Wistar pour évaluer l'efficacité et la sécurité de l'hydrogel dans le traitement des brûlures du troisième degré. Les résultats préliminaires ont démontré les propriétés régénératrices et cicatrisantes des biomolécules marines utilisées plus efficace à celles du Madecassol, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans le domaine dans l'ingénierie tissulaire. En plus de la valorisation des ressources marines, cette étude offre une solution prometteuse pour améliorer les soins cliniques et la qualité de vie des patients atteints de brûlures graves.

### Mots clés :

Coproduits marin, chitosane, collagène, minéraux, hydrogel, cicatrisation , brulure 3ème degré

### Abstract

This thesis presents a study on the development of an innovative hydrogel using marine coproducts to promote the healing of third-degree burns. These coproducts were used to extract high-value biomolecules, including chitosan extracted from crustacean shells and collagen obtained from fish skins such as pigfish, cuttlefish, and sole. Other marine resources, such as minerals from bivalves like mussels, oysters, and mother-of-pearl, were also incorporated. Biochemical characterization of the extracted biomolecules from marine coproducts was conducted, followed by quality control of the final product. The aim of this research was to valorize these underutilized marine resources while providing an effective solution for severe burn healing.

Chitosan was found to be perfectly soluble in a 1% acetic acid solution with a mass yield of 15.16%. Collagen was identified through biuret and xanthoproteic tests, as well as SDS-PAGE

electrophoresis. The extraction yield of collagen was 20.9%. The development process of the hydrogel involved various steps, ranging from extraction and purification of marine biomolecules to the formulation of the healing patch and gel. The macroscopic and microscopic appearance of the hydrogel was satisfactory, and it exhibited high stability, uniform distribution, and a neutral pH. Clinical trials were conducted on Wistar rats to evaluate the efficacy and safety of the hydrogel in treating third-degree burns. Preliminary results demonstrated the regenerative and healing properties of the marine biomolecules used, which were comparable to those of Madecassol, thus opening new prospects in the field of regenerative medicine. In addition to valorizing marine resources, this study offers a promising solution to improve clinical care and the quality of life for patients with severe burns.

### Keywords :

Marine by-products, chitosan, collagen, minerals, hydrogel, wound healing, 3rd degree burn

### ملخص

تقدم هذه الأطروحة دراسة حول تطوير هيدروجل مبتكر باستخدام المنتجات المشتقة من البحر بهدف تعزيز شفاء حروق الدرجة الثالثة. تم استخدام هذه المنتجات المشتقة لاستخراج جزيئات حيوية ذات قيمة عالية، بما في ذلك الكيتوسان المستخرج من قشور القشريات والكولاجين الحاصل على من أجل الأسماك مثل السمك الخنزير، الحبار والسمكة النصلية. تمت إضافة موارد بحرية أخرى مثل المعادن من الرخويات مثل المحار والمينا. تم إجراء توصيف بيوكيميائي للجزيئات الحيوية المستخلصة من المنتجات المشتقة من البحر، تلاها مراقبة جودة المنتج النهائي. كان الهدف من هذا البحث هو تعزيز قيمة هذه الموارد البحرية التي تستغل بشكل غير كافٍ في حين توفير حلاً فعالاً لشفاء الحروق الشديدة.

تبين أن الكيتوسان ينحل تمامًا في محلول حامض الخل بنسبة 1٪، بعائد كتلة قدره 15.16٪. تم تحديد الكولاجين من خلال كانت نسبة استخراج الكولاجين SDS-PAGE اختبارات بيوريت وزانثوبروتينيك، بالإضافة إلى التحليل الكهربائي بالجل 20.9٪. شملت عملية تطوير الهيدروجل خطوات مختلفة، بدءًا من استخراج وتنقية الجزيئات الحيوية من المنتجات المشتقة من البحر إلى صياغة اللاصق والجل الشافي. كان المظهر المجهرى والماكروسكوبي للهيدروجل مرضياً، وكانت لديها استقرارية عالية، وتوزيع متجانس، ودرجة حموضة محايدة. تم إجراء تجارب سريرية على فئران ويستار لتقييم فعالية وسلامة الهيدروجل في علاج حروق الدرجة الثالثة. أظهرت النتائج الأولية الخصائص النسجية والشفافية للجزيئات البحرية المستخدمة، والتي تكاد تكون مماثلة لماديكاسول، مما يفتح آفاقاً جديدة في مجال الطب التجديدي. بالإضافة إلى تحسين استغلال الموارد البحرية، تقدم هذه الدراسة حلاً واعدًا لتحسين الرعاية السريرية وجودة حياة المرضى الذين يعانون من حروق شديدة.

### الكلمات المفتاحية:-

شيتوسان – الكولاجين – المعادن – هيدروجيل - الشفاء - حرق من الدرجة الثالثة - قشور الجمبري - جلود الأسماك،