REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par :

Menasri Khadidja & Zaidi Amina

Thème :

Formulation d'une crème cicatrisante à base de chitosane

Dr. Euldji. A	Grade : MAA	UNV-Médéa	Présidente
Dr. Ahmedi .A	Grade : MCB	UNV-Médéa	Examinatrice
Dr. ARBIA .W	Grade : MC	UNV-Médéa	Encadreur

Année universitaire : 2019/2020

ملخص

في هذا العمل حاولنا صياغة كريم علاجي بالاعتماد على مواد طبيعية (الزيوت والشمع) بالإضافة إلى المركب الحيوي الكيتوزان .نوع الاستحلاب المستعمل الزيت في الماء ،بتحسين معايير المزج و عن طريق التحاليل الفيزيوكيميائية بعد مدة محددة (الأس الهيدروجين معتدل..... ،مقاومة) تعذر علينا دراسة الخصائص العلاجية للكريم على فئران المخبر ،بسب موجة الكوفيد 19.

الكلمات المفتاحية : كريم،علاجي ،الزيوت الطبيعية، منشطات السطح (الشمع) ،الكيتوزان .

Résumé

Dans ce travail on a tenté de formuler une crème cicatrisante à base de produits naturels (des huiles et des cires), en plus du biopolymère : le chitosane. Le type de l'émulsifcation Utilisé huile dans eau (H/E) on optimisant les paramètres de formulation (physico-chimique pH neutre...). La stabilité des crèmes est l'un des paramètres clé pour une garantie la qualité et l'efficacité d'un produit. On n'a pas pu étudier l'effet cicatrisant de la crème préparée à cause du confinement suite à la pandémie COVID-19.

Mots clés : crème, cicatrisation, huiles naturelles, cire, chitosane.

Abstract

In this work we tried to formulate a Healing cream based on Natural Product (oils and wax) in addition to the biopolymer chitosane, the type of emulsification used oil in water (O/W) we have optimizing the parameters of formulation (physicochemical pH neuter…). The stability of the cream sis one of the Key parameters for a garantee of quality and effectiveness of the product. The healing effect of the prepared cream could not be studied due to containment following the COVID-19 pandemic.

Keywords : cream, healing, oils naurals, wax, chitosan.

Remerciements

Nous remercions en premier lieu Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté pour réalisé ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements au **Dr. ARBIA.Wassila** pour avoir dirige ce mémoire de fin d'études, nous leur exprimons toute notre reconnaissance pour avoir initiées et accompagnées tout au long de notre travail et pour nous leur patience, et surtout la confiance qu'elle nous a accordée durant cette période de préparation de mémoire. Elle a également d'un précieux conseil pour répondre à nos diverses interrogations.

Notre profonde gratitude et nos plus vifs remerciements à nos enseignantes **Dr. Ahmadi A**. et **Dr. Euldji Amel** qui ont accepté de juger notre modeste travail.

Que tous ceux qui ont contribué, de prés ou de loin, à la concrétisation de notre travaille voient remerciés.

Dédicace

« Il faut toujours viser la lune car même en cas d'échec on atterrit dans les étoiles »

(Oscar Wilde)

Au Nom de **Dieu** clément et Miséricordieux

C'est avec un grand plaisir que je dédie ce modeste travail à la plus proche qui m'a beaucoup encouragé à poursuivre le bon chemin, qui ma donnée l'amour ,la tendresse et la volonté .

Je dédie ce mémoire

Al 'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu le garde dans son vaste paradis.

Mon Père

A la femme de ma vie, ma raison d'être, ma raison de vivre, mon ami si cher, Un sourire tendre pour guider mon chemin .C'est la lumière du soleil pour éclairer ma journée.

Ma mère

A mes sœurs : **Hafidha, Wassila et Souhila.**

A mon seul frère : **Marouane.**

A toute mes amies et mes collègues le long de mes études.

Je vous dis Merci

MENASRI Khadîdja

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Qui sont l'origine de tous ce que je suis aujourd'hui

Et qui ont sacrifié leurs vie pour moi en témoignage de tous ceux que leurs dois :

A *la femme qui a souffert sans me laisse souffrir .qui n'a jamais dit .non à mes exigences qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse mon adorable mère*

A *l'homme. Mon précieux offre d'Allah. Qui doit ma vie .ma réussite mon cher père et grand amour que je leurs porte.*

A *mon frère pour tout le soutien et l'amour qu'il me port depuis mon enfance et jusqu'à ce moment-là.*

A *ma sœur chère, que toutes les paroles de gratitude ne remplissent pas, elle m'a encouragé et s'est tenue avec moi*

Et à mon cher mari BILAL, qui m'a encouragé et était toujours à mes côtés.

A *ma famille pour leurs prières, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour, spécialement mes belles Nessrine, Fatima, Assia, Amina, Sara, Lila Et Djamila.*

A mes fréres Azzedine, Amine, Rabeh et Mohamed

A *tous mes amis et mes collègues*

A *tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment*

SOMMAIRE

Introduction générale…….. 1

CHAPITRE I : CHITOSANE

I.1.Définition…… 2

I.2.Méthode de préparation du chitosane …… 3

I.3.Propriétés du chitosane…..…….. 3

I.3.1.Degré d'acétylation……..…… 3

I.3.2.La masse molaire (M) ou poids moléculaires (PM)…….……... 5

I.3.3.La viscosité..……..…….. 5

I.3.4.La solubilité……..……... 5

I.3.5.Polyléctrolutes en milieu acide ……..…… 6

I.3.6.Les gardes de chitosane …… 6

I.3.7.Propriétés biologique ……. 8

I.4.Application du chitosane…… 9

I.4.1.Médicale…….. 9

I.4.2.Agriculture……..……. 9

I.4.3.Cosmétique…….. 10

Chapire II : La cicatrisation cutanée

II. 1. La peau…… 11

II. 1. 1. L'épiderme……...……... 12

II. 1. 2. Le derme……. 13

II. 1. 3. L'hypoderme……... 13

II. 2. La cicatrisation …….. 14

II. 2. 1. Description des processus fondamentaux de la cicatrisation…….. 14

II. 2. 1. Le processus inflammatoire……. 15

II. 2. 1. 1. La phase vasculaire…….. 15

II. 2. 1. 2. Phase de détersion cellulaire…… 17

II. 2. 2. Phase proliférative ou processus de réparation…… 17

II. 2. 2. 1. Formation du tissu de granulation……... 17

II. 2. 2. 1. 1. Migration et prolifération fibroblastiques…… 18

II. 2. 2. 1. 2. Néo-angiogenèse……. 19

II. 2. 2. 1. 3. Synthèses fibroblastiques…….……... 19

II. 2. 2. 2. Contraction…….. 19

II. 2. 2. 3. L'épithélialisation…….. 20

II. 2. 3. Maturation…….. 21
II. 2. 3. 1. Phase de remodelage…….. 21
II. 2. 3. 2. Maturation de l'épiderme…… 22
II. 2. 3. 3. Restauration de la vascularisation et de l'innervation……. 22
II. 3. Les facteurs qui influencent la guérison des cicatrices …… 23
II. 4. Les types de la cicatrisation……. 23
II. 5. Technique d'évaluation de la cicatrisation ……. 25
II. 6. Le chitosane et la cicatrisation……. 26
I. 6. 1. Effet du chitosane sur les macrophages ……... 27
I. 6. 2. Effet de chitosane sur les fibroblastes…….. 28
I. 6. 4. Effet de chitosane sur les kératinocytes…… 28
III. Type de produits utilisés sur la peau ……. 28
IV. Les différentes formes utilisées du chitosane…… 29
IV.1. Hydrogels de chitosane…….. 29
IV.1.1. Quelques exemples d'application du chitosane sous forme d'hydrogel…….. 29
IV. 2. Le chitosane sous forme solide……. 30
IV. 3. Le chitosane sous forme particulaire……. 31
V. Mécanisme d'absorption à travers la peau…….. 31

Chapire III : Etude expérimentale

III. 1. Matériels et méthodes…… 32
III. 1. 1. Matériels……. 32
III. 1. 2. Produits…….. 33
III. 1. 2. 2. Les animaux……... 35
III. 1. 2. 1. Les huiles et beurres végétales……... 35
III. 1. 2. 3. Alimentation ……. 36
III. 1. 2. Les méthodes…… 36
III. 1. 2. 1. Formulation de la crème…… 36
III. 1. 2. 2. Caractérisation de la crème…… 38
III. 1. 2. 2. 1. Détermination du sens de l'émulsion (H/E ou E/H) par conductimétrie….. 38
III. 1. 2. 2. 2. Détermination du pH …… 39
III. 1. 2. 2. 3. Evaluation de la stabilité …….. 40
III. 1. 2. 2. 4. Stabilité thermique …… 40

III. 1. 2. 2. 5. L'examen macroscopique et microscopique …… 40
III. 1. Préparation de la crème avec le principe actif ……... 41
III. 2. Caractérisation des crèmes préparées …… 42
III. 2. 1. Détermination de conductivité……... 42
III. 2. 2. Détermination du pH…….. 43
III. 2. 3. La stabilité …… 44
III. 2. 3. 1. Test de la stabilité à la centrifugation …… 45
III. 2. 3. 2. Stabilité thermique……. 46
III. 2. 3. 3. L'examen microscopique et macroscopique …… 47
Conclusion générale …… 48
Références bibliographiques

PDGF : Platelet Derived Growth Factor .

TGF-β : Transforming Growth Factor β .

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α .

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

UV-VIS : Ultra-violet-visible.

Symboles	**Signification**
DA	Degré d'acétylation
DD	Degré de désacétylation
DP	Degré de polymérisation
K. a	des paramètres qui dépendent du système polymère-solvant à une température donnée.
M	Masse molaire (g /mol
η	Viscosité intrinsèque (cm^2/ml)

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : Chitosane

Fig. I. 1. Structure chimique (a) de la chitine (b) du chitosane ……... 2
Fig. I. 2. Processus d'obtention du chitosane à partir des carapaces de crustacés …….. 4

CHAPITRE II : La cicatrisation cutanée

Fig. II. 1 : structure de la peau et de ses annexes……. 11
Fig. II. 2. Organisation schématique de l'épiderme……. 12
Fig. II. 3. Ordre séquentiel des phases de la cicatrisation adaptée d'après…….. 14
Fig. II. 4. Phase inflammatoire du processus de cicatrisation d'après …… 16
Fig. II. 5. Phase proliférative du processus de cicatrisation d'après……..... 18
Fig. II. 6. Guérison d´une plaie par première et seconde intention……..... 22
Fig. II. 7. Cicatrice hypertrophique…….. 24
Fig. II. 8. Cicatrice chéloïdienne…….. 24
Fig. II. 9. Cicatrice chéloïdienne et hypertrophique…… 25
Fig. II. 10. Evaluation de la cicatrisation par mesure directe des dimensions de la plaie à la règle ……..... 26
Fig. II. 11. Hydrogel bicouche de chitosane (a) : phase destinée à être en contact avec la plaie, (b) : couche externe…… 30

CHAPIRE III : Etude expérimentale

Fig. III. 1. Les animaux…… 35
Fig. III. 2. L'alimentation des rats de laboratoire (originale 2020)…….. 36
Fig. III. 3. Diagramme de fabrication d'une émulsion H/E……. 36
Fig. III. 4. (a) Préparation de la phase aqueuse et la phase huileuse (b) Chauffage des deux phases et la fusion de la phase huileuse……... 38
Fig. III.5. Membranes de chitosane obtenues avec 0.5% et 2%. ……. 41
Fig. III.6. La crème préparée…… 42
Fig .III.7. Mesure de conductivité…… 42
Fig.III.8. Mesure de pH…… 43
Fig. III.9. Etude de la stabilité par centrifugation…… 45
Fig. III.10. Examen microscopique et examen au bleu de méthylène de la crème (a) 1% (b) 2% et (c) 3% de chitosane…….. 46

CHAPITRE I : CHITOSANE

Tableau I.1. Corrélation entre les valeurs de DD et la solubilité du chitosane à pH 6…….6

Tableau I.2.Liste de différents gardes de chitosane……7

Tableau I.3.Liste d'entreprises qui vendent des lots de chitosane ……..8

Tableau I.4.Les propriétés du chitosane ……9

Tableau I.5.Les principales applications du chitosane……..10

CHAPIRE II : LA CICATRISATION CUTANEE

Tableau II. 1. Les facteurs influençant la guérison des cicatrices ……23

CHAPIRE III : ETUDE EXPERIMENTALE

Tableau III. 1. Le matériel utilisé dans la réalisation de ce travail ……32

Tableau III. 2. Les produits utilisés dans la réalisation de ce travail……..33

Tableau III.3. La composition et les proportions des constituants de la phase aqueuse …..37

Tableau III. 4. La composition et les proportions des constituants de la phase huileuse ….37

Tableau III.5. Résultats de mesure de la conductivité…….43

Tableau III.6. Résultats de mesure du pH……...44

Tableau III. 7. Etude de la stabilité de différentes émulsions préparées ……44

Tableau III. 8. Test de la stabilité physique, des crèmes préparées, aux différentes températures ……...45

INTRODUCTION

De nos jours, la formulation est devenue l'une des branches les plus importantes grâce au développement et l'innovation qui ne cessent d'accroitre. La formulation est une activité technologique son objectif est la conception et la mise au point de produits artisanaux au industriels, elle consiste à mélanger différents composants afin d'en arriver à une formule permettant d'avoir un produit stable, non toxique et homogène.

Au jour d'hui, il existe sur le marché des produits pharmaceutiques et parapharmaceutiques à base de matière première synthétiques nocive pour la santé humaine et aussi sur l'environnement(Adim et Belkhir, 2016).

Comme nous savons que formulation comprend généralement un ou plusieurs composés actifs ou de base, des charges et des additifs (conservateurs, colorants ……). Pour cela nous allons faire mélanger différents matières premières naturelles à des proportion bien déterminées permettant de formuler une crème naturelle ou bio conforme, respectant les exigences et répondant aux besoins des consommateurs (Adim et Belkhir, 2016).

Dans ce manuscrit, ou l'objectif de notre travail était la formulation d'une crème cicatrisante et de tester son effet sur les rats de laboratoire. Dont le principe acitif, le chitosane est un dérivé de la chitine extraite à partir des carapaces de crevette. Malheureusement cette dernière partie n'a pas eu lieu à cause du confinement engendré par la pandémie du corona virus. Donc on s'est contentée de la formulation d'une crème à base de produits naturels ayant une bonne consistance et stabilité ainsi qu'une utilisation confortable.

Notre manuscrit est structuré en trois chapitres :

- Une étude bibliographique, organisée en deux chapitres :
- Le premier chapitre présente des généralités sur le principe actif (le chitosane) : définition, sa source et sa méthode de préparation, ses propriétés et ses applications ;
- Le deuxième chapitre, consiste en des donnés théorique fondamentales présentant la peau et ses différents composants, les types et les techniques d'évaluation de la cicatrisation ;
- Une étude expérimentale, organisée en deux parties
- Partie I, représente notre travail pratique relatif à la formulation et la caractérisation des formules préparées ; ou on a également présenté le matériel et les méthodes utilisés.
- Partie II, était consacrée à présenter les résultats de nos expériences ainsi que leurs interprétation.

En fin, le manuscrit s'achève par une conclusion générale et les perspectives qui peuvent être envisagées à l'avenir.

CHAPITRE I

CHITOSANE

I. 1. Définition

Le chitosane est un polymère naturel de la famille des polysaccharides d'origine biologique (Payet et al., 2002). Il s'agit d'un copolymère linéaire composé d'unités monomériques de D-glucosamine et de N-acétyle-D-glucosamine (fig. 1a). Ces unités monomères sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β (1- 4) (Le venson, 2010). La chitine est la source la plus intéressante du chitosane ; obtenu par N-désacétylation de la chitine (fig. 1b).

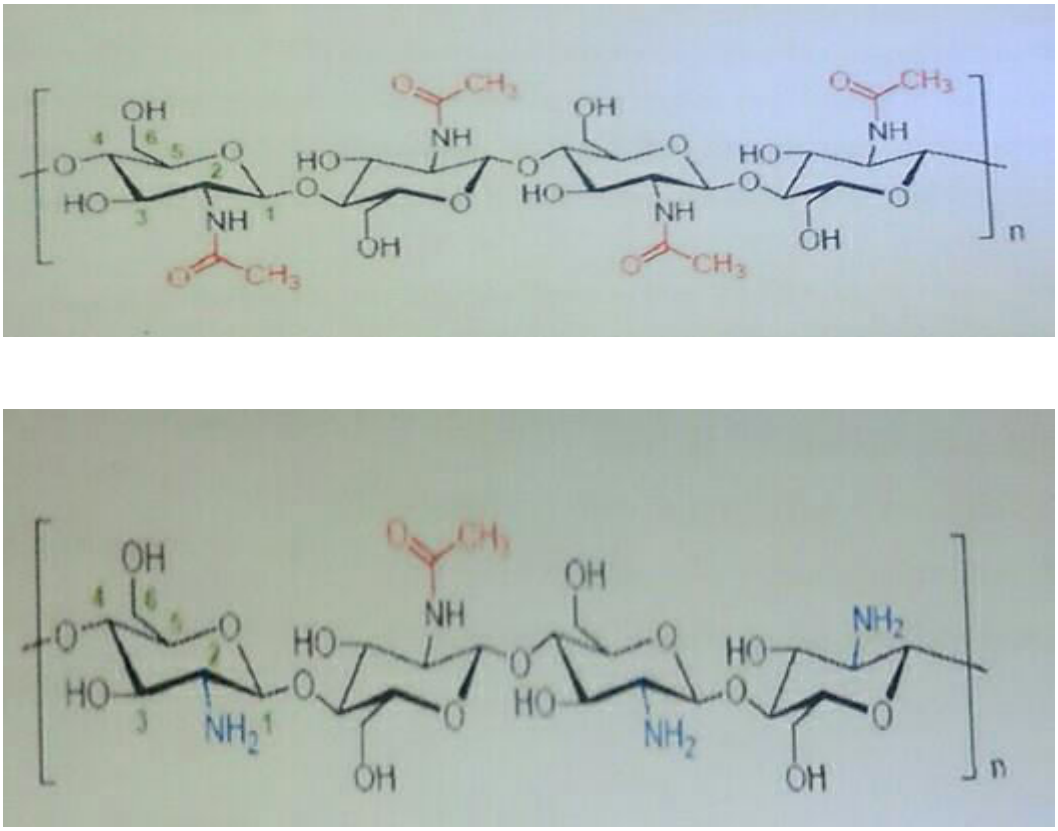


Fig. I. 1. Structure chimique (a) de la chitine (b) du chitosane (Nugraha, 2006 ; Truong et al., 2007)

Ces deux biopolymères chitineux se différencient par la proportion des unités acétylées présentes dans le copolymère ; appelé aussi le degré d'acétylation (DA). Bien que le terme « chitosane » soit habituellement limité à toute chitine suffisamment désacétylée (Amiali, 1999). Le chitosane soluble dans les acides faibles ; possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Benbettaieb, 2015).

Généralement, le chitosane a trois types de groupements fonctionnels réactifs :

- Les groupements amines sur le carbone C(2) ;
- Les groupes hydroxyles primaires et secondaires sur le carbone C(3) et le carbone C(6) (Benbettaieb, 2015).

I. 2. Méthode de préparation du chitosane

Il se trouve plus rarement dans la nature : il n'est présent que dans les parois d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes et chez quelque insectes. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine (poly N-acétyle-D-glucosamine) (Fig. I. 2). La chitine est le composant structural primaire des exosquelettes des crustacés. Il est préparé à partir de la chitine dans une solution d'hydroxyde de sodium concentrée avec une température entre (110-115°C) pendant quelques heures, en atmosphère inerte et en présence d'un agent réducteur ($NaBH_4$), selon la réaction suivante :

$$\underset{\text{Chitine}}{R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}CH_3} + NaOH \Rightarrow \underset{\text{Chitosane}}{R\text{-}NH_2} + CH_3COON \quad (1)$$

Le chitosane obtenu, doit être séché puis redissous dans une solution d'acide organique afin de le purifier. La solution acidifiée est alors filtrée et séchée (Gini et Guibal, 2007). En effet, il est à noter que les quatre étapes d'extraction de la chitine déprotéinisation, déminéralisation, décoloration et l'étape de désacétylation influencent la qualité du chitosane (Gini et Guibal, 2007).

I. 3. Propriétés du chitosane

I. 3. 1. Degré d'acétylation

La principale différence entre la chitine et le chitosane réside dans le degré d'acétylation (DA) ou le degré de désacétylation (DD) (Marchand, 2010). Le DA représente la fraction d'unité N-acétyle-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unîtes sucrées. Selon la valeur du degré d'acétylation des composés, on parlera soit de la chitine (DA>50%), soit du chitosane (DA<50%) (Hassani et al., 2012).

Le DA est un paramètre fondamental qui a une forte influence sur les propriétés du matériau à l'échelle moléculaire et en solution comme la solubilité, la viscosité et la flexibilité des chaines (Hijazi, 2014).



Extraction

Chitine + Protéines + Pigments + Lipides + matériaux inorganiques($CaCo_3$)

Purification

(Déminéralisation + Déproétinisation)

Chitine

Désacétylation

Chitosane

Fig. I. 2. Processus d'obtention du chitosane à partir des carapaces de crustacés

De nombreuses techniques ont été mises au point pour mesurer le DA du chitosane à savoir, titrage potentionmétrique ou volumétrique, le spectromètre infrarouge (IR) le spectrophotomètre ultraviolet (UV-vis), l'analyse élémentaire et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Badaoui, 2012). Le DA est déterminé en utilisant la formule :

$DA\ (\%) = (A_{1655}\ cm^{-1} / A_{3450} cm^{-1}) * 100 / 1,33$ …..……(2)

Ou

$DD\ (\%) = \%NH_2 = [1 - (A_{1655}/A_{3450}) * 1/1,33] * 100$ …..……(3)

Avec :

* $A_{1655}\ cm^{-1}$ est l'absorbance à la longueur d'onde $1665 cm^{-1}$ (Amide I$1655 cm^{-1}$) ;

* $A_{3450}\ cm^{-1}$ est l'absorbance à la longueur d'onde 3450 cm^{-1} (hydroxyde 3450 cm^{-1}) ;

* Le facteur 1,33 représente le rapporte (A_{1655}/A_{3450}) pour un chitosane entièrement N-acétyle.

I. 3. 2. La masse Molaire (M) ou le Poids Moléculaire (PM)

La masse molaire en masse ou en nombre joue un rôle important dans la solubilisation et la viscosité des solutions du chitosane. La valeur de la masse moléculaire d'un chitosane dépend fortement du procèdes de fabrication car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaines macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production.

Les chaines du chitosane ont des masses allant de 100 à 1000 kDa dont le choix doit être adapté à l'application pour avoir des résultats optimal (BENBETTAIEB, 2015). En effet, la masse moléculaire affecte la solubilité du chitosane et ces propriétés rhéologique, notamment sa viscosité (Hijazi, 2014).

I. 3. 3. La viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation de ce polymère plus il est désacétylé, plus il y a des groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante (Wang et Xu, 1994). La viscosité dépend également de la concertation du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente) (Chen et Tsaih, 1998), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) (Berth et Peter, 1998) et en fin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée). Pour déterminer la viscosité, il existe différentes méthodes. La plus employée est «la viscosimétrie». Elle nécessite la connaissance des paramètres K et a de la relation de MARK-Houwink (Amiali, 1999).

$$[\eta] = K \cdot M^{a} \quad \text{.........} (4)$$

Avec :

[η] : la viscosité intrinsèque ;

M : le poids moléculaire moyen du polymére ;

K et **a :** des paramètres qui dépendent du système polymère-solvant à une température donnée.

I. 3. 4. La solubilité

En générale, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de DD (tableau I. 1), de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupements acétyles le long de la chaine macromoléculaire. Il est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ces fonctions amines. Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, et cela favorise donc la solubilité du chitosane. Ce dernier est, en effet, insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les

solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau. L'acide le plus utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué (0.1-1%) (Alja, 2013).

Tableau I. 1. Corrélation entre les valeurs de DD et la solubilité du chitosane à pH 6(Makrani, 2013).

DD%	Solubilité du chitosane
>75	Parfaite
=50	Moyen
<40	Faible

A pH acide, ou il est soluble, le chitosane porte de nombreuses charges positives. Il est donc un bon agent de floculation et un bon agent de coagulation. Il peut interagir avec des molécules chargées négativement (par exemple acides gras, protéines …) et former aussi des complexes polyanion-polycation. Cette propriété lui ouvre de multiples applications notamment en dermo-cosmétologie : elle permet d'interagir de façon très intime avec la kératine de la peau et ainsi former un film à la surface de celle- ci.

A pH basique, (>6.5), le chitosane perd ses charges positives et le doublet électronique de l'azote est libre. Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des métaux lourds. Il est donc utilisé pour la purification des eaux, par exemple pour la récupération de métaux dans les effluents industriels (Makrani, 2013).

I. 3. 5. Polyléctrolyte en milieu acide

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationique et il est une base faible présentant un pka voisin de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation des fonctions amines présents sur la macromolécule. En dessous de ce pka, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau acidifiée. Au-dessus du pka, les groupements amines sont déportonés et le chitosane est insoluble dans l'eau. Le pka du chitosane dépend du degré de neutralisation des groupes NH^{+}_{3} et du DD. En générale, la valeur du pka augmente quand le DD diminue (Alja, 2013).

Les propriétés particuliéres du chitosane sont liées essentiellement à la présence de la fonction amine portée par le carbone C (2).

I .3. 6. Les grades de chitosane

L'extraction de la chitine et sa transformation en chitosane permettent d'obtenir différents grades de chitosane à savoir : le garde pharmaceutique, alimentaire, cosmétique, technique (Imzi et Ziane, 2018). Ces chitosanes se diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques (tableau I. 2).

Tableau I. 2. Liste des différents grades de chitosane(Imzi et Ziane, 2018).

Origine de la chitine	Grades de chitosane	Degré de désacétylation	Viscosité
Champignon	Cosmétique	85% - 92%	10-100
Champignon	Pharmaceutique	90% - 95%	-
Arthropodes	Alimentaire	85% - 92%	-
Arthropodes, Céphalopodes	Technique	80% - 90%	50-250
		75% - 85%	200-750
		75% - 83%	700-2100

Les grades de chitosane pharmaceutique et cosmétique ont un DD supérieur à 90%. Une haute pureté est requise pour entrer dans la préparation de crèmes ou médicaments. C'est la raison pour laquelle le chitosane utilisé pour ce garde, est issu de champignons ou d'insectes.

Le garde alimentaire possède un DD entre 85 et 90%. Une grande pureté du produit est également requise, car ce polysaccharide peut entrer dans la composition de produits alimentaires ou être utilisé dans le domaine de l'emballage alimentaire. Le garde technique du chitosane possède un DD entre 70 et 90% (Imzi et Ziane, 2018).

Les principaux producteurs de chitine et de chitosane sont, dans l'ordre, le Japon, l'Inde, les Etats-Unis et l'Europe. Le Japon reste leader dans la production, la commercialisation et la consommation. La production mondiale de la chitine est estimée entre 2000 et 3000 $t.an^{-1}$ dont 60 et 70% sert à la production du chitosane. Au Japon, on peut trouver plusieurs produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pates de soja). Aux Etats –Unis, le chitosane n'est autorisé que comme complément alimentaire pour réguler la flore intestinale et favoriser l'élimination du cholestérol (Imzi et Ziane, 2018). Le prix de vente du chitosane varie entre 20 et 10000 euros le kilogramme en fonction de ses caractéristiques (tableau I. 3).

Tableau I. 3. Liste des entreprises qui vendent des lots de chitosane (Soteller et al., 2008).

Entreprise	Pays	Caractéristiques
Sigma Aldrich	Etats-Unis	Origine : Arthropodes, Céphalopodes Haute pureté. Masse molaire : 60 kDa-1000 kDa DD >85%
TCI Europe	Europe, Etats-Unis, Asie	Origine : Arthropodes, Céphalopodes. Masse molaire : 60 kDa- 800 kDa DD >75%
Chitosanelab	France	Origine : Arthropodes, Céphalopodes. Masse molaire : 60 kDa- 1000 kDA DD >99%
Glentham Life Science	Angleterre	Origine : Arthropodes, Céphalopodes. Masse molaire : 30 kDa-1800 kDa. DD >90%

I. 3. 7. Propriétés biologiques

Le chitosane est un biopolymère qui possède différentes propriétés biologiques en plus de ses propriétés physicochimiques (tableau I. 4). Il est biodégradable, biocompatible, ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère antithrombogenique et hémostatique. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables. En plus de ces propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections, il présente des propriétés immunologiques antitumorales, antibactériennes et antifongiques (Ararem, 2010).

Le chitosane a également des propriétés cicatrisantes. Car il a la capacité de former des films perméables qui sont utiles dans la peau artificielle et dans d'autre produit ou la flexibilité, protection et la non allergique sont essentiels (Maachou, 2005). Il a la capacité d'augmenter la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes (Adim et Belkhir, 2016).

Le chitosane est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages par exemple un mélange de chitosane et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes. Le HemCon ®Bandage (Adim et Belkhir, 2016).

Tableau I. 4. Les propriétés du chitosane (Khelil cherfiA,Rahmani.A,2018).

Propriétés	Description
Physico-chimiques	-Polyamine linéaire, hydrophile -Structure semi-rigide, réactive -Matériau brut non preux
poly électrolytes	-Polymères cationiques à forte densité de charge
Biologiques	-Matériau non toxique -Substance biocompatible -Bio résorbable biodégradable -Activité antibactérienne et antifongique -Agent hypocholestérolémiant -Activité hémostatique -Stimule la croissance cellulaire
Filmogènes : interactions avec d'autres substances	Complexassions /chélation Propriétés de coagulation /floculation et adsorption Propriétés de rétention d'eau Propriétés d'adhésion

I. 4. Applications du chitosane

Le chitosane possède des nombreuses propriétés physico-chimiques intéressantes qui ont permis d'entrevoir de nombreuses applications potentielles. Les premières applications ont été développées en pharmacologie, cosmétologie et en médecine…..etc.

I. 4. 1. Médicale

Le chitosane a démontré son efficacité pour toute forme de pansements peau artificielle, fil de structure ….En chirurgie dentaire, le chitosane est utilisé dans les implants ou dans la cicatrisation des plaies (voir chapitre II) et gencives. Kim et ses collaborateurs (2007), ont montré que l'application du chitosane et de ses dérivés dans les organes artificielle comme le foie, les nerfs, les os, la peau les cartilages, les vaisseaux sanguins…. etc (kim et al., 2007).

En outre, c'est un bon support pour le transport et le relargage lent des principes actifs médicamenteux pour des applications dans la santé humaine et animale (Chen et al., 2007 ; Guo et Gao, 2007).

I. 4. 2. Agriculture

Le chitosane est capable de déclencher chez les plantes des mécanismes de défense contre les infections et les agressions parasitaire et ceci avec des doses extrêmement faibles. De l'ordre de quelque milligramme par mètre cube d'eau. Ils peuvent être utilisés en solution, en poudre, ou en enrobage de semences (Li et al., 1997). Il est utilisé dans l'emballage grâce à sa biodégradabilité.

I. 4. 3. Cosmétique

Le chitosane forme à la surface de la peau un film protecteur, capable de fixer d'autres principes actifs pour la peau. Il est utilisé comme filtre solaire et rentre dans la composition de la pâte des dentifrices, crème de soins et les shampoings. De nombreux brevets ont été déposés dans ce domaine (Ravikumar et Dutta, 2002). Le tableau I.5, résume les principales applications du chitosane.

Tableau I. 5. Les principales applications du chitosane.

Domaine Médicale	Structure chirurgicales. Implants dentaires. Peaux artificiels
Domaine cosmétique	Crème de traitement de l'acné Formulation de dentifrices Formulation de shampooing
Domaine agriculture	Stimule la croissance des planes Libération de fertilisants et nutriments
Traitement des eaux	Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentaire	Agent de conservation Stabilisateur antimicrobien Enrobage protecteur (fruits)
Biopharmaceutique	Anticoagulants Libération contrôlées (matrices)
Clinique	Membranes de dialyse, pansements
Traitement des eaux	Agent floculant de cation

CHAPITRE II

LA CICATRISATION CUTANEE

II. 1. La peau

La peau est un organe complexe recouvrant le corps en entier. Son poids totalise environ 15% du poids total du corps d'un adulte, ce qui lui vaut le titre du plus grand et du plus important (de par sa surface) organe du corps humain. Elle assure plusieurs fonctions nécessaires à la survie de l'organisme comme la protection contre les agressions physiques, chimiques et biologiques extérieures (Wysocki, 1999 ; Kanitakis, 2002). Elle a aussi un rôle dans la régulation thermique, l'excrétion, l'immunité, la synthèse de la vitamine D et elle constitue un excellent capteur d'informations extérieures grâce aux milliers de terminaisons nerveuses qu'elle contient. De plus, les nombreux vaisseaux sanguins qui traversent le derme transportent de 8 à 10% du sang en circulation dans le corps, ce qui fait de la peau un important réservoir sanguin (Tortora et al., 1994). La peau normale humaine est constituée de trois couches principales dont les cellules interagissent ensemble afin d'assurer ses différentes fonctions. La partie superficielle, l'épiderme, est mince et composée d'un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé. Elle est attachée à une couche interne plus épaisse, formée de tissu conjonctif, le derme. La dernière couche, l'hypoderme (fig. II. 1), est la couche sous-cutanée, composée de tissus conjonctifs auréolaires et adipeux. Les fibres du derme s'y rattachent et fixent ainsi la peau puisque l'hypoderme est lui-même fermement attaché aux tissus et organes sous-jacents (Gartner et al., 1992 ; Tortora et al., 1994).

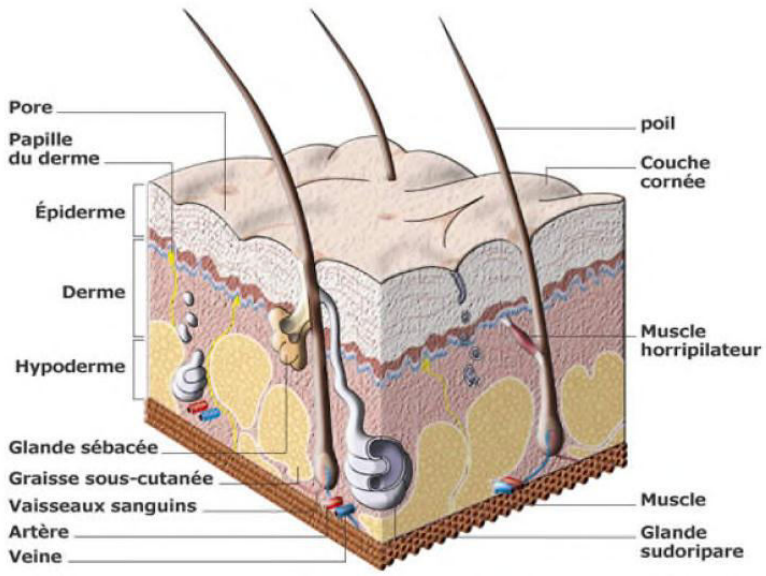


Fig. II. 1 : structure de la peau et de ses annexes (L'OREAL, 2005 cité par ferraq, 2007)

II. 1. 1. L'épiderme

C'est la couche la plus superficielle, celle qui est en contact avec l'extérieure. Elle est composée de cellules mortes qui sont éliminées continuellement. Il est organisé en sous-couches, la couche cornée (ou stratum Corneum), la couche claire (stratum lucidum), la couche granuleuse (stratum granulosum), la couche épineuse ou couche de Malpighi (stratum spinosum) et enfin la couche basale ou lame basale (stratum germinativum) (Fig. II. 2). Son rôle est d'assurer l'imperméabilité et la résistance de la peau.

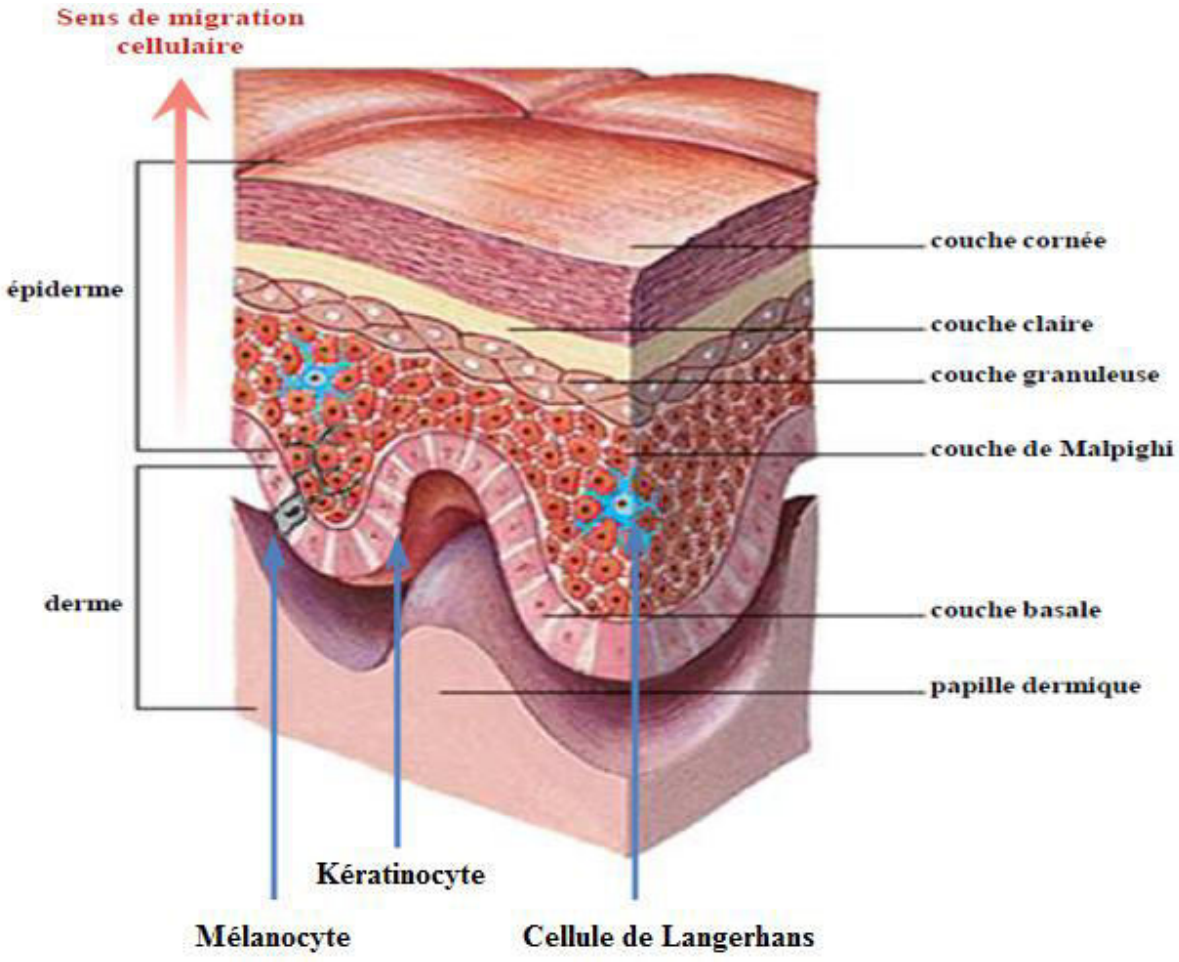


Fig. II. 2. Organisation schématique de l'épiderme (Blanchemain, 2014)

L'épiderme est constitué des :

- **Kératinocytes**

Issues de la couche la plus profonde de l'épiderme (appelée couche germinative ou couche basale), ils migrent à la surface de la peau et se renouvellent régulièrement. Ils sont remplis de Kératine, des filaments très résistants, les mêmes que ceux trouvés dans les cheveux et les

ongles, et de lipide. Durant leur migration, ces cellules s'aplatissent peu à peu et finalement meurent à la surface de la peau. Elles forment alors la couche cornée (fig. II. 1), véritable bouclier semi-perméable. De 50 microns au niveau des paupières, la couche cornée peut atteindre un centimètre aux paumes et aux plantes de pieds (Marty et al., 1993).

- **Mélanocytes**

Sous l'effet des ultraviolets, ces cellules produisent la mélanine, le pigment à l'origine du bronzage. La mélanine est transférée aux kératinocytes dont elle protège le noyau (Marty et al., 1993).

- **Cellules de Langerhans**

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques non pigmentées, qui ne contiennent pas de desmosomes ni de tonofibrilles (Parisot, 2004). Il s'agit de cellules immunocompétentes provenant de la moelle osseuse. Les mécanismes de leur migration dans l'épiderme et leur relation avec d'autres cellules dendritiques sont sujet de controverse ; leur cytoplasme contient des granules spécifiques, appelés granule de Birbeck (Bieber et Bruijnzeel-Koomen, 1990).

Les cellules de Langerhans sont une véritable sentinelle immunitaire de l'épiderme ; elles jouent un rôle dans l'immunité non-spécifique, par présentation d'antigène phagocyté aux lymphocytes T, qui réagissent en induisant la réponse immune (Banchereau et al., 2000).

II. 1. 2. Le derme

Le derme (fig. II. 2) est la couche qui donne la souplesse et la résistance à la peau. Il est composé principalement de tissu conjonctif qui le rend compressible et élastique. Il constitue un support pour les différentes annexes cutanées que sont les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les poils, les terminaisons nerveuses, les glandes sébacées et sudoripares (fig. II. 1). Ces annexes sont en fait entourées de fibres majoritairement constituées de collagènes de types I et III, arrangées en filet pour assurer souplesse et solidité. L'épaisseur du derme varie considérablement selon la localisation anatomique. Par exemple, il est beaucoup plus épais dans la plante des pieds que dans les paupières. En moyenne, il a une épaisseur de deux millimètres, mais peut atteindre quatre millimètres dans certaines parties du corps (Wysocki, 1999). Le derme peut être divisé en deux parties distinctes : le derme papillaire (superficiel) et le derme réticulaire (profond).

II. 1. 3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué de tissus adipeux qui ont pour fonction d'emmagasiner l'énergie sous forme de graisse. En fait, environ la moitié de tout le gras emmagasiné dans le corps humain est retrouvée dans cette couche.

L'hypoderme joue aussi un rôle de thermorégulation et de protection contre les agressions mécaniques. Les cellules qui peuplent l'hypoderme s'appellent les adipocytes, ce sont des cellules rondes remplies d'acides gras et de triglycérides (Kanitakis, 2002). Cette couche contient aussi des fibroblastes et des macrophages, en plus de vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses. Ces dernières sont aussi appelées corpuscules de Pacini ou corpuscules lamellaires et sont sensibles à la pression (Wysocki, 1999).

II. 2. La cicatrisation

La cicatrisation est un mécanisme physiologique complexe de réparation des tissus. Le processus de cicatrisation cutanée apparaît lorsque la peau présente une plaie récente (plaie aigüe) ou lorsque des altérations entraînent un retard de la cicatrisation normale (plaie chronique). Ce dernier cas s'observe dans de nombreuses maladies qui ne seront pas abordées ici.

Elle a pour but de reconstituer les composants de la matrice extracellulaire (MEC), restaurer les structures et les capacités fonctionnelles du derme et de l'épiderme (Brodeau, 2015).

II. 2. 1. Description des processus fondamentaux de la cicatrisation

La cicatrisation est un phénomène continu comportant quatre phases : les phases vasculaire et de détersion pouvant être réunies au sein du processus inflammatoire, suivies des phases de réparation (phase proliférative) et de maturation (phase de remodelage). Toutes ces phases sont interdépendantes et se chevauchent sans séparation stricte dans le temps (Fig. II. 3). Les caractéristiques de durée et d'intensité pour chaque phase, varient en fonction de la plaie

et du mode de cicatrisation (Hé, 2006 ; Kumar et al., 2007 ; Guo et Dipietro, 2010).

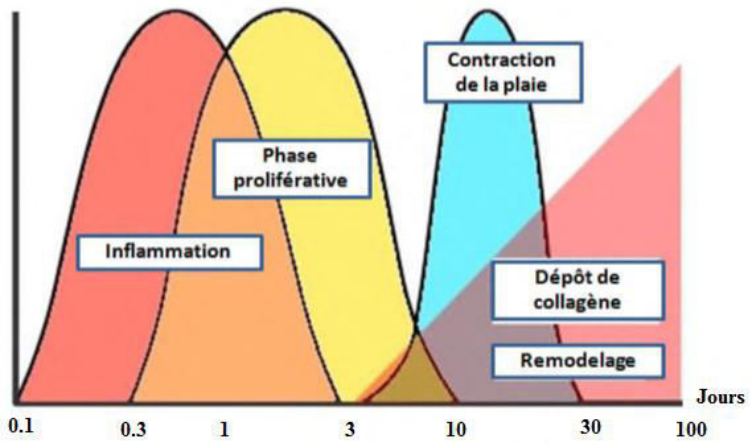


Fig. II. 3. Ordre séquentiel des phases de la cicatrisation adaptée d'après (kumar et al .2007)

II. 2. 1. Le processus inflammatoire

Le déclenchement de la réaction inflammatoire est lié à une rupture d'équilibres dans le tissu conjonctivo-vasculaire causé par la plaie. Il s'agit d'une réaction qui vise à limiter l'extension des dommages dus à l'agression tissulaire, grâce à la phase vasculaire de l'inflammation et à assurer la détersion grâce à la phase cellulaire (Verola, 2006) (Fig. II. 3).

La phase inflammatoire débute quelques minutes après le traumatisme et atteint son maximum entre 3 et 5 jours. Elle diminue rapidement jusqu'au 15ème jour où elle atteint un plateau, pour diminuer beaucoup plus lentement ensuite (Gerbault, 1999).

II. 2. 1. 1. La phase vasculaire

Egalement désignée comme la phase de latence ou la phase de préparation de la guérison. Une hémorragie plus ou moins intense a lieu au sein de la plaie et permet l'extravasation des éléments contenus dans le sang. Les plaquettes s'accumulent sur le site de la lésion et adhérent aux parois vasculaires lésées.

Simultanément, une vasoconstriction fugace débute au cours des 5 à 10 minutes suivant le choc vulnérant. La vasoconstriction couplée aux mécanismes de coagulation permet d'arrêter le saignement des vaisseaux. Un caillot (fig. II. 4) comble la perte de substance et unit les lèvres de la plaie. Il évoluera en croûte par rétraction et dessiccation. La vasoconstriction provoque également une anoxie des tissus voisins dont le pH diminue par production d'acide lactique. Cette baisse de pH entraîne la libération d'amines vasoactives et d'enzymes lysosomiales (Johnston, 1990 ; Witte et Barbul, 1997 ; Theoret, 2004).

Ces substances initient le stade de la réaction vasculaire : au bout de 5 à 10 minutes une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire sont observés, responsables de dépôts de fibrine et de margination leucocytaire. Les fluides, issus des vaisseaux et contenant des enzymes, des protéines et des anticorps, diluent les substances toxiques et facilitent les mouvements des cellules dans la zone lésée (Knottenbelt , 2003; Theoret, 2004).

Le caillot qui se forme alors permet non seulement de combler la perte de substance et d'unir les lèvres de la plaie, mais aussi de limiter l'infection et la perte de fluides. En outre, ce caillot de fibrine fournit une matrice extracellulaire nécessaire à la migration ultérieure des neutrophiles, fibroblastes et des cellules endothéliales (Theoret, 2004 ; Williams, 1988).

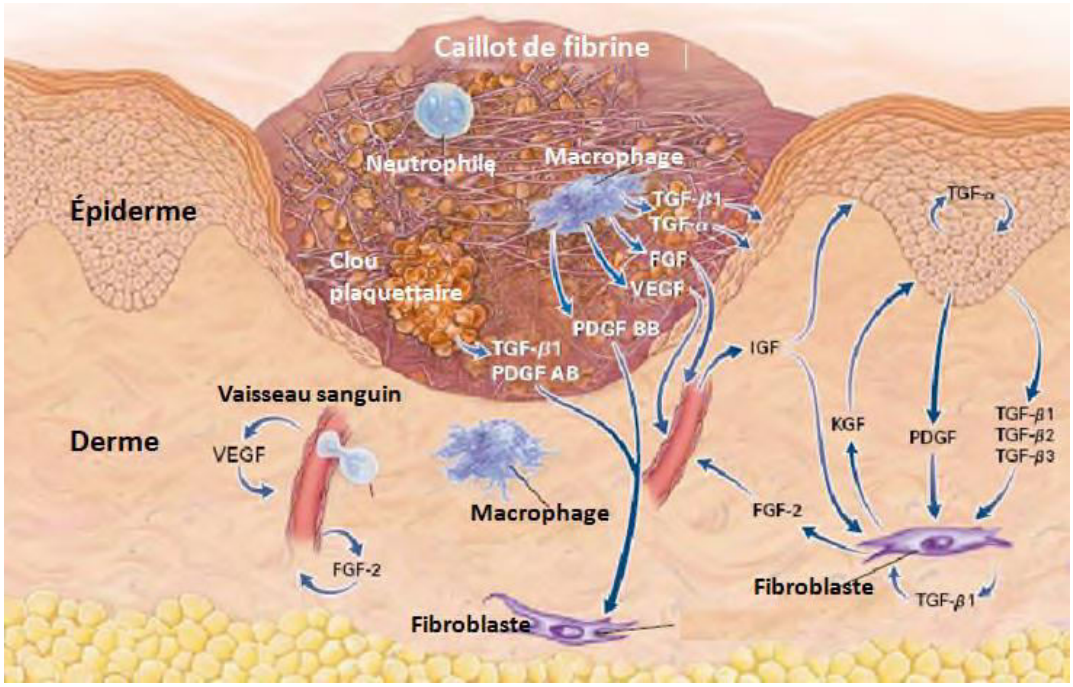


Fig. II. 4. Phase inflammatoire du processus de cicatrisation d'après Singer et Clark (1999)
Les divers cytokines et facteurs de croissance (TGF, IGF VEGF ….) illustrés dans la figure sont accompagnés de flèches indiquant leur origine ainsi que leurs cellules cibles

Les plaquettes activées vont libérer des cytokines et de nombreux facteurs de croissances : PDGF (platelet derived growth factor), TGF-β (Transforming Growth Factor beta), IGF-1 (Insuline-like Growth Factor) et EGF (Epidermal Groth Factor) (Johnston, 1990 ; Knottenbelt, 2003 ; Witte et Barbul, 1997). Ces facteurs de croissance sont dotés de nombreuses fonctions :

- Chimiotactiques pour les leucocytes, macrophages, fibroblastes et les cellules musculaires lisses ;

- Activation des leucocytes, macrophages et fibroblastes ;

- Mitogènes pour les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ;

- Stimulation de la synthèse de collagène ;

- Stimulation de l'angiogénèse, de la contraction et du remodelage de la plaie.

A eux seuls, ces facteurs de croissances sont capables d'induire toute l'activité biologique nécessaire à la formation du tissu de granulation (Williams, 1988 ; Stashak, 2008 ; Pavletic, 2010).

II. 2. 1. 2. Phase de détersion cellulaire

C'est une phase catabolique de phagocytose et de lyse qui débute très tôt après la constitution de la plaie et ne s'arrête qu'après élimination de tout matériel (bactéries, débris nécrotiques, excès de fibrine, corps étranger…) pouvant entraver la cicatrisation.

Les premiers leucocytes à arriver au niveau de la plaie sont les granulocytes neutrophiles qui ont comme rôle le contrôle de l'infection (phagocytose des bactéries, des débris tissulaires et des complexes immuns).

Après une durée de vie brève (moins de 2 à 3 jours lors d'inflammation), ces leucocytes dégénèrent rapidement et meurent en libérant des enzymes lytiques de leurs lysosomes ainsi que des métabolites à effet phlogogène (radicaux oxydants, LTB4) qui participeront à la lyse des débris cellulaires nécrotiques. L'ensemble exsudat inflammatoire, leucocytes dégénérées, et tissus nécrosés forment un exsudat ayant les mêmes caractéristiques que le pus (Johnston, 1992 ; Fowler, 1993).

Les neutrophiles sont rapidement remplacés par les macrophages. Le recrutement de ces dernières s'effectue à partir de monocytes circulants et à partir de cellules « locales » du système des phagocytes mononuclées. En plus de leur activité prédominante de phagocytose et de collagénolyse, les macrophages sont également une source importante de nombreux médiateurs qui jouent des rôles importants au cours du processus de cicatrisation (recrutement et activation cellulaires, synthèse matricielle et angiogenèse (Diegelmann, 1997 cité par Teller et White, 2009). Une fois finie, la détersion laisse derrière elle un foyer propre contenant de nombreux facteurs qui vont stimuler les acteurs des phases suivantes de la cicatrisation.

II. 2. 2. Phase proliférative ou processus de réparation

Appelée également phase proliférative, en raison de l'importance des proliférations cellulaires, cette phase regroupe deux grands phénomènes anaboliques : la formation du tissu de granulation et l'épidermisation qui va recouvrir ce tissu.

II. 2. 2. 1. Formation du tissu de granulation

Parallèlement à la détersion, se met progressivement en place le «tissu de granulation » ou «tissu de bourgeon charnu» qui va combler la perte de substance résultant de l'agression et de la détersion (Verola, 2006). Ce tissu transitoire est constitué de fibroblastes (et myofibroblastes) synthétisant du collagène et les autres éléments de la matrice extra cellulaire et d'une riche vascularisation issue de la néo-angiogenèse.

La formation du tissu de granulation ne concerne que les zones de la plaie correctement

préparées lors de la phase de détersion. En effet, sur une même plaie, certaines zones peuvent présenter une progression du tissu de granulation, alors que d'autres zones sont encore en phase de détersion (Hé, 2006).

II. 2. 2. 1. 1. Migration et prolifération fibroblastiques

La migration des fibroblastes débute dans les 24 à 48 heures suivant la constitution de la plaie. Leur recrutement dépend du chimiotactisme exercé par des médiateurs issus principalement des plaquettes, des macrophages et de certains lymphocytes. La capacité des cellules à migrer et à coloniser la matrice extracellulaire dépend de l'activité protéolytique de diverses protéinases dont la plupart sont secrété par les fibroblastes (fig. II. 5). Une fois migrées au niveau de la plaie, les fibroblastes se multiplient et commencent leur activité de synthèses afin de combler la perte de substance (Fox, 1988 ; Johnston, 1992 ; Fowler, 1993 ; Kumar et *al.,* 2004).

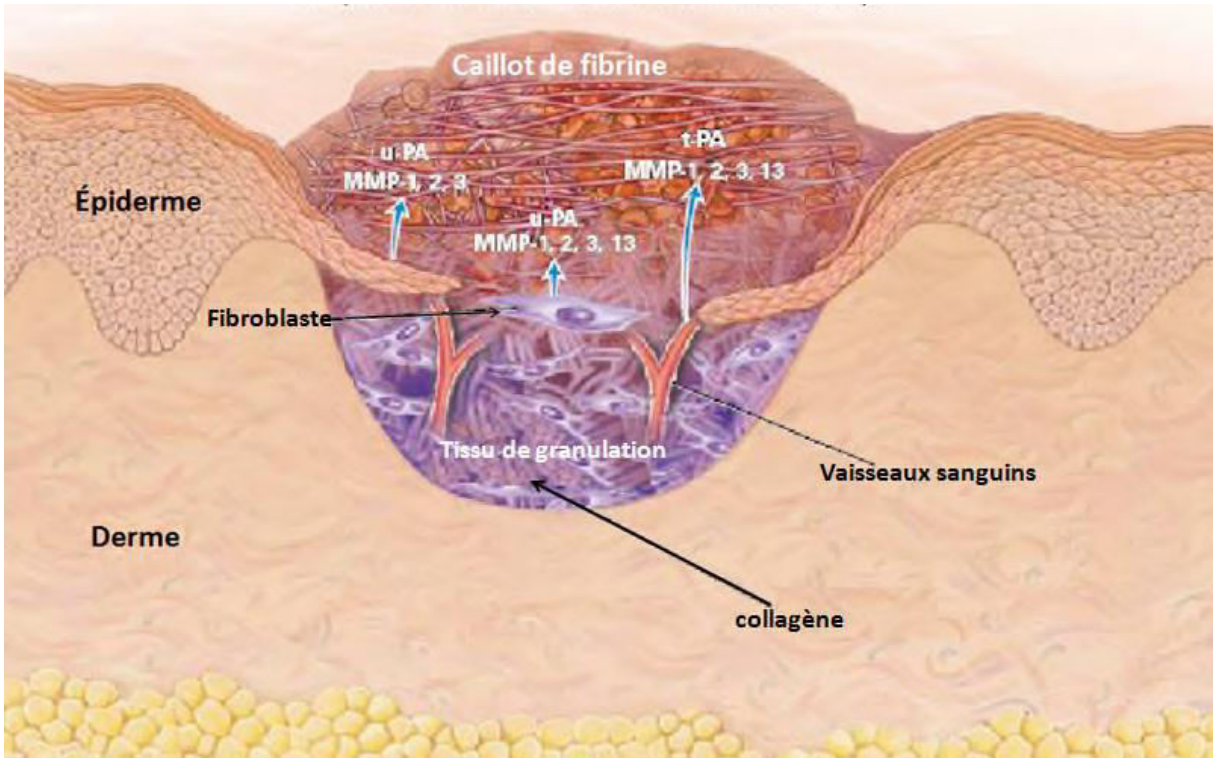


Fig. II. 5. Phase proliférative du processus de cicatrisation d'après Singer et Clark, 1999
Les Divers Protéinases nécessaires pour le mouvement des fibroblastes sont présentés.
- u-PA urokinase-type Plasminogen Activator;
- MMP-1, 2, 3 et 13 métalloprotéases matricielles 1, 2, 3, et 13 (nommés respectivement collagénase 1, gélatinase A, Stromélysine 1, et collagénase 3);
- t-PA tissue plasminogen activator.

II. 2. 2. 1. 2. Néo-angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse et fibrogénèse sont des phénomènes interdépendants qui progressent simultanément. En effet, la nouvelle vascularisation assure aux fibroblastes, un apport adéquat en oxygène, et autres facteurs nécessaires (vitamines, glucose, acides aminés...).

Le macrophage est un élément clé dans l'induction de l'angiogenèse, grâce aux nombreux médiateurs qu'il produit. La néovascularisation nécessite une stimulation, une migration et une prolifération des cellules endothéliales des vaisseaux adjacents à la plaie (Fowler, 1993 ; Teller et White, 2009). L'activation des cellules endothéliales des veinules post-capillaires commence dès la phase inflammatoire ; sous l'effet de la sérotonine et de l'histamine sécrétées par les mastocytes.

Les cellules endothéliales activées sécrètent diverses substances (enzymes « activateur du plasminogène », plasmine ; collagénases…) capables de désagréger les membranes basales et les structures environnantes (Kalebic et al., 1983 ; Fowler, 1993). La migration et la prolifération des cellules endothéliales nécessitent une autre stimulation exercée par des facteurs chimiotactiques et facteurs de croissance produits par diverses cellules (macrophages, fibroblastes et kératinocytes). Parmi ces facteurs, le VEGF (Vascular endothelial growth factor) est le facteur angiogénique le plus puissant (Johnston, 1992 ; Fowler, 1993 ; Kumar et al., 2004).

La prolifération des cellules endothéliales permet la formation de structures tubulaires qui s'unissent les uns aux autres et se différencient progressivement en artérioles ou en veinules

(Gerbault, 1999).

II. 2. 2. 1. 3. Synthèses fibroblastiques

Les fibroblastes commencent par synthétiser des protéoglycanes, des polysaccharides, et diverses glycoprotéines notamment la fibronectine pour former la nouvelle substance fondamentale. Elles synthétisent également du collagène sous l'effet de divers médiateurs libérés principalement par les macrophages et les cellules endothéliales (FGF, TGFβ, EGF, PDGF). Au fur et à mesure que la fibrine est dégradée, le collagène est déposé pour la remplacer (Fox, 1988 ; Johnston, 1992 ; Fowler, 1993 ; Kumar et al., 2004).

II. 2. 2. 2. Contraction

La contraction de la plaie contribue à rapprocher les berges et est étroitement liée à la formation du tissu de granulation. Cette contraction est due à la transformation de certains fibroblastes en myofibroblastes capables de se contracter.

Une contraction visible de la plaie est évident 5 à 9 jours après la blessure. Une invasion fibroblastique importante dans la plaie est nécessaire pour le commencement du phénomène de la contraction (Senet, 2007; Ono et al., 1999 ; Pavletic, 2010).

Le phénomène de contraction de la plaie est attribué à une interaction complexe de cellules, la matrice extracellulaire et des médiateurs y compris. La contraction continue à progresser et ne s'arrête que lorsque les marges opposées de la plaie se rencontrent. Si le tissu de granulation ne présente pas une qualité satisfaisante ou si la tension de la peau environnante atteint ou excède la force de contraction ; cette phase peut se prolonger et dure plusieurs semaines (Ono et al., 1999 ; Pavletic, 2010).

II. 2. 2. 3. La Epithélialisation

La ré-épithélialisation de la plaie se produit lorsque les kératinocytes recouvrent complètement la surface défectueuse de la peau. Les kératinocytes, le plus grand groupe de cellules épithéliales dans l'épiderme, qui se trouvent le long des bords de la plaie subissent une activité mitotique intense. Les kératinocytes, stimulées par des facteurs de croissance libérés localement, prolifèrent et commencent leur migration à travers le lit de la plaie dans les 12 à 24 heures après la blessure. Cette migration requiert un environnement humide et implique une série complexe d'étapes contrôlées par un gradient chimiotactique produit par divers facteurs de croissance. En absence d'une surface humide, le kératinocyte sécrète des enzymes protéolytiques qui lui permettent de creuser vers le bas pour rechercher l'humidité nécessaire pour sa migration (Hunt, 1988 ; Martin, 1997).

La première étape de la migration implique la séparation des kératinocytes l'un de l'autre ; ils vont subir ensuite une transformation phénotypique - un allongement - dans la direction de croissance nécessaire. Et enfin, une migration au hasard mais les kératinocytes sont toutefois guidées par les fibres de collagènes tu tissu conjonctif nouvellement formé. Ces processus de prolifération et migration cellulaires sont répétés jusqu'à ce que les cellules migrateurs des deux côtés de la plaie entre en contact l'une avec l'autre. Au point de contact, la migration cesse dans un processus connu sous le nom d'inhibition de contact (Swaim, 1997 ; Tomczak, 2010).

Il existe de multiples stimuli pour la migration et la prolifération des cellules épidermique, y compris l'EGF, TGFα, et le facteur de croissance des kératinocytes (KGF)

produites par les cellules épithéliales, les fibroblastes et les macrophages de la plaie (Hosgood, 2003 ; Hunt, 1988).

A la fin de cette phase, le tissu conjonctif cicatriciel qui comble la plaie et l'épithélium qui le couvre constituent la cicatrice. La cicatrisation n'est cependant pas achevée car cette cicatrice va être remaniée lors de la phase finale de maturation (Swaim, 1997 ; Tomczak, 2010).

II. 2. 3. Maturation

La maturation correspond au remodelage de la matrice extracellulaire et à la diminution de la cellularité dans le derme après réépithélialisation. Elle se poursuit sur plusieurs mois pour aboutir généralement à la formation d'une cicatrice plus ou moins fibreuse (Couquet et al., 2013).

II. 2. 3. 1. Phase de remodelage

Le remodelage des tissus cicatriciels peut durer jusqu'à un an et parfois plus. Au début de cette phase, l'épiderme a retrouvé son épaisseur normale et la croûte formée à partir du caillot sanguin tombe. Les fibres de collagène commencent à être mieux organisées ; initialement fines et désordonnées, elles deviennent plus épaisses et alignées avec les autres fibres des marges de la plaie (fig.II.6). (Smith et al. 1998 ; Hunt et al., 2000).

Malgré toutes les modifications et le remodelage que subit le derme durant cette phase, la peau ne retrouvera jamais ni sa fonction ni sa force ou résistance originale (Tortora et al., 1994). En effet, la force de tension de la peau cicatrisée ne dépassera pas 80% de sa force antérieure (Clark, 1985). De la même façon, l'élasticité de la cicatrice sera moindre qu'avant la blessure (Doillon et al., 1985).

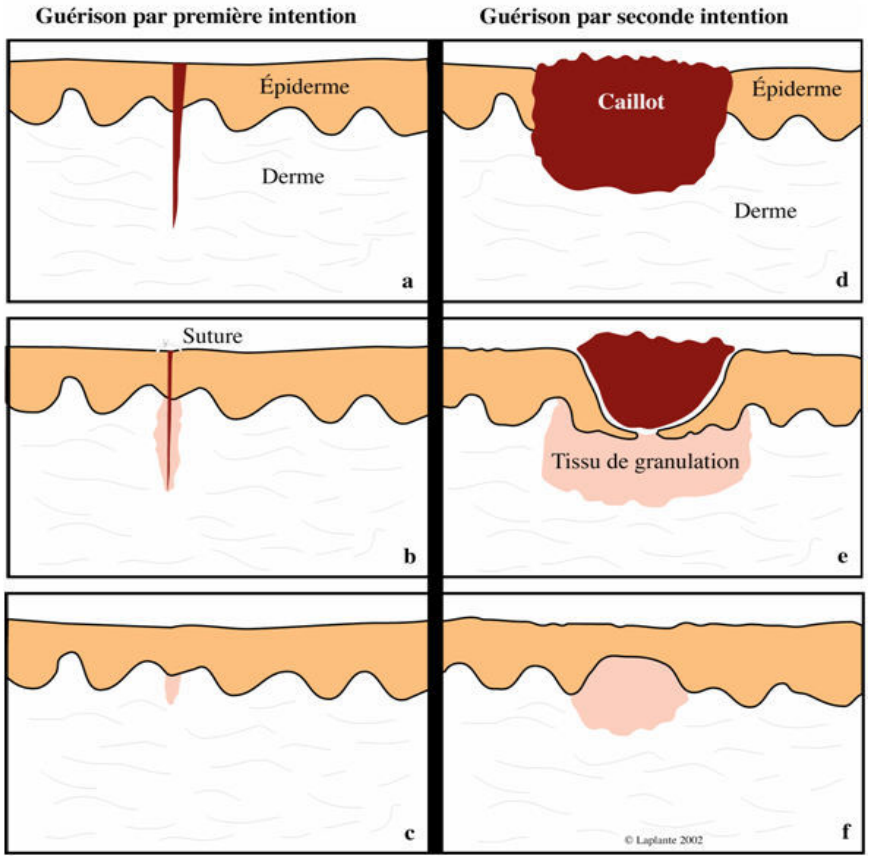


Fig. II. 6. Guérison d´une plaie par première et seconde intention (Doillon et al., 1985).

II. 2. 3. 2. Maturation de l'épiderme

L'épiderme subit un remaniement qui consiste en un épaississement qui aboutira à la restauration de toutes les couches épidermiques. Le nouvel épiderme subit par la suite une kératinisation progressive permettant un recouvrement fonctionnel de la peau. Une fois l'épithélialisation achevée, une invagination du nouvel épithélium dans le tissu sous –jacent permet une reconstitution limitée des follicules pileux et des glandes sébacées associées (Johnston, 1992 ; Aguerre, 2004).

La cicatrice est généralement dépigmentée, cependant, une repigmentation partielle et tardive peut parfois survenir par migration centripète de mélanocytes. Cependant on note une absence de la repigmentation des poils, et de la régénération des glandes sudoripares (Titeux-denis, 1992 cités par Hé, 2006 ; Pavletic, 1994 ; Aguerre, 2004)

II. 2. 3. 3. Restauration de la vascularisation et de l'innervation

A la fin de la phase fibroblastique, on assiste à une régression de la riche vascularisation

composant le tissu de granulation. Le nouveau réseau vasculaire redevient proche de celui d'une peau saine ; cependant, il reste moins développé car la cicatrice est beaucoup plus fibreuse que la peau normale.

La reconstitution du réseau lymphatique s'effectue beaucoup plus tardivement que la vascularisation sanguine. Concernant la restauration de l'innervation, lorsqu'elle a lieu, elle est généralement très tardive et très lente. Ceci explique la faible sensibilité des grandes cicatrices par rapport à la peau normale (Hé, 2006).

II. 3. Les facteurs qui influencent la guérison des cicatrices

Une cicatrice ne sera jamais la même d'une personne à l'autre. Plusieurs facteurs influencent la rapidité et leur degré de guérison.

Tableau II. 1. Les facteurs influençant la guérison des cicatrices (Alan et al., 1997).

Facteurs locaux	Facteurs généraux
Localisation de plaie. Environnement de la plaie. Hydratation de la plaie. Degré de contamination de la plaie. Corps étrangers. Vascularisation de la plaie : une bonne vascularisation est essentielle pour une bonne cicatrisation.	Malnutrition (carence en albumine, fer, zinc, vitamine C). Age (diminution des processus de réparation). Diabète. Obésité. Tabagisme (hypo vascularisation) Iatrogénie : immunosuppresseurs, anti-inflammatoires……

II. 4. Les types de la cicatrisation

A. La cicatrisation déficiente

La perturbation des facteurs de la cicatrisation essentiel va entrainer un retard de guérison s'il existe des états pathologiques ou le mécanisme du collagène est perturbé et déficient. Nous mentionnerons brièvement la dégénérescence mucoide avec augmentation de substances fondamentales, donc une cicatrice très instable et très friable, la dégénérescence fibrinoide et enfin, un troisième phénomène, l'hyalinisation du collagène.

Ces différentes entités, groupées sous le nom de collagénose, sont souvent d'origine congénitale et demeurent très difficiles à contrôler. Au point de vue épithéliale, il existe aussi des maladies déficientes comme le pemphigus ou les mécanismes essentiels de régénération sont très déficients et on assiste à la présence d'ulcération chronique très difficile à contrôler. (**M. Sadou Ousmane ; 2008).**

B. La cicatrisation exagérée

Par un mécanisme encore inexpliqué, on peut assister à un dérèglement de la phase collagénique qui va stagner dans sa phase immature et qui se manifeste par une accumulation exagérée du collagène en forme jeune où persistent aussi les éléments inflammatoires. Cette

réaction va amener une prolifération anormale des tissus cicatriciels. (**M. Sadou Ousmane ; 2008).**

C. La cicatrisation hypertrophique

Le phénomène cicatriciel piétine à phase collagénique avec accumulation de faisceaux collagène entourés d'éléments inflammatoire. Ce phénomène demeure cependant ordonné et la cicatrice s'hypertrophie sans toutefois déborder la limite de la blessure. (**M. Sadou Ousmane ; 2008).**



Fig. II. 7. Cicatrice hypertrophique

D. La cicatrice chéloïdienne

Ce type de cicatrisation exagérée se manifeste par une formation nettement désordonnée et même tumorale du collagène. Il se forme en surface des bourgeonnements qui tendent à déborder les limites de la plaie et à s'étendre comme une tumeur. Ces bourgeonnements sont formés de fibres de collagène très désorientées et souvent en dégérescence hyaline entourées d'une réaction inflammatoire modérée au pourtour.



Fig. II. 8. Cicatrice chéloïdienne

L'évolution des cicatrices hypertrophiques et chéloïdiennes ces deux phénomènes sont observés tout d'abord chez tous les individus en phase de croissance. Chez l'adulte, on la retrouve plutôt chez les gens à peau brune et beaucoup moins fréquemment chez les gens à peau blanche. Le phénomène est aussi plus fréquent dans les plaies extensives comme les brulures et l'acné sévère. La cicatrice hypertrophique a une tendance à se résorber par maturation progressive étalée sur une période de 4 à 6 mois, la cicatrice résultante sera élargie mais très lente mais irrémédiable. Certains sites comme le pavillon auriculaire et la peau sternale sont particulièrement affectés par cette prolifération.



Fig. II. 9. Cicatrice chéloïdienne et hypertrophique

II. 5. Technique d'évaluation de la cicatrisation

Les études de la cicatrisation cutanée passe par deux phases, la première étant l'induction et le contrôle des lésions suivi d'une phase d'évaluation et de suivi de la cinétique de ce phénomène.

Dans un premier temps le suivi est réalisé par simple observation clinique, complété par des prélèvements histologiques, ce qui rend cette évaluation invasive. Ces méthodes présentent des inconvénients liés à la subjectivité de l'évaluation des individus et l'invasivité de la technique histologique. Toutefois, d'autres méthodes basées sur les propriétés physiques de la peau sont utilisées pour ces études.

Ainsi, la cicatrisation peut être évaluée par mesure directe des dimensions de la plaie à la règle, une largeur et longueur (fig. II. 10) (Vowden, 1995), utilisation de calques transparents, permet le relevé du contour sur du papier millimétré (Bohnnon et al .,1998). Ces techniques présentent.

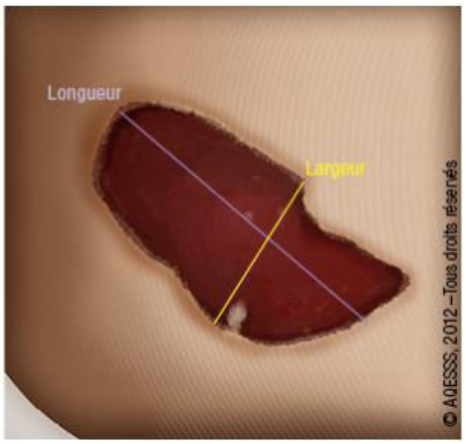


Fig. II. 10. Evaluation de la cicatrisation par mesure directe des dimensions de la plaie à la règle

L'inconvénient de nécessiter un contact direct avec la lésion. Une autre technique présentant le même inconvénient, mais permettant la mesure du volume des plaies par un moulage au moyen d'une gomme siliconée (Zahouani et al., 1992).

La cicatrisation peut également être évaluée par photographie étalonnée. Ce procédé évite un contact direct avec la plaie, le contact qui peut être douloureux ou source de contamination. Cependant, il s'agit d'un procédé indirect, nécessitant la connaissance de l'échelle. Cette méthode ne présente pas de différence significative avec la méthode directe (Griffin et al., 1993). Toutefois, la photographie permet d'apprécier d'autres aspects de la plaie tel que l'aspect de tissu du lit de la plaie, le changement de la couleur avec la présence de nécrose, de tissu de granulation et d'épithélialisation (Mignot, 1996).

D'autres techniques optiques sont utilisées pour l'évaluation et la quantification de la réparation des plaies. La Tomographie par Optique Cohérente à polarisation sensitive utilisé par Oh et ses collaborateurs (2006), permet de visualiser la régénération des fibres de collagène ainsi que de quantifier l'effet de certaines molécules sur le processus de réparation des plaies (oh et al., 2006).

L'ensemble de ces techniques peut être complété par d'autres techniques, tel que la PIE (la perte insensible en eau), et la vélocimétrie par laser doppler. De cette manière, la mesure de la PIE ou la perte insensible en eau permet de donner des informations sur le rétablissement de la fonction barrière de l'épiderme. Alors que la technique de vélocimétrie à laser Doppler, permet de mesurer le flux sanguin au niveau de la lésion. Ce flux augmente au fur et à mesure que l'inflammation s'installe, la diminution de sa valeur informe donc sur l'évolution du processus de la cicatrisation (Kompaore et al., 1993).

II. 6. Le chitosane et la cicatrisation

Les étapes de cicatrisation s'enchainent normalement, il se forme un tissu de granulation normal, souvent on observe une angiogenèse accélérée. Il a été décrit que le chitosane et ses oligomères stimulent la prolifération locale de cellules immunitaires et finalement contribuent à l'intégration du tissu implanté dans le tissu hôte (Suh et Matthew, 2000).

Okamoto et al. (1995), ont montré à la suite d'expérimentations menées chez le chien, que le chitosane agit sur toutes les étapes de la cicatrisation. Le premier rôle joué par le chitosane est de favoriser l'hémostase. Les pansements hémostatiques à base de chitosane sont d'ailleurs largement utilisés, le plus célèbre étant sans doute celui proposé par le laboratoire Hemcon : un composé d'un acétate de chitosane lyophilisé. Le chitosane stimule ensuite la prolifération des fibroblastes et influe le comportement migratoire des neutrophiles et des macrophages, ce qui a pour conséquence de modifier les processus de reconstruction que sont la fibroplasie et la réépihélialisation (Okamoto et al., 1995 ; Kosaka et al., 1996).

En 1995, Ueno et ses collaborateurs, ont étudié l'influence de non-tissés de chitosane sur la cicatrisation de plaies chirurgicales chez des chiens. Là encore, il a été mis en évidence que le chitosane favorise, dès le troisième jour, l'infiltration des macrophages et des cellules inflammatoires, et plus particulièrement des polymorphonucléaires. Ces cellules vont produire un large répertoire de substance pro-inflammatoires et de facteurs de croissance.

Cette étude a également montré que le chitosane favorise l'étape de granulation (entre le $9^{ème}$ et le $15^{ème}$ jour) : en outre la quantité de collagène III dans les tissus reformés est significativement plus importante pour les plaies soignées avec du chitosane (Ueno et al., 1999).

I. 6. 1. Effet du chitosane sur les macrophages

Le chitosane est composé d'unités glucosamine (GlcN) et N-acétyle-glucosamine (GlcNAc), or les macrophages expriment des récepteurs pour le mannose et la GlcNAc. La fixation du GlcNAc sur les récepteurs spécifiques est décrite comme une condition préalable indispensable à l'activité des macrophages, leur activation conduit à la libération d'un grand nombre de médiaeurs biologiques (tels que des facteurs de croissance) ainsi qu'à la phagocytose des corps étrangers (Dipietro, 1995).

Nishimura et coll. (1986), décrivent une simulation de la production d'interleukine IL-1 par les macrophages en présence de chitosane. La prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène sont affectées par IL-1, IL-6 et TNf-α (Dipietro, 1995).

Par ailleurs Ueno et coll. (2001), ont observé que la production in vitro de TGF-β1 et PDGF par des macrophages dérivés de monocytes humains est plus importante en présence de

chitosane. Ces résultats indiquent que, du fait de la production de ces facteurs de croissance, le chitosane favorise la production de matrice extracellulaire (Ueno et al., 2001).

I. 6. 2. Effet de chitosane sur les fibroblastes

La reconstruction du tissu conjonctif fait suite à la prolifération des fibroblastes et à la synthèse de matrice extracellulaire. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'application de chitosane favorise le développement du tissu de granulation, et la synthèse d'une matrice extracellulaire riche en collagène. Ceci sous-entend que le chitosane participe à la production de la matrice extracellulaire et à la prolifération des fibroblastes, de manière directe ou indirecte.

Mori et coll. 1997 d'une part et Ueno et coll. 2001 d'autre part ont montré, respectivement, que lors de cultures *In vitro* de fibroblastes L929, la présence de chitosane ne favorise ni la prolifération cellulaire, ni la production de matrice extracellulaire. Ceci implique que, *In vivo*, la prolifération des fibroblastes, ainsi que la production de matrice extracellulaire sont favorisées de manière indirecte, par l'intermédiaire de médiateurs biologiques tels que les facteurs de croissance (Mori et al., 1997 ; Ueno et al., 2001).

I. 6. 4. Effet de chitosane sur les kératinocytes

Chatelet et al. (2001), ont étudié l'influence du degré d'acétylation sur les propriétés biologiques de films de chitosane. Au cours de cette étude il a été établie que quel que soit le degré d'acétylation du chitosane utilisé, tous les films étaient cytocompatibles vis –à-vis des fibroblastes et des kératinocytes. Il a également été observé que plus le degré d'acétylation est bas, plus l'adhésion cellulaire sur les films est importante. Le DA semble également favoriser d'avantage la prolifération des kératinocytes (Chatelet et al., 2001).

Toute fois, et de manière un peu contradictoire, Denuziene et ses collaborateurs (1998) ont observé que dans le cas de l'utilisation de chitosane de plus faible degré de polymerisation (DP = 60), la prolifération des krétinocytes en culture sur des films était inhibée pour des DA de 11% et 2.5% (Denuziero et al., 1998).

III. Type de produit utilisés sur la peau

La ''formulation à l'usage topique'' consiste en l'administration d'une substance sur la peau. Il existe une grande variété de formulation qui peut être utilisées sur la peau. On peut distinguer différentes formes : solides, semi-solides, et liquide (Frelichowsha, 2009).

- Crème dermique : pommade de consistance molle, peu graisseuse et peu épaisse, constituée d'une émulsion H/E ou E/H ; cette composition favorise la pénétration dans les tissus cutanés. Le conditionnement se fait en pot ou en tube ;

- Pâte dermique : pommade renfermant de fortes proportions de poudres dispersées dans l'excipient ;
- Pommade : préparation de consistance molle, onctueuse et épaisse, d'aspect homogène, destinée à être appliquée sur la peau ou sur certaines muqueuses, en vue d'une action locale ou parfois générale après pénétration percutanée. Contrairement aux crèmes, les pommades présentent une phase aqueuse en quantité limitée. Le conditionnement se fait en pot ou en tube ;
- Solution et lotion à usage externe : forme liquide obtenue par dissolution ou dispersion de principes actifs dans un véhicule aqueux ou légèrement alcoolisé, destinée à l'application sur la peau sans friction. Dispositif transdermique : petit réservoir fixé sur la peau contenant un principe actif. La membrane, en contact avec la surface cutanée, libère progressivement le principe actif qui pénètre dans la circulation générale, après diffusion à travers la peau. La durée d'action est généralement de 24 heures (Dridi, 2006).

IV. Les différentes formes utilisées du chitosane

IV.1. Hydrogels de chitosane

Le chitosane, comme une grande partie des polysaccharides, est connu pour conduire à la formation de gels dans certaines conditions.

IV.1.1. Quelques exemples d'application du chitosane sous forme d'hydrogel

Boucard et ses collaborateurs, ont mis au point un matériau permettant d'améliorer la cicatrisation de brûlures du 3ème degré. Le pansement consiste en un hydrogel de chitosane bicouche mimant la structure de la peau native (voir Fig. II. 11) : la première couche d'hydrogel (derme), constitue un matériau souple en contact direct avec la plaie, la deuxième couche est plus rigide, joue le rôle de l'épiderme, protège la zone et assure une bonne résistance mécanique au pansement. Les études de Boucard et Dupasquier montrent que ces biomatériaux accélèrent la cicatrisation des brûlures, tout en améliorant l'aspect visuel des cicatrices (Vizio, 2005; Dupasquier, 2011).

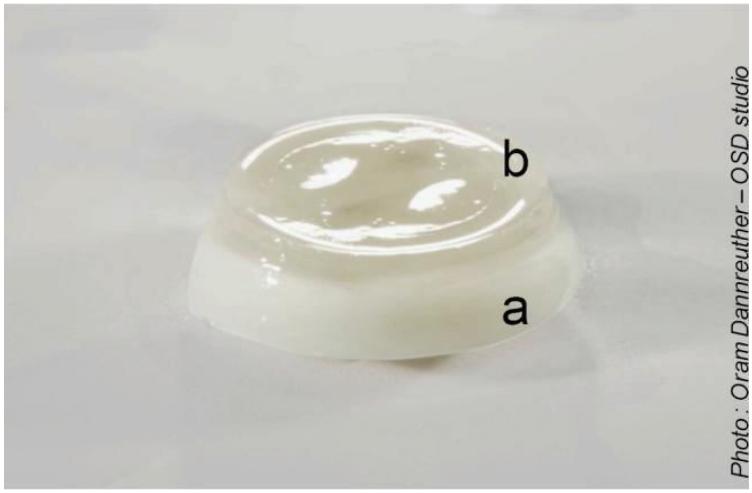


Fig. II. 11. Hydrogel icouche de chitosane. (a) : phase destinée à être en contact avec la plaie, (b) : couche externe (Dupasquier, 2011.)**.**

Les hydrogels de chitosane font également l'objet de nombreuses études en tant que scaffold ou de matériaux leurres (Montembault et al., 2006) dans le domaine de la régénération du cartilage (Muzzarelli, 2009 ; Muzzarelli, 2012).

IV. 2. Le chitosane sous forme solide

Films : le chitosane étant un polymère filmogène (Tual et al., 2000) de nombreuses applications sous forme de films ont été développées, notamment dans l'emballage alimentaire, mettant ainsi à profit ses propriétés antimicrobiennes et des propriétés barrières intéressantes envers l'oxygène (Kittur et al., 1998). L'enrobage de fruits et légumes par un film de chitosane prolonge sensiblement leur durée de vie en inhibant partiellement le développement de pourriture (Jiang et al., 2001 ; Jiang et al., 2005).

Dans le domaine biomédical, des études sont menées sur les films de chitosane pour réaliser des systèmes de relargage de principes actifs. Le gonflement progressif et la dégradation lente du chitosane permettent une libération contrôlée de divers médicaments comme des antibiotiques (Oel et al., 2008), des anti-inflammatoires (Rodrigues et al., 2009).

Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes et mucoadhésives, les films de chitosane peuvent ainsi être déposés sur des plaies et favoriser la cicatrisation par la délivrance de facteurs de croissance (Mizuno et al., 2003) ou d'huiles essentielles (Altiok et al., 2010) par exemple.

Fils/Tissus : le chitosane peut également être utilisé sous forme de &fibres (Desorme, 2011), pour servir en tant que fil de suture, ou bien être tissé pour confectionner des tissus médicaux. Ces textiles ont un grand potentiel notamment pour la réparation de plaies cutanées (Agboh et al.,1997 ; Crini et al., 2009).

Eponges et Aérogels : le chitosane peut également être utilisé sous forme d'éponge ou d'aérogel. Il trouve ainsi des applications dans l'ingénierie tissulaire (Gingras et al., 2003; Rinki et al., 2010 ; Muzzarelli, 2012) la culture cellulaire (Li et al., 2003) ou le relargage de principes actifs (Oungbho et al., 1997), ou la catalyse (Crini et al., 2009), mettant à profit une très grande surface spécifique.

IV. 3. Le chitosane sous forme particulaire

La grande majorité des études sur les nanoparticules à base de chitosane concerne le secteur biomédical, et en particulier dans le domaine du relargage de principe actif (Agnihotri et al., 2004). Il a été constaté que les nanoparticules de chitosane pouvaient favoriser le transport de médicament jusqu'au cerveau (Wang et al., 2008). L'administration par voie nasale de particules encapsulant de l'estradiol, une hormone utilisée dans le traitement contre la maladie d'Alzheimer, a permis, en traversant la muqueuse puis en suivant les nerfs olfactifs, de contourner la barrière hémato-encéphalique.

L'utilisation de particules de chitosane intéresse également le secteur de l'agriculture, en tant qu'agent éliciteur, afin d'encapsuler des principes actifs ou en tant que pesticide(Crini et al., 2009), ainsi que le domaine de la dépollution des eaux et de la catalyse (Guibal, 2005 ; Yang et al., 2009), en mettant à profit le pouvoir chélatant et complexant du polymère vis-à-vis notamment d'ions métalliques (Nomanbhay, 2005 ; Hritcu et al., 2012) de colorants (Oguntimein, 2009), d'hydrocarbures aromatiques ou de protéines.

V. Mécanisme d'absorption à travers la peau

La peau est apparue comme un portail de délivrance de médicaments, et le nombre de médicaments topique est en constante progression. Au départ les formulations étaient réalisées pour des traitements locaux de pathologies cutanées (Smith et al, 2000).

La surface extérieure de la peau constitue une barrière très efficace mais elle peut cependant être traversée par de petites quantités de substance lipophiles capables de pénétrer dans les couches cornées. Si ces substance possèdent aussi une certaine hydrophilie, elles pourront avoir une diffusion plus profonde et même parfois une absorption systémique. En dessous de la couche cornée, l'épiderme est une barrière moins efficace, sa perméabilité étant comparable à celle des autres membranes biologiques. Du fait de la perméabilité réduite de la peau, il n'y a qu'une faible fraction de la de la substance déposée qui est réellement absorbée et seules les substances très actives peuvent avoir une action générale par cette voie (Le Hir, 2001).

CHAPITRE III

ETUDE EXPEREMENTALE

Cette étude expérimentale, réalisée au sein du laboratoire biologie au niveau de la faculté des sciences (Université de Médéa), a été consacrée à préparer une crème cicatrisante à base de différentes concentrations en chitosane, en utilisant comme matières premières de base : huile de coco, huile d'argan, huile d'olive, cire d'abeille, beurre de karité et émulsifiants comme phase huileuse. Tandis que la phase aqueuse est composée d'eau distillée et de glycérine. En plus de la vitamine E et un conservateur comme additifs.

Pour ce faire, notre étude expérimentale comporte deux grandes parties :

1) La première partie est consacrée à la préparation de l'émulsion ;
2) La deuxième partie, consacrée à la caractérisation des crèmes préparées, est basée sur :
   - -Détermination du sens de l'émulsion (H /E ou E/H) par conductimétrie ;
   - -Détermination du pH ;
   - -Evaluation de la stabilité ;
   - -L'examen microscopique ;

III. 1. Matériels et méthodes

III. 1. 1. Matériels

L'ensemble de matériels utilisés pour la réalisation de cette étude est résumé dans le tableau III.1.

Tableau III. 1. Le matériel utilisé dans la réalisation de ce travail

Appareillages	Caractères
Plaque chauffante-Agitateur magnétique	Type Heidolph, MR Hie-standard et IKA-LABOREC HNK RH basic.
Balance de précision	La précision des pesées nécessitent une balance très précise qui est utilisée pour toutes les expériences.
Conductimètre	Mettler Toledo.
pH-mètre	Mesure de pH des formules préparées ; Type : METRHOM 827pH Lab.
Etuve	Utilisée pour tester la stabilité thermique de type Memmert.
Centrifugeuse	Elle fonctionne avec une vitesse de rotation comprise entre 1000trs/min et 6000trs/min.

Microscope optique	Observation de stabilité de la crème (la petite structure en détail)

III. 1. 2. Produits

III. 1. 2. 1. Les huiles et beurres végétales : l'ensemble du produit utilisé est résumé dans le tableau III. 2.

Tableau III. 2. Les produits utilisés dans la réalisation de ce travail

Matières premières	Propriétés	Les bienfaits
Huile de coco	Solide, de couleur blanche à ivoire nacré, et une odeur sucrée avec un toucher assez sec.	Il protège des agressions extérieurement : le soleil, Le vent, le froid, Nourrit la peau et apaise les irritations, Antioxydant, elle lutte contre le vieillissement de la peau, Riche en vitamine K et en fer, Donne une texture douce et lisse.
Huile d'olive	C'est une variété d'huile alimentaire, à base de matière grasse végétale extraite des olives.	-Effet Antioxydant (riche en vitamine E, A et C et poly phénols). -Anticipent le vieillissement des cellules. -Elle possède un effet anticoagulant et cicatrisant.
Cire d'abeille	Se compose principalement d'ester et d'acides gras, et se présente sous forme de petites écailles blanche et transparentes.	-Action hydratante et nourrissante (capacité à retenir l'eau). -Anti agressions. -Cicatrise les plaies superficielles -Riche en vitamine E.

Beurre de karité	Solide d'aspect cireux à température ambiante, huileux au-delà de 34°C, de couleur jaune clair à beige avec une odeur caractéristique de graine aux notes d'amande.	-Il assoupli la peau et l'hydrate en profondeur. Permet des soulager la peau grâce à ses vertus apaisantes et relaxantes. -Action préventive contre les vergetures.
Huile d'argan	-C'est une huile végétale tirée de l'arganier, de couleur miel et riche en acides gras elle est employée pour ses propriétés cosmétique	-Riche en Vitamine E. -Antioxydants qui préviennent le desséchement de la peau. -L'application de huile d'argan sur la peau améliore l'élasticité de la peau et son application cutané redynamise la peau. -En application dermatologique exerce un effet nourrissant.
Vitamine E	-C'est une grosse molécule de type alcool. Elle est d'origine végétale (huile végétale, germe de céréales organe vert de végétaux…). Elle est hydrosoluble, stable, employée sous forme d'acétal, elle contribue au bon état de tissus conjonctifs en protégeant la protéine, elle peut être un produit protecteur du derme.	- Effet énergique contre les radicaux libre qui sont la cause du vieillissement des cellules et de la peau. - Effet Antioxydant. - Il joue un rôle dans l'extensibilité et la souplesse de la peau, il est ainsi tout particulièrement l'allié des peaux sèches (Martini, 2006)
Glycérine	La glycérine se présente sous forme d'un liquide	-Le lissage de la peau : la glycérine est dotée de

	transparent, visqueux, incolore, inodore, faiblement toxique, au gout sucré.	propriétés tensioactives qui lissent la peau, protection et barrière contre les agressions, la restauration des défenses naturelles, hydratant.

III. 1. 2. 2. Les animaux

Dans le but de tester l'efficacité des crèmes préparées et pouvoir choisir la dose convenable du chitosane incorporée, nous avons choisi les rats comme cobaye pour les tests de la cicatrisation. Des rats adultes de race Winstar males ont été achetés de l'institut Pasteur d'Alger de poids moyen de 210 ± 50 gr de 6 à 8 mois.

L'élevage est effectué dans l'animalerie de l'Université de Médéa. Les animaux sont maintenus en période de stabulation avant l'expérimentation. Ils sont installés dans des cages métalliques (photo III. 1).

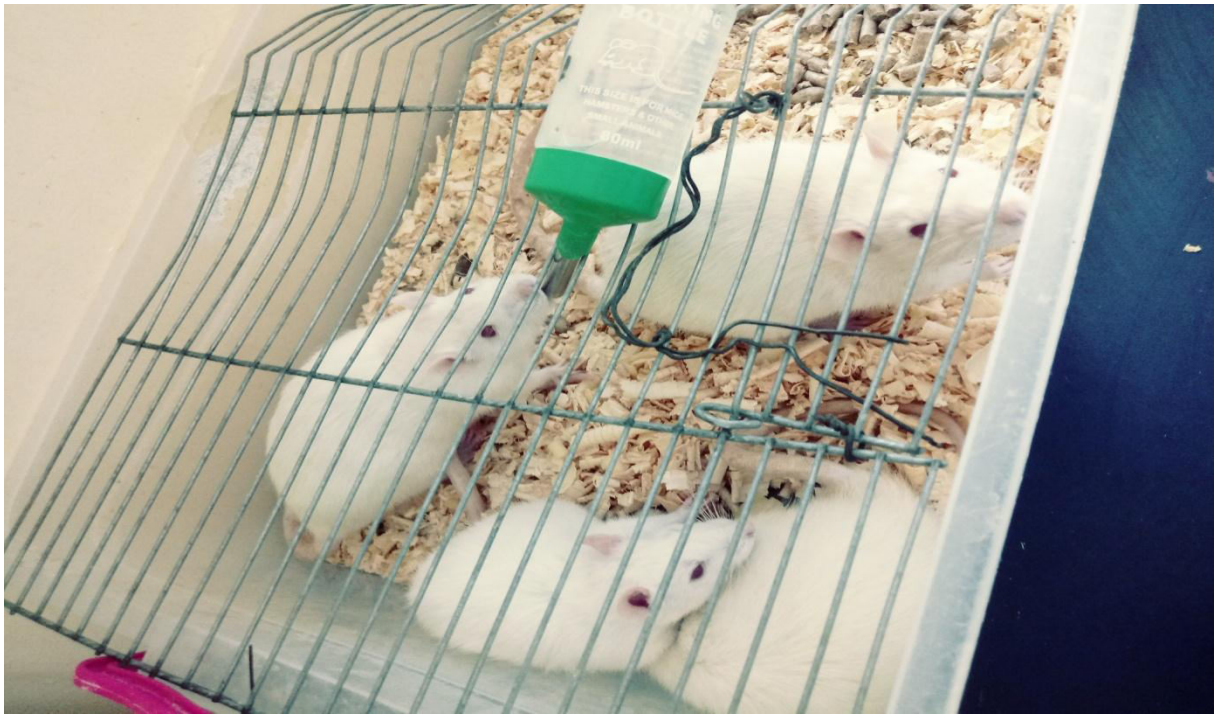


Fig. III. 1. les rats de laboratoire

La température de l'animalerie est entre 20- 25°C. La litière utilisée est un substrat à base de sciures de bois. Cette litière est renouvelée aussi souvent que nécessaire de façon à ne pas être mouillé pour assurer le bon état hygiénique des animaux.

III. 1. 2. 3. Alimentation

La nourriture et l'eau sont fournies ad libitum. La nourriture est constituée de granulés d'origine commerciale (aliments granulés pour lapins SARL la production locale OUAHFOUN) (photo III. 2) associés à des coupeaux de pain sec. L'eau est placée dans un biberon (buvette) muni d'un tube abreuvoir de longueur convenable.



Fig. III. 2. L'alimentation des rats de laboratoire (originale 2020)

III. 1. 2. Les méthodes

III. 1. 2. 1. Formulation de la crème

La crème étudiée dans notre travail est une émulsion H/E. Elle consiste à verser la phase huileuse dans la phase aqueuse sous agitation mécanique, jusqu'à le refroidissement, pour assurer une bonne homogénéisation des deux phases (fig. III. 1).

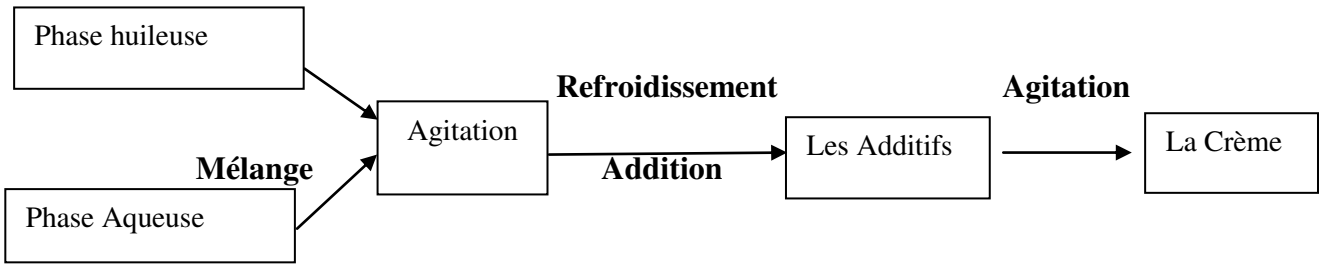


Fig. III. 3. Diagramme de fabrication d'une émulsion H/E

Préparation de la phase aqueuse

La phase aqueuse, utilisée dans notre travail, est constituée de chitosane, d'eau distillée, glycérine et un conservateur dont les proportions sont présentées dans le tableau III. 1.

Tableau III. 3. La composition et les proportions des constituants de la phase aqueuse

Les ingrédients		**Masse (g)**
Chitosane	0.5% (crème1)	50 (solution à 1% en chitosane)
	1% (crème 2)	50 (solution à 2% en chitosane)
	2% (crème 3)	50 (solution à 4% en chitosane)
Eau		8,2
Glycérine		2,2

Les différents ingrédients sont mélangés dans un récipient et chauffés dans un bain marie à 70°C.

- **Préparation de la phase huileuse**

La phase huileuse est constituée d'un mélange d'huile et de beurre, végétales connus pour leur effet cicatrisant, hydratant et réparateur de la peau, en plus d'émulsifiants (tableau III. 2).

Tableau III. 4. La composition et les proportions des constituants de la phase huileuse

Les ingrédients	Masse (g)
Huile de coco	10
Huile d'olive	13
Beurre de karité	3
Huile d'argan	2
Cire d'abeille	4
Emulsifiant1	3.5
Emulsifiant2	2.5

Les différents composants sont mélangés et chauffés, dans un bain marie, à 70°C jusqu'à la fusion complète des composants (photo. III. 3).

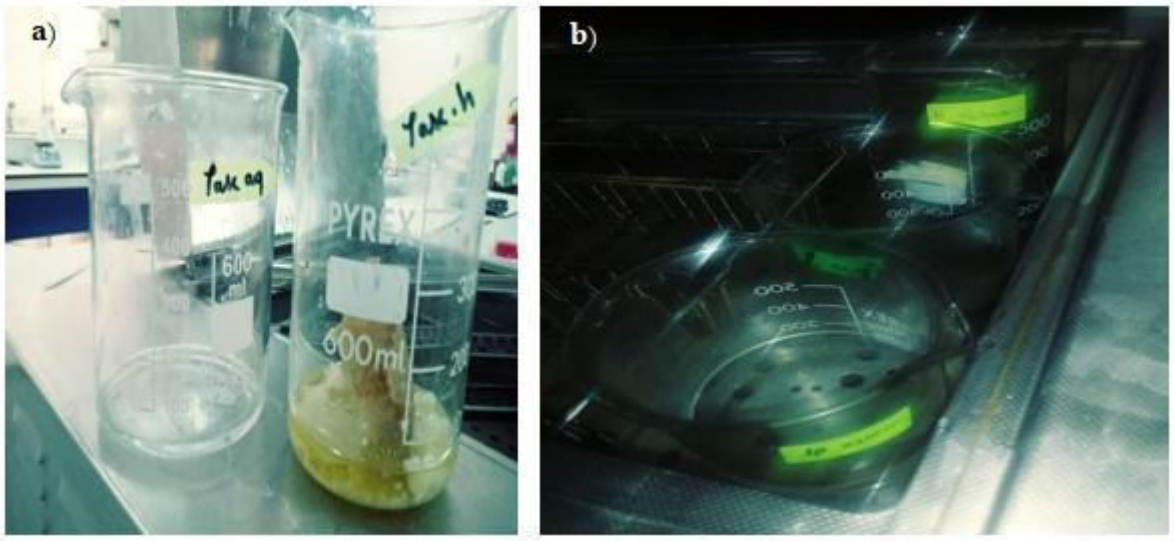


Fig. III. 4. (a) Préparation de la phase aqueuse et la phase huileuse (b) Chauffage des deux phases et la fusion de la phase huileuse

- **Les additifs**

Dans le but de protéger notre préparation contre les attaques microbienne un conservateur a été ajouté après refroidissement de l'émulsion. La vitamine E est également ajoutée pour son effet réparateur.

III. 1. 2. 2. Caractérisation de la crème

Une bonne crème doit avoir une texture homogène, une couleur franche et uniforme. Et pour une garantie de qualité d'un produit et la satisfaction du consommateur, on est obligé de déterminer les propriétés physicochimiques de la crème préparée.

III. 1. 2. 2. 1. Détermination du sens de l'émulsion (H/E ou E/H) par conductimétrie

La variation de conductivité est proportionnelle à la variation de la quantité de la phase externe quand il s'agit d'une émulsion H/E et la conductivité ne varie quasiment pas pour des changements de proportion d'une émulsion E/H. Cela est dû au fait que la conductivité d'une phase huileuse est 100 à 1000 fois inférieure à celle d'une phase aqueuse salée. Par conséquent le point ou l'émulsion change de type correspond à une grosse variation de conductivité qui peut être détectée facilement, à la seule condition qu'il ait une agitation suffisante pour assurer un système homogène (Le Hir, 1992).

Elle est effectuée par l'utilisation de conductimétrie directement sur l'émulsion, Elle est importante parce que La variation de conductivité est proportionnelle à la variation de la quantité de la phase externe.

Protocole

- Une fois l'appareil étalonné, et les électrodes lavées à l'eau distillée ;
- homogénéiser l'échantillon, et introduire un volume suffisant dans le récipient de mesure et y plonger les électrodes ;
- Vérifier que l'indication donnée par le conductimétrie est stable au bout d'une minute ;
- Relever ensuite la conductivité.

III. 1. 2. 2. 2. Détermination du pH

L'acidité de la crème formulée est très importante à connaitre étant donné que cette dernière est destinée à être appliqué sur la peau du corps, cette acidité est généralement interprétée par la mesure de pH.

Elle est effectuée par l'utilisation de pH mètres, directement sur l'émulsion ou après dilution à 10% dans de l'eau distillée. Elle est importante parce que le pH influence la stabilité de l'émulsion, la tolérance cutanée des préparations et les incompatibilités entre les différents constituants. Elle est définit à travers une échelle de 1 à 14 comme suit :

- $1 < pH < 7$: pH acide
- $pH = 7$: pH neutre
- $7 < pH < 14$: pH basique

Protocole

- Une fois l'appareil étalonné, et les électrodes lavées à l'eau distillée ;
- homogénéiser l'échantillon, et introduire un volume suffisant dans le récipient de mesure et y plonger les électrodes ;
- Vérifier que l'indication donnée par le pH –mètre est stable au bout d'une minute ;
- Relever ensuite le pH.

Ou mesure le pH après dilution 10% de la crème (1 g de crème et continue à 10 g par l'eau distillé).

III. 1. 2. 2. 3. Evaluation de la stabilité

Cette étude est utilisée comme test de stabilité, en fixant une limite d'un certain nombre de tours/min. Ce test consiste à soumettre la crème pendant 15min à des vitesses de centrifugation successives 1000 trs/min, 3000trs/min, 6000 trs/min et on note chaque fois la stabilité ou non de l'émulsion. C'est l'équivalent de six mois de vieillissement.

III. 1. 2. 2. 4. Stabilité thermique

Ce test étudie l'influence de la température sur la formulation préparée. Nous avons déposé un échantillon de la crème préparée dans des étuves à différentes températures (4°C, 25°C, 45°C) pendant 24h et 30jours afin de mesurer sa stabilité physique au cours de temps. La stabilité des produits pharmaceutiques est un des paramètres clé pour la garantie de sa qualité et pour la satisfaction du consommateur.

III. 1. 2. 2. 5. L'examen macroscopique et microscopique

- **Contrôle macroscopique**

Un examen macroscopique c'est-à-dire observation à l'œil nu de certains caractères des crèmes préparées à savoir : les caractères visuels, les caractères tactiles et le caractère olfactifs.

- **L'examen microscopique**

Cet examen est réalisé en plaçant une petite quantité de la crème entre lame et lamelle pour une observation microscopique au grossissement 40. Il permet d'apprécier l'homogénéité de l'émulsion ou la distribution des gouttelettes dans l'émulsion.

III. 1. Préparation de la crème avec le principe actif

- **Préparation du chitosane**

Elle est réalisée par la dissolution, respective, 0.5g, 1g et 2g du chitosane dans 50ml d'une solution d'acide acétique à 1%. La dissolution est assurée par une agitation magnétique.

Dans le but de montrer le caractère filmogène du chitosane, des membranes du chitosane, ont été préparée par les solutions de chitosane restantes (photo III. 3).



Fig. III. 3. Membranes de chitosane obtenues avec 0.5% et 2%.

La photo III. 3, montre que les membranes de chitosane sont transparentes, avec une couleur légèrement jaunâtre, cette couleur diminue progressivement avec la diminution de la concentration en chitosane.

Par la suite, on a préparé une émulsion de type H/E avec les proportions précédemment fixées et selon le protocole donné dans la partie I. Après agitation et refroidissement on a obtenu la crème présentée dans la photo III. 4.



Fig. III. 4. La crème préparée

III. 2. Caractérisation des crèmes préparées

III. 2. 1. Détermination de conductivité

Les mesures conductimétries ont été effectuées pour chaque crème préparée à température ambiante (photo III. 5).



Fig .III. 5. Mesure de conductivité

Les résultats de mesure de la conductivité des différentes crèmes préparées sont présentés dans le tableau **III.5**.

Tableau III.5. Résultats de mesure de la conductivité

Crème	Conductivité (µs/cm)	Masse (g)
Crème1 (0.5%)	106.5	10
Crème 2 (1%)	151.5	10
Crème3 (2%)	201	10

Le tableau III.5, montre que les valeurs de conductivités sont très élevées donc le sens de l'émulsion est H/E.

En plus on remarque qu'il y a une relation proportionnelle entre la concentration de solution de chitosane et la conductivité ; Plus la concentration en chitosane augmente, plus la conductivité est grande. Ce qui indique que plus la dose de chitosane augmente, plus le nombre de groupements ─NH3+ provenant de la solubilisation de notre échantillon dans l'acide acétique (CH3COOH) à 1%, et donc plus la conductivité augmente.

III. 2. 2. Détermination du pH

Les mesures de pH ont été effectuées pour chaque crème préparée à température ambiante (photo III. 6).

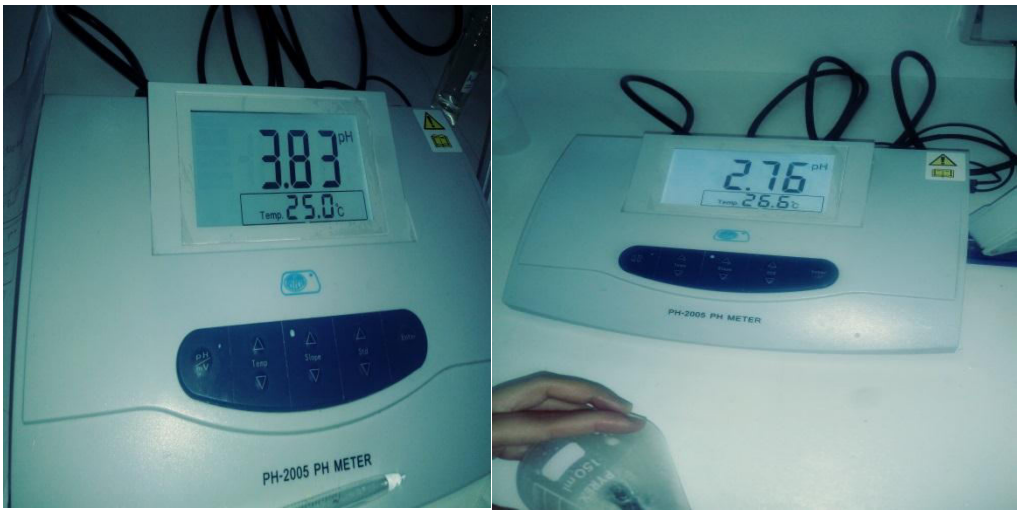


Fig. III. 6. Mesure de pH

Les résultats de mesure de pH des différentes crèmes préparées sont présentés dans le tableau III.5.

Tableau III.6. Résultats de mesure du pH

Concentration de chitosane	pH	La masse (g)
0.5 %	3.2	10
1 %	3	10
2 %	3.1	10

Le tableau III.6, montre que les crèmes préparées ont un pH sont acide, qui est du à l'ajout de la solution du chitosane. Donc ça nécessite un ajustement du pH à 6 pour qu'il soit adéquat avec le pH de la peau qui est aux alentours de 6. Sachant que le pH des préparations à usage dermique doit être compris entre 5 et 7 (Ibrir et Baba chikh, 2015)

III. 2. 3. La stabilité

L'étude de la stabilité des émulsions (H/E) préparées, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau III. 6, sachant que l'émulsification a été faite à chaud, jusqu'à le refroidissement, sous agitation mécanique en introduisant progressivement la phase huileuse dans la phase aqueuse.

III. 2. 3. 1. Test de la stabilité à la centrifugation

La stabilité physique des crèmes préparées, dans des conditions physique rigoureuse a été déterminée en utilisant une centrifugeuse régler à une vitesse de 1000, 3000 et 6000, tr/min. Ceci est réalisé en employant trois tubes remplie à la même hauteur de chaque crème. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III. 7.

Tableau III. 7. Etude de la stabilité de différentes émulsions préparées

	La vitesse de centrifugation (tr/mn) pendant 10mn		
Concentration de chitosane	**1000**	**3000**	**6000**
0.5%	+	+	+
1%	+	+	+
2%	+	+	+

(-) séparation de phase : instable ;(+) pas de séparation de phase : stable.

Le tableau III. 7, montre que toutes les crèmes préparées dans notre travail ne présentent aucun déphasage et restent stable même à 6000 tours/min (photo III. 7). Ceci est expliqué par l'ajout du chitosane qui a joué le rôle de stabilisant grâce à son pouvoir gélifiant.

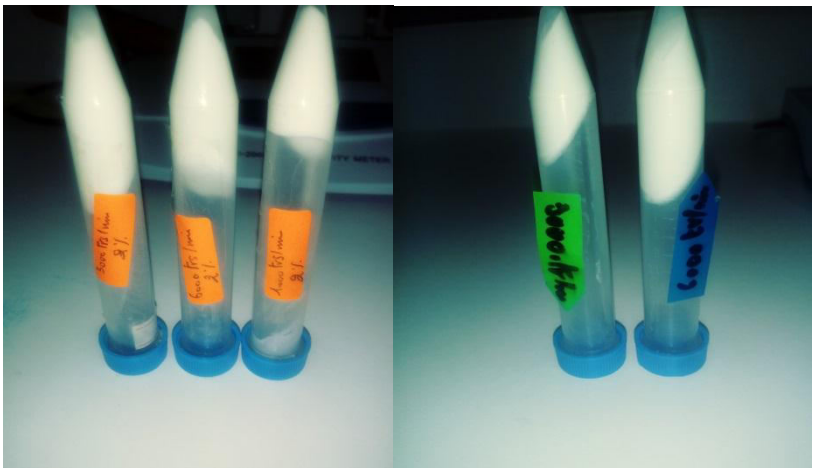


Fig. III. 7. Etude de la stabilité par centrifugation

III. 2. 3. 2. Stabilité thermique

La stabilité est fortement influencée par la température. Des conditions limites ont été choisies principalement pour voir l'influence du changement climatique sur la crème.

Les analyses de stabilité thermique d'une crème sont réalisées par observation visuelle des échantillons stockés dans l'étuve à la température (4°C, 25° C et 45°C).pendant des périodes allant de 1mois jusqu'à 6 semaines. Après incubation, aucun changement de l'aspect des crèmes étudiées n'a été observé.

Afin d'étudier l'effet de la température sur les crèmes préparées, on a étudié la stabilité physique des différentes préparations le de centrifugation. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III. 8.

Tableau III. 8. Test de la stabilité physique, des crèmes préparées, aux différentes températures

Concentration de chitosane	T°C	La vitesse de centrifugation (tr/mn) pendant 10mn		
		1000	3000	6000
0.5%	25°C	+	+	+
	4°C	+	+	+
	45°C	+	+	+
1%	25°C	+	+	+
	4°C	+	+	+
	45°C	+	+	+
2%	25°C	+	+	+
	4°C	+	+	+
	45°C	+	+	+

(-) Séparation des phases : instable ; (+) pas de séparation de phase : stable.

Le tableau montre que, toutes les formules préparées sont stables, ou on note l'absence de tout phénomène de crémage ou de séparation des phases.

III. 2. 3. 3. L'examen microscopique et macroscopique

- **Contrôle macroscopique**

✓ Caractères visuels : la crème préparée a été jugée d'une couleur blanche et de consistance molle.

✓ Caractères tactiles : la préparation n'est pas caustique, le toucher est peu épais, évanescent lisse et brillant laissant une texture plutôt légère avec une bonne sensation d'hydratation fraiche après étalement.

✓ Caractère olfactifs : la crème préparé possède une agréable odeur.

- **Contrôle microscopique**

L'observation microscopique au grossissement 40 nous a permis d'obtenir la photo III. 8. elle montre que la taille des globules est plus homogène.

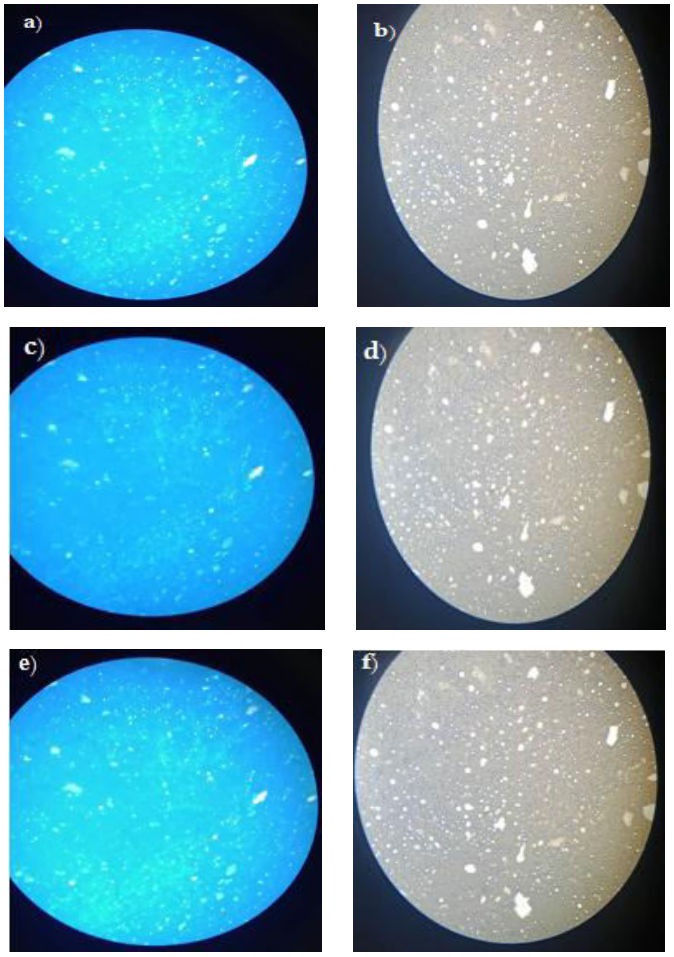


Fig. III. 8. Examen microscopique et examen au bleu de méthylène de la crème (a) 1% (b) 2% et (c) 3% de chitosane.

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'observer les bactéries. Cet coloration par une solution de bleu de méthylène.

CONCLUSION

L'objectif de notre travail est le développement de crème cicatrisation à base de chitosane. Il a été incorporé dans une préparation en tant que principe actif pour formuler une crème thérapeutique naturelle.

Pour réaliser ce travail on a procédé à :

1. Formulation de 3 crèmes aux différentes concentrations de principe actif, le chitosane 0.5%, 1% et 2%.
2. Caractérisation des crèmes obtenues ;
3. Etudier l'effet cicatrisant pour les rats de laboratoire, malheureusement le travail était annulé à cause de la pandémie COVID-19.

Les crèmes obtenues, présentent un bon caractère organoleptique.

- Odeur agréable.
- Un aspect lisse et léger au toucher.
- De consistance molle.

L'examen physico –chimique a montré que :

- Le PH de la crème est acide (3) et doit être neutralisé pour qu'il soit adapté au pH de la peau qui légèrement acide de l'ordre de 6.

- Sa conductivité est 201'µs⁄cm dans (2%) crème préparé. Les valeurs de conductivités sont très élevées donc le sens de l'émulsion est H/E.

-résultats de tests stabilité par centrifugation, toutes les crèmes préparées dans notre travail ne présentent aucun déphasage et restent stable même à 6000 tours/min Ceci est expliqué par l'ajout du chitosane qui a joué le rôle de stabilisant grâce à son pouvoir gélifiant.

-les résultats de tests stabilité thermique, par une température (45°C ,25°C, 4°C), toutes les formules préparées sont stables, ou on note l'absence de tout phénomène de crémage ou de séparation des phases.

-et les résultats microscopiques qui montrent que la taille des globules est plus homogène.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. A.Denuzier, D.Ferrier O.Damour, and A.Domard (1998), Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes : biological properties, biomaterials ,19 1275-1285.

2. Adim Hassina, Belkh Zineb (2016) Formulation d'une crème 100% bio à base du chitosane, Mémoire de Master en Génie procédés, Option Pharmacie industrielle, Université de Blida

3. Alan S., Lowe J., (1997). Anatomie pathologique générale et spéciale, De Boeck supérieure, p536.

4. Alja Wisha (2013). Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymeres, thèse de doctorat, Université de Lorraine.

5. Amilali, Malek (1999). Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO_2 ; O_2). Thèse en sciences des aliments, Université Laval, Canada.

6. A. Montembault., K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M.T. Corvol, A., Domard A. (2006). Material Decoy of Biological Media Based on Chitosan Physical Hydrogels : Application to Cartilage Tissue Engineering, *Biochimie*. 88 551– 564.

7. Ararem, F. (2010) Synthése et caractérisation de biopolymeres.Application au piégeage de colorants. Mémoire de magister (Université d'Oran,).

8. Bab chikh Souad, Ibrir Amina (2015). Formulation et controle de qualite d'une creme cicatrisation a base du gel d'aloe vera et de la bave d'escargot. Mémoire de Master ,Faculé des sciences et de la Technomogie, Université de Médéa.

9. Badaoui Fouzia (2012). Comportement rhéologique de solution de biopolymeres.Application au chitosane, au poly (Vinule alcool) et à leurs mélanges » Magister, Université M'Hamed Bougara- Boumerdes.

10. Banchereau J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 18 : 767-811.

11. Benbettaieb Naserddine (2015). « Influence de traitement de réticulation sans « Influence de traitement de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de chitosane encapsulant ou non des antioxydants naturels : caractérisation physico-chimiques et application »thèse de doctorat en cotutelle ; Université de Bourgogne et l'université de Carthage.

12. Berth G. H. Dautzenberg et M.G. Peter (1998). Physico-chemical characterization of chitosan varrying in degree of acetylation.Canbohydrate Polymers, 36, 205-218.

13. Bieber, T., Bruijnzeel-Koomen, C. (1990). La cellule de Langerhans dans la physiopathologie de la dermatite atopique [Langerhans cells in the physiopathology of atopic dermatitis]. Ann Dermatol Venereol. 117, (3) :185-93.

14. Bohannon, R.W. and B.A. Pfaller (1983). Documentation of wound surface area from tracings of wound perimeters. Clinical report on three techniques. Phys Ther., 63 (10): p. 1622- 4.

15. C.Chatelet,O.Damour,and A.Domard(2001),influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosane films,Biomaterials 22,261-268.

16. CG.Gini.., P. M. Badot et E .Guibal (2007). Chitine et chitosane : Du biopolymere à l'application préface de George A.F.Robert presses, Université de frouche-comité.

17. Chen, R.H et M. L.Tsaih (1998), Effet of températures on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute. Int. J. Biol. Macromol, 23135-141.

18. Chen S, Liu M, Jin S, Wang B .Inter.J.Pharm, 349 (2007).

19. Clark, R. A. F. (1985). Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. I. J Am Acad Dermatol, 13 (5): 701-725.

20. Couquet Y. V., Desmoulière A., Rigalb M. L. (2013) Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. Actualités pharmaceutiques Elsevier Masson SAS. http://dx.doi.org/10.1016/j.actpha,.10.005. p24.

21. Tual C., E. Espuche, M. Escoubes, A. Domard (2000). Transport Properties of Chitosan Membranes: Influence of Crosslinking, J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys. 38, 1521–1529.

22. Altiok D., E. Altiok, F. Tihminlioglu, Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications, J. Mater. Sci.: Mater. Med. 21, 2227–2236.

23. D.Hritcu., D. Humelnicu, G. Dodi, M.I. Popa (2012). Magnetic Chitosan Composite Particles: Evaluation of Thorium and Uranyl Ion Adsorption from Aqueous Solutions, Carbohydr. Polym. 87, 1185–1191.

24. Doillon C. J., Dunn, M. G., Berg, R. A. et Silver, F. H. (1985). Collagen deposition during wound repair. Scanning Elect Microsc. 11: 897-903.

25.E. Guibal. (2005). Heterogeneous Catalysis on Chitosan-based Materials: a Review, Prog. Polym. Sci. 30, 71–109.

26..F. Dupasquier. (2011). Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré, Université Claude Bernard Lyon 1.

27. Ferraq Y. (2007). Développement d'un modèle de cicatrisation épidermique après une désépidermisation laser. Thèse pour obtenir le grade de docteur en ingénierie médicale et biologique. Université Toulouse III, France.

28. Fowler, D. (1993). Principles of wound healing. In : HARARI, J. : Surgical complications and wound healing in the small animal practice. Philadelphia, Saunders, W.B. p.1-31.

29. Fox, G.M. (1988). The role of growth factors in tissue repair: III. Fibroblast growth factor. In Clark R.A.F., Henson, P.M. (Eds): The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. New York, Plenum Press, 265-271

30. F.S. Kittur, K.R. Kumar, R.N. Tharanathan , (1998). Functional Packaging Properties of Chitosan Films, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung *A*. 206, 44–47.

31. Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (1992). Atlas d'histologie. 2ème ed. Bruxelles: De Boeck-Wesmael, 320 pages.

32. Crini G. & P.-M. Badot, E. Guibal (2009). Chitine Et Chitosane : Du Biopolymère à l'application, Presses universitaires de Franche-Comté.

33. Gerbault, O. (1999). Cicatrisation cutanée. Encycl. Méd. Chir. Techniques chirurgicales-Chirurgie plastique reconstructrice et esthétique, Elsevier, Paris, 45-010.

34.G. Oguntimein, O. Animashaun, I. Okpere, **2009** Application of Chitosan in Remediation of Dyes, in: E. Nzewi, G. Reddy, S. Luster-Teasley, V. Kabadi, S.-Y. Chang, K. Schimmel, et al. (Eds.), Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology SE - 43, Springer New York, pp. 319–324 LA – English.

35.G.Peluso,O.Petillo,M.Ranieri,M.Santin,L.Ambrosio,D.Calabro(1994),Balsamo,chitosan-Mediated stimulation of Macrophage Function Biomaterials ,15 (1215-1220).

36. Griffin, J.W., et al. (1993).0 A comparison of photographic and transparency-based methods for measuring wound surface area. Phys Ther., 73, (2): p. 117-22.

37. Guo B-L, et Gao Q-Y (2007)Carbohydr.Res, 342.

38. Guo, S., DiPietro, L.A. (2010) Factors Affecting Wound Healing. 89, (3): 219–229.

39. Hé, D. (2006). Bilan des connaissances actuelles sur la cicatrisation des plaies cutanées chez le chien et le chat. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, France.

40. Hijazi Linda (2015). Viscoélasticité et structure de gel à base de chitosane –relations biopolyesters et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO_2 supercritique. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

41. Maachou H. (2005). Synthèse et caractérisation d'un échafaudage biocomposite d'hydroxyapatite /chitosane par voie biomimétique : usage orthopédique. Mémoire de Magister en Génie des procédés, Université de Médéa.

42. Hosgood G. (2003). Wound repair and specific tissue response to injury. In slatter: textbook of small animal surgery, tome 1. 3rd Ed Saunders, 2003

43. H.Ueno, F.Nakamura, M.Murakami,M.Okumura,T.Kadosawa,and T.Fujinaga (2001),Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblaste and the growth factors production by macrophages ,biomaterials ,22,2125-2130.

44. H.Ueno,H.Yamanda,I.Tanaka,N.Kaba,M.Matsuura,M.Okumura,T.Kadoswa,and T .Fujinaga(1999),Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open Wound in dogs ,Biomaterials,20,1407-1414.

45.Hunt K.T. (1988). The physiology of wound healing. The Physiological Basis of Therapy, p 443- 471.

46. Hunt, T. K., Hopf, H. et Hussain, Z. (2000), Physiology of wound healing. Adv Skin Wound Care. 13 (2 Suppl): 6-11.

47.H. Yang., B. Yuan, Y. Lu, R. Cheng (2009). Preparation of Magnetic Chitosan Microspheres and Its Applications in Wastewater Treatment, Science in China Series B: Chemistry, 52, 249–256 LA – English.

48. Imzi Sonia, Ziane Soraya (2017). Membranes de chitosane et biopolymere, Mémoire de Master en Génie procédés, option Génie des polymères, Université de Bejaia.

49. J.K.Suh and H.W Matthew(2000), Application of chitosan-based polysacharide biomaterials in cartilage tissue engineering : a review ,Biomaterials ,21,2589-2598.

50. J.Li., J. Pan, L. Zhang, Y. Yu (2003). Culture of Hepatocytes on Fructose-modified Chitosan Scaffolds, Biomaterials. 24, 2317–2322.

51. Johnston, D. E. (1992). Cicatrisation des plaies cutanées. Le point vétérinaire. Numéro spécial « chirurgie plastique et reconstructrice », 24 : 21-34

52. Johnston D.E. (1990). Wound healing in skin. Veterinary Clin N Amer Sm Anim Prac, 20 (1),1-25.

53. Kalebic, T., Garbisa, S., Glaser, B., Liotta, L. (1983) Basement membrane collagen : Degradation by migrating endothelial cells. J Cell Biol., 221:281-283.

54. Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol. 12 (4): 390-401.

55. Kim I-Y, Seo S-J, Moon H-S, Yoo M-K, Park I-Y, K Kim B-C, et Cho C-S. (2007). Biotechnol. Advances. 26.

56. Mizuno K., K. Yamamura, K. Yano, T. Osada, S. Saeki, N. Takimoto, et al. (2003). Effect of Chitosan Film Containing Basic Fibroblast Growth Factor on Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 64A, 177–181.

57. Knottenbelt D.C. (2003). Handbook of equine wound management. 1st Ed. Elsevier Science Limited.

58. Kompaore, F., J.P. Marty, and C. Dupont (1993). In vivo evaluation of the stratum corneum barrier function in blacks, Caucasians and Asians with two noninvasive methods. Skin Pharmacol., 1993, 6 (3): p. 200-7.

59. Oungbho K., B.W. Müller (1997). Chitosan Sponges as Sustained Release Drug Carriers, Int. J. Pharm. 156, 229–237.

60. Rinki K., P.K. Dutta (2010). Chitosan Based Scaffolds by Lyophilization and sc.CO_2 Assisted Methods for Tissue Engineering Applications, J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem. 47, 429–434.

61. Khelel cherfi.A,Rahmani.A,(2018),Elaboration des systems de biosorption à base des biopolymeres,Mémoire de master (Université de Médea)

62. Kumar B., Vijayakumar, M., Govindarajan, R., Pushpangadan, P. (2007). Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. J. Ethnopharmacol. 114 (2):103-113.

63. Kumar, S. Leaper, D.J. Wong, P.F. (2004) Perspectives in medical science. What is new in wound healing? Turk J Med Sci., 34: 147-160.

64. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Mitchell, R. (2007) Robbins Basic Pathology, 8th Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, (USA).928 p.

65. L.A.Dipietro, (1995) Wound-Healing-the rôle of the macrophage and Other Immune cells ,Shocks, 4,233-244

68. Rodrigues L.B., H.F. Leite, M.I. Yoshida, J.B. Saliba, A.S.C. Junior, A.A.G. Faraco (2009). In Vitro Release and Characterization of Chitosan Films as Dexamethasone Carrier, Int. J. Pharm. 368, 1–6.

69. Hassani Leila N., Fédérie Hendra et Kawthar Bouchemal (2012). Les polysaccharides amphiphiles auto-associatifs, L'actualité chimique-Octobre-Novembre, N°367- 368.

70. Le vinson H. J. (2010). ; in principales of Iithography.(ed ;Levinson ;H ; J)7-50(Society of photo-Optical Instrumentation Engineers(SPIE).

71. Li,Q, E. T. Dunn, E.W. Grandmasion and M.F.A. Goosen (1997). M.F.A (ed), Technomic publishing Co, Lancaster.

72. Payet L., F. Ponton, Pagel J., colinart L., Grpossiord Payet et al. (2002). Rhéologie caractérisation rhéologique de la gélification de l'alginate et de chitosane : effet de la température Vol. 2, 46-51.

73. Martin P. (1997). Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. Science, 276 : 75-.

74. Marty J.P., Bucks D.A, Maibach H.I. (1993). Percutaneous penetration as method of delivery to muscle and ether tissue New York, 1993.

75. Desorme M. (2011). Filage du chitosane pour l'élaboration de textiles biomédicaux innovants, Université Claude Bernard Lyon 1.

76. Soteller , M.D. S.J.Park, Y.W.Zhu, J.H.An, R.S.Ruoff (2008). NanoLetters, 8, 3498-3502.

77. Gingras M., I. Paradis, F. Berthod (2003). Nerve Regeneration in a Collagen–chitosan Tissueengineered Skin Transplanted on Nude Mice, Biomaterials. 24, 1653–1661.

78. Mignot, J. (1996). Techniques morphométrique de l'évaluation de la cicatrisation d'un ulcère,. la revue du praticien, 46: p. S1

79. Morkani Nadir (2013). Préparation et étude du comportement de membranes biopolymere alginate de sodium/chitosane. Mémoire de Magister, Université M'Hamed Bougara – Boumerdes, Algérie.

80. Sadou M. Osmane Ongoiba (2008). Etude la cicatrisation des plais operatoires dans le service d'urologie du chu du point G . Thèse de doctorat (Université de Bamako) .

81. Vizio N.G. (2005). Elaboration et caractérisation d'hydrogels physiques de chitosane pour la cicatrisation thérapeutique des brûlures, Université Claude Bernard Lyon 1.

82. Agboh O.C., Y. Qin (1997). Chitin and Chitosan Fibers, Polym. Adv. Technol., 8, 355–365.

83. Oh, J.T., et al. (2006). Quantification of the wound healing using polarization-sensitive optical coherence tomography. J Biomed Opt.

84. Ono I., Tateshita T., Inoue M. (1999). Effects of a collagen matrix containing basic fibroblastgrowth factor on wound contraction. Wiley & Sons, Inc. J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 48, 621–630.

85. Parisot, M. (2004). L'adénite sébacée granulomateuse du chien : données actualisées. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon I, Médecine - Pharmacie, France. 170p.

86. Pavletic M. M. (2010). Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3rd Ed, Wiley-Blackwell Publication.

87.P.H.Schlesinger,J.S.Stahl,Y.C,lee,C.P,stowell,and T.B.kuhlenschmidt(1980) the role of Extra-Hepatic Tissues in the Receptor-Mediated plasma-clearance of Glycoprotiene terminated by mannoser Or.N-Acetylglucosamine biochemical journal ,192,597-606.

88. Muzzarelli R.A.A., F. Greco, A. Busilacchi, V. Sollazzo, A. Gigante (2012). Chitosan, Hyaluronan and Chondroitin Sulfate in Tissue Engineering for Cartilage Regeneration: A Review, Carbohydr. Polym., 89, 723–739.

89. Agnihotri S.A., N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi (2004). Recent Advances on Chitosanbased Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery, J. Controlled Release. 100, 5–28.

90. Senet P. (2007). Physiologie de la cicatrisation cutanée. EMC, Elsevier Masson SAS, Paris, Dermatologie, 98-040-A.

91. Singer, A.J., Clark R.A.F. (1999). Cutaneous wound healing. N. Engl. J. Med. 341, (10) :738-746.

92. Smith, K. L. & Dean, S. J. (1998). Tissue repair of the epidermis and dermis. J Hand Ther: 95-104.

93. Nomanbhay S. M., K. Palanisamy (2005). Removal of Heavy Metal from Industrial Wastewater Using Chitosan Coated Oil Palm Shell Charcoal, Electronic Journal of Biotechnology; Vol 8, No 1.

94. Noel S., H. Courtney, J. Bumgardner, W. Haggard (2008), Chitosan Films: A Potential Local Drug Delivery System for Antibiotics, Clinical Orthopaedics and Related Research. 466, 1377–1382.

95. Stashak T.S. (2008). Equine wound management. 2nd Ed., A John Wiley & Sons, Inc., Publication.

96. Swaim F. S. (1997)**.** Advances in wound healing in small animal practice: current status and lines of development. Veterinary Dermatology, 8, 249-257.

97. Theoret C.L. (2004). Update on wound repair. Clin Tech Equine Pract, Elsevier, 3, 110-122.

98. T.Kosaka,Y.Kaneko,Y.Nakada,M.Matsuura and S.Tanaka (1996) ,Effet of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphnuclear cells after.Surrgical Stress, journal of veterinary Medical Science 58,963-967.

99. T.Mori,M.Okumura,M.Matsuura,K.Ueno,S.Tokura,Y.Okamoto,S.Minami,and T Fujinaga (1997),Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro ,biomaterials,18,947-951.

100. Tomczak C. (2010). Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Revue bibliographique. Thèse de médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire De lyon.

100. Tortora, G. J., Grabowski, S. R. & Parent, J. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou: Centre Éducatif et Culturel inc., 1203 pages.

102. Vowden, K. (1995). Common problems in wound care: wound and ulcer measurement. Br. J. Nurs., 4, (13): p. 775-6, 778-9.

103. Wang W. et D. Xu (1994). Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of deacetylation. Int. J. Biol. Macromol, 16 (3), 149-152.

104. Williams T.J. (1988). Factors That Affect Vessel Reactivity and Leukocyte Emigration. In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair Springer Science and Business Media

New York.

105. Witte M.B., Barbul A. (1997). General principles of wound healing. Small Annals Surgical Clinics of North America, 1997, 0039-6109.

106. Wysocki, A. B. (1999). Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. Nurs Clin North Am,. 34 (4): 777-797.

107. Wang X., N. Chi, X. Tang (2008). Preparation of Estradiol Chitosan Nanoparticles for Improving Nasal Absorption and Brain Targeting, Eur. J. Pharm. Biopharm. 70, 735–740.

108. Jiang Y., J. Li, W. Jiang (2005). Effects of Chitosan Coating on Shelf Life of Cold-stored Litchi Fruit at Ambient Temperature, LWT -- Food Science and Technology. 38, 757–761.

109. Jiang Y., Y. Li (2001). Effects of Chitosan Coating on Postharvest Life and Quality of Longan Fruit, Food Chem. 73, 139–143.

110. Y.Okamoto, K.Shibazaki, S.Minami, A.Matsuhashi, S.Tanioka, an dY.Shigemasa(1995), Evaluation of chitin and chitosane on open Wound-Healing in Dogs, journal of veterinary Midical science, 57,851-854.

111. Zahouani, H., et al. (1992). Theoretical and experimental study of wound healing: application to leg ulcers. Med Biol Eng Comput., 30, (2): p. 234-9.

Sites électroniques

1. http://www.infrance.com/Kiefer/es.Htm

2. http://www.passeportsante.net/fr/actualites/dossiers: comment-traiter-cicatrice (consulte le 15-01-2015).

3. Verola, O. (2006) Aspects anatomo-pathologiques de la cicatrisation. In : cicatrisation.info : le livre.26p.

http://www.cicatrisation.info/livre/module_1/verola/anapath_verola.pdf.v(Consulté le18-04-2011).

4. Larousse médical. La peau. http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/peau/15217.

1. Barrière physiologique : séparant la circulation sanguine du système nerveux central. Exemple : La barrière **hémato-encéphalique** empêche certains éléments comme les toxines et les agents pathogènes, qui circulent dans le sang, de pénétrer dans le cerveau.

2. Endothélium : Tissu formé de cellules plates et constituant le revêtement interne du cœur et les vaisseaux. Leur excellente perméabilité permet aux nutriments d'atteindre la partie profonde de la media.

3. fibroblaste : elle est parfois appelée cellule de soutien. Ce sont notamment des cellules résidentes du derme qui en assurent la cohérence et la souplesse.

4. L'angiogenèse : est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

5. la berge : est un lieu d'habitat pour de nombreuses espèces à la fois aquatiques et terrestres.

6. L'hémostase : est l'ensemble des phénomènes du sang et des vaisseaux sanguins prévenant ou permettant l'arrêt de l'écoulement du sang et ainsi, contrôlant physiologiquement le retour à une circulation normale.

7. La plasmine : est une peptidase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques situées préférentiellement après un résidu de lysine ou un résidu d'arginine. Elle possède à cet égard une plus grande sélectivité que la trypsine.

8. La ponction sternale : est un prélèvement de la moelle osseuse. Il est effectué avec une aiguille résistante sur la partie bossue du sternum, l'os qui relie les côtes sur le devant du thorax. À cet endroit, l'os est spongieux, et le bon endroit pour le prélèvement est très superficiel, ce qui rend relativement facile la pénétration de l'aiguille.

9. L'extravasation : En médecine, une extravasation est le passage anormal d'un liquide de son canal adducteur vers les tissus environnants, soit par rupture du canal, soit par diffusion, typiquement un épanchement d'urine en dehors de sa voie excrétrice.

10. L'interleukine-1 : est connue comme la cytokine clé des réponses immunitaires innées et a été décrite comme la «cytokine inflammatoire par excellence». L'IL-1 est principalement produite par les monocytes et les macrophages à la suite d'un stimulus externe.

11. Le leucotriène B_4 : est un lipide impliqué dans l'inflammation. Il est produit à partir du leucotriène A_4 par la leucotriène A_4 hydrolase dans les leucocytes en réponse aux médiateurs inflammatoires et est capable de provoquer l'activation des leucocytes sur l'endothélium.

12. Le lysosome : est une petite structure sphérique (une vésicule) délimitée par une membrane lipidique située dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.

13. Le pavillon : est la partie de l'oreille externe visible de l'extérieur. Il est composé d'un seul cartilage de forme complexe, ainsi que le tissu graisseux. Il focalise le son dans le conduit auditif et représente une protection physique pour le reste de l'oreille.

14. Les cellules dendritiques : sont des cellules du système immunitaire qui font partie du système phagocytaire mononucléaire, cellules présentatrices d'antigènes et qui présentent dans certaines conditions, comme leur nom l'indique, des dendrites (des prolongements cytoplasmiques).

15. Les glandes sudoripares ou sudorales : sont des organes spécialisés (en l'occurrence des glandes) qui sécrètent la sueur et pour certaines d'entre elles, des hormones ou phéromones.

16. Les myofibroblastes : jouent un rôle important dans la plasticité, la migration et la motilité de la cellule au sein du tissu conjonctif.

17. Le terme force centripète : (« qui tend à rapprocher du centre », en latin) désigne une force permettant de maintenir un objet dans une trajectoire incurvée, généralement une conique (cercle, ellipse, parabole, hyperbole).

18. Tonofibrilles : C'est un ensemble de tonofilament regroupé (On les appelle aussi le squelette interne de la cellule).

19. **Tonofilament :** Minuscule filament de kératine.

20. Un desmosome : est une région où la membrane plasmique d'une cellule adhère à une cellule adjacente ou à la lame basale sous-jacente, il est alors appelé hémi-desmosome.

21. Une substance vasoactive : est un agent endogène ou un médicament pharmaceutique qui a pour effet d'augmenter ou de diminuer la pression artérielle et/ou la fréquence cardiaque grâce à sa vasoactivité, c'est-à-dire son activité vasculaire.

22. Un mitogène : est un moyen favorisant la mitose et la division cellulaire.

23. Un textile non tissé : est un textile dont les fibres sont aléatoirement disposées au moment de sa fabrication. Ces textiles sont souvent classés selon leur domaine d'application ou selon leurs caractéristiques techniques.