



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITÉ ABDELHAMID BEN BADIS
MOSTAGANEM

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم

UNIVERSITE ABD ELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE & DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

THESE DE DOCTORAT 3ème Cycle (Doctorat LMD)

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Physiologie de la Nutrition et Santé

THEME

**Valorisation des coproduits de la seiche : Approches
thérapeutiques et pharmacologiques**

Présentée par : M^{me} DOUBBI BOUNOUA Amina

Soutenue le 24/05/2026, devant le jury:

Président : Pr. MOKHTAR Meriem

Université Abdelhamid Ibn
Badis de Mostaganem

Rapporteur de thèse : Pr. BOUFADI Mokhtaria Yasmina

Université USTHB d'Alger

Examineur : Pr CHAALEL Abdelmalek

Université Abdelhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Examinatrice : Dr. DERAMCHIA Nawel

Université Abdelhamid Ibn Badis
de Mostaganem

Examinatrice : Pr. MEZIANI Samira

Université Djillali Liabès de
Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2025-2026

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers Dieu le Tout-Puissant et Miséricordieux pour m'avoir octroyé la santé et la détermination nécessaires pour entreprendre et mener à bien ce modeste travail de recherche.

*Mes remerciements les plus sincères vont à ma Directrice de thèse, **Pr. BOUFADI Mokhtaria Yasmina**, dont l'encadrement exceptionnel a été un pilier essentiel dans la réalisation de cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour la qualité de son mentorat, sa patience inépuisable, sa rigueur académique, ainsi que pour sa disponibilité tout au long de cette aventure intellectuelle. Son expertise a illuminé chacune des étapes de ce travail.*

*Je souhaite également exprimer ma profonde reconnaissance envers **Pr. MOKHTAR Meriem**, d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance ; qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Pr. CHAALEL Abdelmalek**, professeur à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je tiens également à adresser mes vifs remerciements au **Dr. DERAMCHIA Nawel**, Professeure à l'Université de Mostaganem, d'avoir bien voulu examiner cette thèse et de faire partie de mon jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie également **Pr. MEZIANI Samira**, professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.*

Mes profonds remerciements vont également à tous les enseignants de la faculté SNV qui m'ont aidé de près ou de loin.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de cette thèse. Votre soutien a été d'une importance capitale, et je vous en suis infiniment reconnaissant.

Dédicaces

À la mémoire de mes très chers **parents**,
qui demeurent à jamais vivants dans mon cœur.
Vous avez été mes premières sources d'amour, de sagesse et de courage.
Vos sacrifices, vos prières et vos enseignements m'ont accompagné à chaque
étape de ma vie.

Même absents, je sens encore votre présence bienveillante et votre force
m'inspirer à persévérer.

Puissent ces pages témoigner de ma profonde reconnaissance et de l'immense
héritage moral et spirituel que vous m'avez transmis.
Ce travail est avant tout le vôtre.

À mes **frères et sœurs**, pour leur affection, leur compréhension et leur soutien
indéfectible. *Merci d'avoir toujours cru en moi, même dans les moments de*
doute et de fatigue. Votre présence et vos encouragements ont été une source
constante de réconfort et de motivation.

À mon **mari**, pour sa patience, sa tendresse et sa confiance.
Merci d'avoir partagé mes longues heures d'absence, mes moments de stress et
de découragement. Ton amour, ton écoute et ton soutien ont été mon ancre dans
cette traversée. Sans toi, ce chemin aurait été bien plus difficile.

À mes **oncles**, pour leur bienveillance, leurs conseils avisés et leur présence
réconfortante tout au long de mon parcours. *Votre fierté et vos encouragements*
ont été pour moi une force précieuse.

À **toute ma famille**, pour l'amour, le respect et la solidarité qui nous unissent.
Je vous dédie ce travail avec toute ma gratitude, mon affection et mon cœur.

Résumé

La valorisation biomédicale des coproduits marins constitue une voie prometteuse pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques naturels. Parmi ces ressources, *Sepia officinalis* occupe une place particulière en raison de la richesse biochimique de ses dérivés. Le présent travail a été consacré à l'étude, d'une part, du potentiel cicatrisant du β -chitosane et de la gélatine, et d'autre part, de l'effet thérapeutique des polysaccharides extraits de l'encre de seiche (SIP) sur le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) induit expérimentalement par la L-Arginine chez la rate.

Les analyses spectroscopiques (FTIR) du β -chitosane préparé ont confirmé un degré de désacétylation satisfaisant et la conservation de la structure polysaccharidique. Les essais in vivo ont démontré que les hydrogels à base de β -chitosane et de gélatine favorisent une cicatrisation rapide, avec réduction de l'inflammation, accélération de la contraction des plaies et amélioration histologique de la régénération épidermique. L'hydrogel combiné β -chitosane-gélatine a présenté une efficacité supérieure à celle du produit de référence (Cicatryl-Bio®).

Parallèlement, le traitement par les polysaccharides de l'encre de seiche a entraîné une amélioration significative des paramètres hormonaux (FSH, LH, testostérone, progestérone, estradiol) et du statut antioxydant (MDA, SOD, CAT, GSH) chez les rates SOPK, de manière dose-dépendante. L'analyse histologique a révélé une restauration quasi complète de la morphologie ovarienne, avec la réapparition de follicules sains et de corps jaunes.

Ces résultats mettent en évidence les propriétés biologiques remarquables des dérivés de *Sepia officinalis*, qu'il s'agisse du β -chitosane ou des polysaccharides d'encre, et confirment leur fort potentiel thérapeutique dans la régénération tissulaire et la régulation endocrinienne féminine.

Mots clés : *Sepia officinalis*, β -chitosane, gélatine, polysaccharides, cicatrisation, syndrome des ovaires polykystiques, valorisation.

.

Abstract

The biomedical valorization of marine by-products represents a promising approach for the development of new natural therapeutic agents. Among these resources, *Sepia officinalis* holds a particular place due to the biochemical richness of its derivatives. This study focused on evaluating, on one hand, the wound-healing potential of β -chitosan and gelatin, and on the other hand, the therapeutic effect of cuttlefish ink polysaccharides (SIP) on L-Arginine-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats.

Spectroscopic analysis (FTIR) of the prepared β -chitosan confirmed an adequate degree of deacetylation and the preservation of its polysaccharide structure. In vivo experiments demonstrated that β -chitosan and gelatin-based hydrogels significantly enhanced wound healing by reducing inflammation, accelerating wound contraction, and improving histological epidermal regeneration. The combined β -chitosan–gelatin hydrogel exhibited superior efficacy compared with the reference product (Cicatryl-Bio®).

Meanwhile, treatment with cuttlefish ink polysaccharides led to a significant improvement in hormonal parameters (FSH, LH, testosterone, progesterone, and estradiol) and antioxidant status (MDA, SOD, CAT, GSH) in PCOS rats in a dose-dependent manner. Histological examination revealed an almost complete restoration of ovarian morphology, with the reappearance of healthy follicles and corpus lutea.

These findings highlight the remarkable biological properties of *Sepia officinalis* derivatives, including β -chitosan and ink polysaccharides, and confirm their strong therapeutic potential in tissue regeneration and female endocrine regulation.

Keywords: *Sepia officinalis*, β -chitosan, gelatin, polysaccharides, wound healing, polycystic ovary syndrome, valorization.

.

ملخص

تُعدّ الاستفادة الطبية من المخلفات البحرية ذات القيمة الحيوية توجهاً واعداً في تطوير مركبات علاجية طبيعية جديدة. ومن بين هذه الموارد، تكتسب سمكة الحبار (*Sepia officinalis*) أهمية خاصة بفضل غناها بالمكونات الحيوية النشطة. يهدف هذا العمل إلى دراسة القدرة العلاجية لكل من- β الكيتوزان (β -chitosan) والجيلاتين من جهة، وتأثير السكريات المتعددة المستخلصة من حبر الحبار (SIP) من جهة أخرى، على متلازمة المبيض المتعدد الكيسات (SOPK) المحفزة تجريبياً بواسطة ال-L أرجينين عند إناث الجرذان.

أكدت التحاليل الطيفية (FTIR) لل- β الكيتوزان المحضّر درجة إزالة الأسيتيل المرضية والحفاظ على البنية المتعددة السكريات. كما أظهرت التجارب الحيوية أنّ الهلاميات المائية (Hydrogels) المحتوية على- β الكيتوزان والجيلاتين تُسرّع من عملية التئام الجروح بشكل ملحوظ، وتُقلّل الالتهاب، وتُسرّع من انكماش الجرح، وتُحسّن الترميم النسيجي للبشرة. كما بيّنت النتائج أنّ الهلام المائي المشترك- β الكيتوزان-جيلاتين أظهر فعالية تفوق المنتج المرجعي (Cicatryl-Bio®).

أما معالجة الجرذان المصابة بمتلازمة المبيض المتعدد الكيسات بالسكريات المتعددة المستخلصة من حبر الحبار، فقد أدت إلى تحسن واضح في المؤشرات الهرمونية (FSH)، LH، التستوستيرون، البروجسترون، والإسترايول (وكذلك في مؤشرات الإجهاد التأكسدي) انخفاض MDA وارتفاع SOD، CAT وGSH، وذلك بشكل يعتمد على الجرعة. كما كشف الفحص النسيجي عن استعادة شبه كاملة للبنية المبيضية مع ظهور الجريبات السليمة والأجسام الصفراء من جديد.

تؤكد هذه النتائج على الخصائص البيولوجية المتميزة للمركبات المستخلصة من *Sepia officinalis*، سواء كان ذلك ال- β -الكيتوزان أو سكريات الحبر المتعددة، مما يبرز إمكاناتها العلاجية العالية في مجال تجديد الأنسجة وتنظيم الوظائف الهرمونية الأنثوية.

الكلمات المفتاحية: سيبيا- β الكيتوزان، الجيلاتين، السكريات المتعددة، التئام الجروح، متلازمة المبيض المتعدد الكيسات، التثمين العلمي.

Liste des tableaux

Tableau 1 : le β -chitosane, comparé à l' α -chitosane	20
Tableau 2 : Echelle de cotation	36
Tableau 3 : observation macroscopique des plaies.	51
Tableau 4 : Évolution du poids corporel des rats au cours de l'étude de cicatrisation.	52
Tableau 5 : Coupes histologiques du tissu cutané (coloration H&E, $\times 100$). (A) Groupe témoin, (B) groupe traité par hydrogel de chitosane, (C) groupe traité par hydrogel de gélatine, (D) groupe traité par hydrogel combiné chitosane–gélatine, et (E) groupe traité par Cicatryl-Bio.	59
Tableau 6 : Poids corporel des rates femelles au cours de l'induction du SOPK	64
Tableau 7 : les résultats hormonaux	69
Tableau 8 : Marqueurs de stress oxydatif	77

Liste des figures

Figure 1 : <i>sepia officinalis</i> .	5
Figure 2 : organization morphporganique de <i>sepia officinalis</i>	5
Figure 3 : la seiche <i>Sepia officinalis</i>	6
Figure 4 : l'os de la seiche.	7
Figure 5 : la peau de la seiche	9
Figure 6 : l'encre de la seiche	12
Figure 7 : poche noir de l'encre	12
Figure 8 : viscères	15
Figure 9 : différentes voies de valorisation des co-produits marins	17
Figure 10 : le β chitosane de la seiche	18
Figure 11 : la gélatine	22
Figure 12 : <i>Sepia officinalis</i> .	29
Figure 13: L'OS (<i>sepia officinalis</i>)	29
Figure 14 : protocole d'extraction du β chitosane.	31
Figure 15 : la peau de la <i>sepia officinalis</i> .	32
Figure 16 : preparation des hydrogels (A: β chitosane; B: β chitosane + gelatine; C: gelatine)	33
Figure 17 : rat rasé	34
Figure 18 : création des plaies	34
Figure 19 : traitement des rats	35
Figure 20 : tissu de la plaie	37
Figure 21 : Injection (IP) de L-Arginine	39
Figure 22 : Extraction des polysaccharides à partir de l'encre	40
Figure 23 : FTIR du β chitosane préparé	47
Figure 24: FTIR du β chitosane commercial	48

Figure 25 : Evaluation de la profondeur des plaies.	53
Figure 26 : Evaluation du bourgeonnement	53
Figure 27 : Apparition d'œdème	54
Figure 28 : Evolution de l'épaisseur de la croûte	55
Figure 29 : l'Evolution de la cicatrisation des plaies au jour 0, 3, 6, 9 and 12.	56
Figure 30 : contraction des plaies au jour 0, 3, 6, 9 and 12.	56
Figure 31 : ovaire sain du groupe témoin .	65
Figure 32 : ovaire polykystique.	65
Figure 33 : l'appareil génitale d'une femelle avec SOPK	66
Figure 34 : poids des ovaires	67
Figure 35 : Taux de testostérone sérique dans les différents groupes	70
Figure 36 : Taux de FSH dans les différents groupes	71
Figure 37 : Taux de LH dans les différents groupes.	72
Figure 38 : Taux de Progestérone dans les différents groupes.	73
Figure 39 : Taux de L' Estradiol dans les différents groupes.	74
Figure 40: concentration de malondialdéhyde (MDA) ovarien.	78
Figure 41: concentration du SOD ovarien	79
Figure 42: concentration du CAT.	80
Figure 43: concentration du GSH	81
Figure 44: Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe témoins. An : antrum typique, FI : follicule primaire, FII : follicule secondaire, G: granulosa, TC : tissus connectif, TI: thèque interne, TE: thèque externe VS : vaisseaux sanguin (H E).	83
Figure 45: Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe exposé aux L-arginine. K : Kyste, TC : tissus connectif, VS : vaisseaux sanguin (H E)	84
Figure 46: Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe traité avec 50 mg/kg de polysaccharides (E et F) . An : antrum typique, FI : follicule primaire, FII : follicule secondaire, FIII : follicule tertiaire, G: granulosa, TC : tissus connectif, TI: thèque interne, TE: thèque externe VS : vaisseaux sanguin (H E).	85
Figure 47: Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe traité avec 100 mg/kg de polysaccharides (G, H, I et J) An : antrum typique, FII : follicule secondaire, FIII : follicule	87

tertiaire, G: granulosa, TC : tissus connectif, TI: thèque interne, TE: thèque externe VS : vaisseaux sanguin (H E).

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Abs : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique

AG : Acide gras

AGPI : Acides gras polyinsaturés

An : Antrum typique

CAT : Catalase

Cd : Cadmium

CNRDPA : Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture

DD : Degré de désacétylation

DHA : Acide docosahexaénoïque

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DL : Ligne de démarcation

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

Ep : Épithélialisation

EPA : Acide eicosapentaénoïque

FI : Follicule primaire

FII : Follicule secondaire

FIII : Follicule tertiaire

FP : Prolifération des fibroblastes

FSH : Hormone folliculo-stimulante (*Follicle Stimulating Hormone*)

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

G : Granulosa

GlcN : D-glucosamine

GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCl : Chlorure d'hydrogène

Hg : Mercure

IC : Cellules inflammatoires

IFN- γ : Interféron gamma

IL-2 : Interleukine-2

K : Kyste

LH : Hormone lutéinisante

MDA : Malondialdéhyde

mmol : Millimole

NA : Néoangiogenèse

NaOH : Hydroxyde de sodium

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*)

Pb : Plomb

PHA : Polyhydroxyalcanoates

pH : Potentiel d'hydrogène

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)

SEM : Microscopie électronique à balayage

SHBG : Globuline liant les hormones sexuelles (*Sex Hormone-Binding Globulin*)

SIP : Polysaccharides sulfatés de l'encre de seiche

SOD : Superoxyde dismutase

SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques

TC : Tissu conjonctif

TE : Thèque externe

TEM : Microscopie électronique à transmission

TG : Thermogravimétrie

TI : Thèque interne

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

UV : Ultraviolets

VS : Vaisseaux sanguins

XRD : Diffraction des rayons X

Tables des matières

« Valorisation des coproduits de la seiche : Approches thérapeutiques et pharmacologiques »

Remerciements

Dédicace

Résumé

ABSTRACT

الملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Partie bibliographique

Introduction générale 1

Chapitre I : valorisation des coproduits de la seiche (*Sepia officinalis*)

I.1. Écologie des céphalopodes de la côte algérienne	3
I.1.1. Distribution géographique	3
I.2. Description de l'espèce étudiée : <i>Sepia officinalis</i>	3
I.2.1. Classification	4
I.3. Les coproduits de la seiche	6
I.3.1. L'os de seiche	6
I.3.1.1. Composition chimique et structurale	6
I.3.1.2. Applications biomédicales	7
I.3.2. La peau de la seiche	9
I.3.2.1. Composition biochimique	9
I.3.2.2. Propriétés biologiques et fonctionnelles	10
I.3.2.3. Applications biomédicales et cosmétiques	10
I.3.2.4. Applications industrielles et environnementales	11
I.3.3. L'encre de seiche	12
I.3.3.1. Composition biochimique	12
I.3.3.2. Propriétés biologiques	13

I.3.3.3. Applications biomédicales	14
I.3.3.4. Applications agroalimentaires et cosmétiques	14
I.3.4. Les viscères	15
I.3.4.1. Composition biochimique	15
I.3.4.2. Propriétés biologiques	16
I.4. Stratégies de valorisation des coproduits de la seiche	16
I.4.1. Le β -chitosane	17
I.4.1.1. Propriétés biologiques du β -chitosane	18
I.4.1.2. Applications biomédicales et technologiques du chitosane	18
I.4.1.3. β -chitosane et cicatrisation	21
I.4.2. Hydrolyse enzymatique des protéines	22
I.4.2.1. La gélatine	22
I.4.2.1.1. Structure et caractéristiques biochimiques	22
I.4.2.1.2. Caractéristiques de la gélatine marine	23
I.4.2.1.3. Gélatine et cicatrisation des plaies	23
I.4.3. Fractionnement de l'encre	24
I.4.3.1. Polysaccharides d'encre de seiche (SIP) et SOPK	24
I.4.4. Approches biotechnologiques	26
I.4.5. Approches industrielles et environnementales	27

Partie expérimentale

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1. Activité cicatrisante du β -chitosane et de la gélatine	29
II.1.1. Matériel animal	29
II.1.2. Préparation de l'os de seiche	29
II.1.3. Extraction de la chitine et conversion en chitosane	30
II.1.4. Préparation du β -chitosane	30
II.1.5. Analyse FTIR et degré de désacétylation	31
II.1.6. Extraction de la gélatine	31
II.1.7. Préparation des hydrogels	32
II.1.8. Étude in vivo	33
II.1.8.1. Test d'irritation cutanée	33
II.1.8.2. Modèle animal	33
II.1.8.3. Alimentation	34
II.1.8.4. Protocole expérimental	34
II.1.8.5. Regroupement des animaux	35

II.1.8.6. Évaluation de l'activité cicatrisante	35
II.1.8.7. Évaluation de la cicatrisation	36
II.1.8.8. Étude histologique	37
II.2. Effet des polysaccharides SIP sur le SOPK	39
II.2.1. Matériel biologique	39
II.2.2. Induction du SOPK	39
II.2.3. Préparation et caractérisation des SIP	40
II.2.4. Répartition des groupes expérimentaux	40
II.2.5. Dosages hormonaux	41
II.2.6. Poids des ovaires	41
II.2.7. Étude histologique des ovaires	43
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Activité cicatrisante du β -chitosane et de la gélatine	47
III.1.1. Caractérisation du β -chitosane (FTIR, DD)	47
III.1.2. Test d'irritation cutanée	50
III.1.3. Suivi clinique des plaies	50
III.1.4. Évolution du poids corporel	51
III.1.5. Évaluation de la cicatrisation	52
III.1.6. Étude histopathologique	57
III.2. Effet des polysaccharides SIP sur le SOPK	64
III.2.1. Suivi du cycle œstral	64
III.2.2. Observations macroscopiques	65
III.2.3. Poids des ovaires	67
III.2.4. Résultats hormonaux	69
III.2.5. Statut antioxydant (MDA, SOD, CAT, GSH)	77
III.2.6. Etude histologique	82
Conclusion et perspectives	
Références bibliographiques	
Publication	

Introduction

Durant la dernière décennie, les avancées scientifiques ont mis en évidence le rôle essentiel des écosystèmes marins comme réservoirs de biomolécules et de composés bioactifs d'intérêt pour la biotechnologie. Ces ressources présentent des applications variées dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et médical (Kim & Wijesekara, 2010; Martins et al., 2014). Toutefois, leur valorisation industrielle reste encore limitée, en raison de la difficulté d'évaluer leur potentiel réel, de la dépendance vis-à-vis des fluctuations du marché et de la nécessité d'assurer une gestion durable des ressources marines (Suleria et al., 2015; Arshad et al., 2020). Ainsi, la biotechnologie marine exige des stratégies d'exploitation responsables et durables afin de garantir la pérennité des filières concernées (Martins et al., 2014; Arshad et al., 2020).

D'après la FAO, plus de 200 millions de tonnes de produits marins (poissons, crustacés, mollusques, algues, etc.) sont pêchés ou récoltés chaque année à l'échelle mondiale. Ces produits peuvent être consommés sous différentes formes : frais, congelés, séchés ou transformés.

Une proportion importante du tonnage issu de la pêche est destinée à la transformation pour la consommation humaine. Toutefois, ces procédés génèrent jusqu'à 50 % de déchets par rapport au volume total traité (Je et al., 2007). Bien que ces sous-produits soient naturellement riches en nutriments, notamment en protéines, ils sont souvent rejetés sans valorisation spécifique, ce qui entraîne divers problèmes de contamination environnementale (Rustad et al., 2011). Néanmoins, avec des mesures de gestion adaptées, ces déchets peuvent être convertis en co-produits, définis comme des fractions non utilisées mais récupérables lors des étapes classiques de transformation (Shahidi, 2006). Les co-produits les plus couramment issus de la filière halieutique incluent les têtes, les viscères, les arêtes, les queues, les nageoires et les peaux (Venugopal, 2011).

La valorisation de ces co-produits représente aujourd'hui un enjeu majeur, car elle contribue à compenser en partie la raréfaction des ressources marines tout en réduisant les coûts liés au traitement des déchets, souvent supportés par les entreprises sous forme de taxes environnementales (Shahidi, 2006; Rustad et al., 2011). Ces co-produits doivent désormais être considérés comme de véritables matières premières, utilisables dans divers secteurs tels que l'alimentation humaine et animale, la cosmétique ou encore la santé (Venugopal, 2011).

En Algérie, la seiche commune (*Sepia officinalis*) occupe une place importante dans les pêcheries locales. Sa transformation génère plusieurs types de déchets : la peau et le bec, représentant environ 8 % du poids de l'animal, l'os de seiche (7 %) et la masse viscérale avec les yeux (plus de 20 %) (Richard, 2001). Ces sous-produits, lorsqu'ils ne sont pas valorisés, constituent une source majeure de pollution et imposent aux industriels des charges financières supplémentaires pour leur gestion (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008).

Une étape essentielle du cycle industriel de la seiche est son conditionnement, frais ou congelé, destiné principalement à l'exportation. Ce procédé génère à la fois des co-produits solides (têtes, peaux, viscères) et des co-produits liquides (effluents des eaux de lavage). Dans un contexte de préoccupations environnementales croissantes, les entreprises sont incitées à adopter des stratégies de valorisation durable, combinant efficacité économique et respect de l'environnement (FAO, 2018). Les procédés doivent ainsi être économiquement viables, tout en limitant les investissements et la consommation énergétique.

Dans ce cadre, les biotechnologies offrent des perspectives intéressantes : elles permettent d'exploiter ces biomasses marines à l'aide d'organismes vivants (bactéries, levures, champignons) ou de biomolécules actives comme les enzymes, associées à des procédés physico-chimiques (broyage, chauffage, contrôle du pH, séparation, purification, centrifugation, séchage, etc.), afin de produire des composés à forte valeur ajoutée pour les secteurs alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Rimouski, 2020).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre général de la valorisation enzymatique de produits de la pêche. Il a pour principal objectif l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique à partir des produits et co-produits de la seiche commune (*S. officinalis*).

La première partie de ce travail s'intéresse à L'extraction du β chitosane à partir du l'os de la seiche commune (*S. officinalis*), et la gélatine à partir de la peau de la seiche commune. Et l'Etude de ces propriétés cicatrisantes.

La deuxième partie consiste à extraire des polysaccharides à partir du l'encre de la seiche commune et l'étude de son effet sur la polykystique ovarienne

Chapitre I : valorisation des coproduits de la seiche (*Sepia officinalis*)

I.1. Ecologie des Céphalopodes de la côte algérienne

I.1.1. Distribution géographique

L'analyse de la répartition géographique des céphalopodes le long de la côte algérienne repose sur les données collectées lors de la campagne halieutique réalisée par le [CNRDPA \(2012\)](#). Les zones de pêche situées à l'ouest, entre Ghazaouet et Mostaganem, se distinguent par une densité plus élevée en céphalopodes ([CNRDPA, 2012](#)).

Selon [Najai \(1983\)](#), *Eledonemoschata* est une espèce endémique typiquement méditerranéenne, observation confirmée par [Silva et al. \(2011\)](#) qui soulignent également son abondance. À l'inverse, *Octopus vulgaris* est une espèce à large répartition géographique, considérée comme cosmopolite.

Certaines espèces ont été observées de manière occasionnelle, n'apparaissant qu'une seule fois durant l'échantillonnage. C'est le cas de *Brachioteuthis riisei*, *Sepiolarondeletii* et *Todarodeseblanae*. Cette dernière a été recensée uniquement dans la partie orientale du littoral algérien, bien qu'elle figure parmi les espèces les plus fréquentes au printemps dans le nord-est de la mer Ionienne, aux côtés de *Illex coindetii* ([Lefkaditou et al., 2003](#); [Belcari&Sartor, 1993](#)).

I.2. Description de l'espèce étudiée : *Sepia officinalis*

Sepia officinalis est un céphalopode qui peut atteindre 40 cm de long. Son corps, d'une couleur brunâtre variant suivant le milieu ambiant, est de forme ovale, assez large et aplati ([fig. 1](#)). Il est bordé depuis la tête jusqu'au bout par des replis natatoires qui ondulent lorsque la seiche se déplace ou qu'elle reste en position statique ([Boucaud-Camou&Boletzky, 1988](#)). La tête possède deux grands yeux dont l'iris a la forme d'un W ([Hanlon& Messenger, 1996](#)). La bouche est entourée de dix tentacules, deux longs et huit courts, dont elle se sert pour chasser. Sa technique est redoutable : elle adapte sa couleur à celle du milieu ambiant, reste immobile en suspension au-dessus du fond face à sa proie et dresse au-dessus de sa tête deux de ses tentacules courts comme pour l'hypnotiser. D'un seul coup, elle propulse ses deux longs tentacules munis de ventouses sur sa cible, puis les ramène très rapidement pour engloutir l'animal dans son bec ([Chichery, 1992](#)) ([fig. 2](#)).

Sepia officinalis peut également se déplacer très vite pour échapper à un danger en expulsant de l'eau par un siphon situé près de sa tête et masquer sa fuite en lançant de l'encre, qui était autrefois utilisée comme colorant et encre d'écriture (Hanlon & Messenger, 1996). Le plus souvent, *S. officinalis* vit sur les fonds sableux, soit un peu enfouie dans le substrat, soit en position statique à quelques centimètres au-dessus du fond (Boucaud-Camou & Boletzky, 1988). Elle pond des œufs noirs en grappe qu'elle fixe sur un support tel que les algues, les zostères ou les roches (Boletzky, 1983).

I.2.1. Classification

Source: (World Register of Marine Species, 2023)

Animalia (Règne)

Mollusca (Embranchement)

Cephalopoda (Classe)

Coleoidea (Sous-classe)

Decapodiformes (Super-ordre)

Sepiida (Ordre)

Sepiina (Sous-ordre)

Sepioidea (Super-famille)

Sepiidae (Famille)

Sepia (Tribu)

Sepia officinalis (Espèce)

Sepia officinalis (linné, 1753)

Classe :Céphalopodes

Genre : Sepia

Espèce :officinalis

La seiche commune (*S. officinalis*)

Chapitre I : valorisation des coproduits de la seiche (*Sepia officinalis*)

Noms vernaculaires français: casseron, chakod, chibia, margade, seiche, seppia.



Figure 1: *Sepia officinalis* (World Register of Marine Species, 2023)

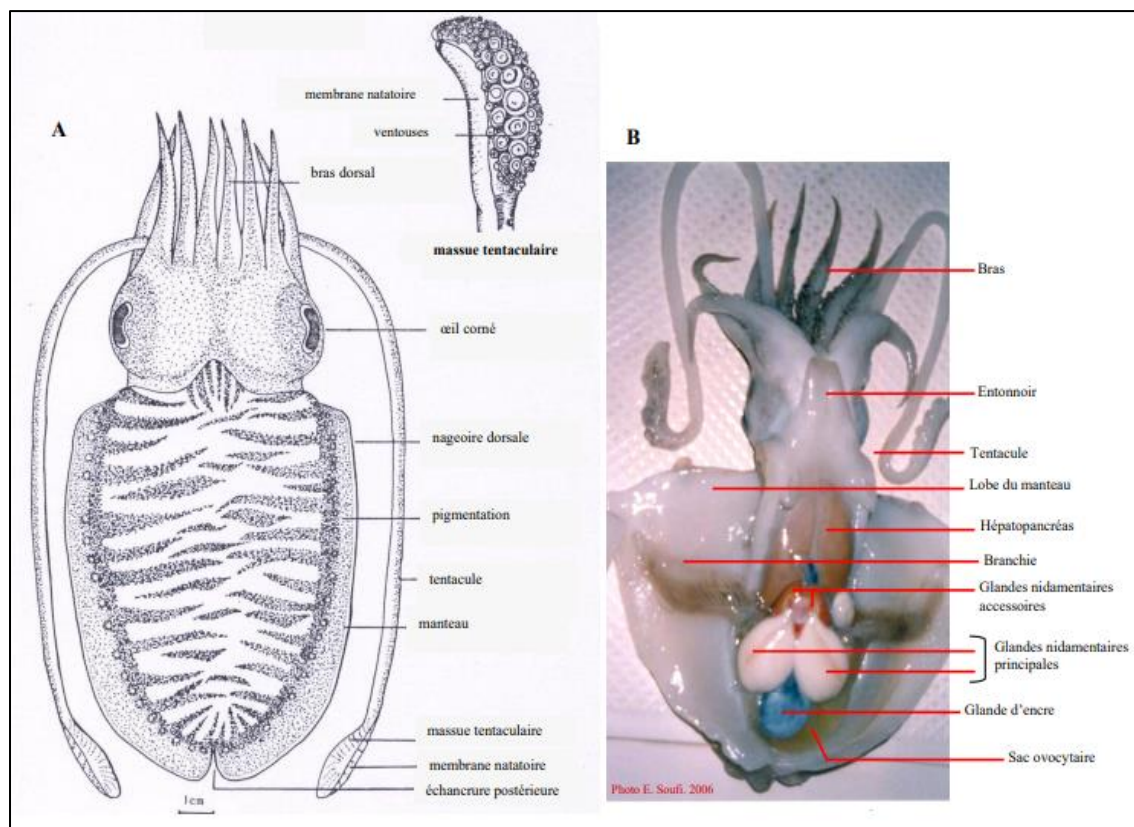


Figure2: organization morphologique de *sepiofficialis* (tompsett, 1939)

I.3.Les co-produits de la seiche

La seiche (*Sepia officinalis*) génère des coproduits lors de sa transformation, tel que l'os, l'encre, la peau et les viscères (Longtemps considérés comme des déchets) (fig. 3). La valorisation de ces coproduits s'inscrit ainsi dans une démarche de développement durable et de production de composés à potentiel biomédical (Sila&Bougatf, 2016).

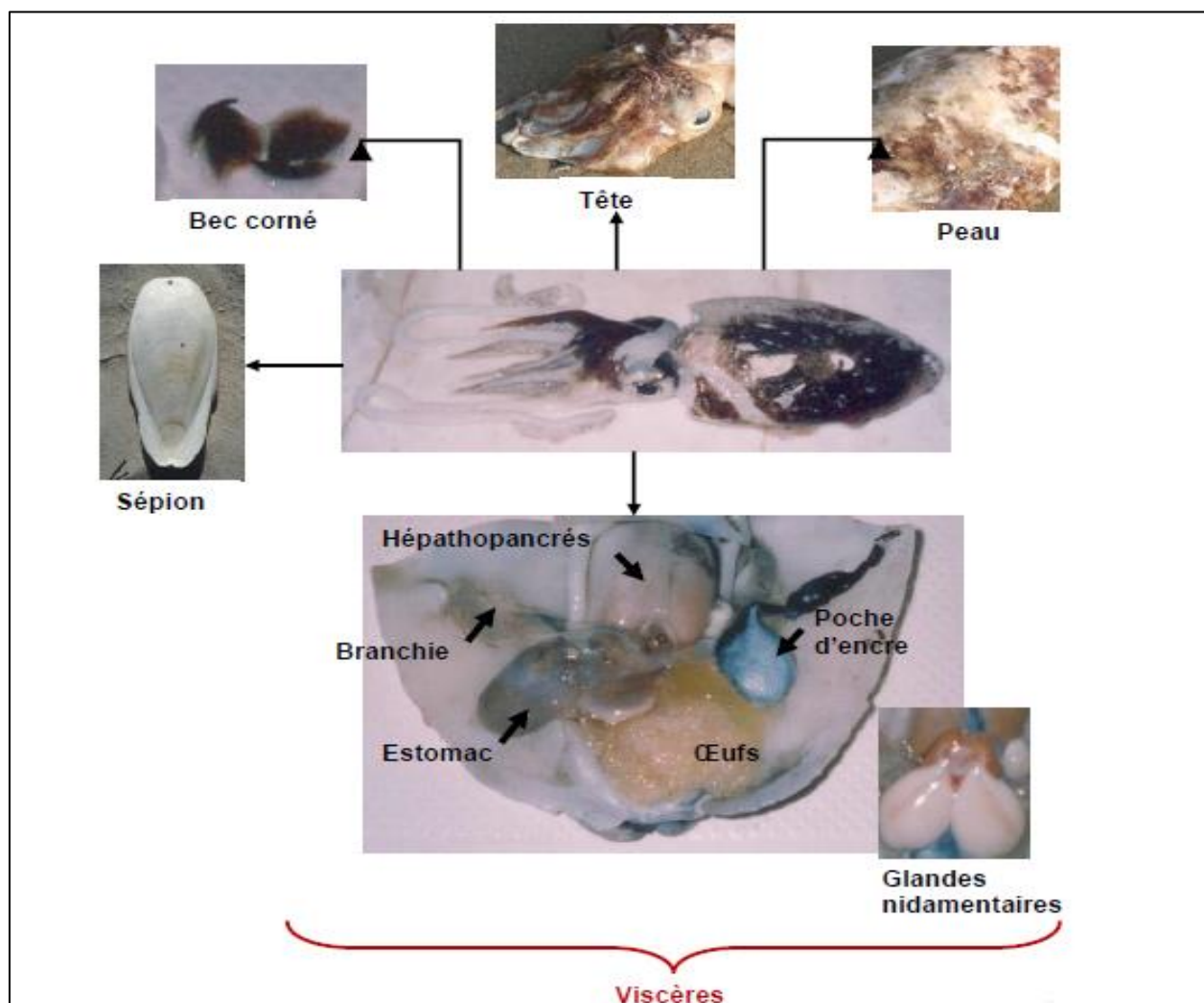


Figure 3: la seiche *Sepia officinalis* (Emna Soufi, 2006).

1.3.1. L'os de seiche

1.3.1.1.Composition chimique et structurale

L'os de seiche, qui est la partie intérieure poreuse habituelle de *Sepia officinalis*, a un rôle important en donnant à la fois de l'aide et la possibilité de flotter (fig. 4). Sa matière est surtout faite de minéraux, avec 80 à 85 % de carbonate de calcium (CaCO_3) en aragonite, qui

a une forme de cristal particulière. Il y a aussi une matière organique (8 à 10 %) faite de protéines comme le collagène, de glycoprotéines, de chitine, et différents sucres, et un peu d'oligo-éléments comme le magnésium, le sodium, le potassium et le strontium, qui changent ses forces et ses effets sur le corps (Florek et al., 2009; Žigon et al., 2021).



Figure 4: l'os de la seiche (Nouj et al., 2022).

Pour ce qui est de sa forme, l'os de seiche a une structure en trois dimensions de pièces qui se suivent, séparées par des murs avec des trous, ce qui crée une petite structure comme un nid d'abeilles. Cette façon d'être organisé explique pourquoi il est très léger et a une force mécanique spéciale impressionnante, comme certains matériaux biologiques faits par l'homme (Morrison & Ward, 2019). Les trous représentent environ 90 % de sa matière, ce qui en fait un bon exemple pour faire pousser des tissus et copier la nature (Alves et al., 2022). De plus, le mélange d'une partie minérale active (aragonite) et d'une matière organique lui donne une activité biologique naturelle, qui aide les cellules à coller et à se multiplier (Alves et al., 2022).

1.3.1.2. Applications biomédicales

1.3.1.2.1. Substitut osseux et ingénierie tissulaire

La structure poreuse du cuttlebone présente de fortes analogies avec l'ostrabéculaire des mammifères, ce qui justifie son utilisation potentielle comme substitut osseux naturel. Plusieurs études expérimentales ont confirmé cet intérêt. En effet, l'implantation de fragments de cuttlebone chez l'animal favorise la prolifération des ostéoblastes sains que la

néoformation osseuse (Xu et al., 2024). De plus, ce biomatériau se distingue par une biodégradabilité contrôlée, caractérisée par une libération progressive d'ions calcium et carbonate qui stimulent la minéralisation (López-Cervantes et al., 2021). Enfin, ses propriétés structurales et chimiques en font un excellent scaffold biomimétique pour l'élaboration de céramiques bioactives, telles que l'hydroxyapatite ou des composites associant bioverre et cuttlebone (Palakurthy et al., 2015; Kannan et al., 2019).

1.3.1.2.2. Applications en cicatrisation et médecine régénérative

Des études récentes ont prouvé que les substances venant de l'os de seiche aident à mieux guérir la peau, surtout parce qu'elles libèrent des ions calcium. Ces ions aident les cellules à communiquer et permettent aux fibroblastes de se contracter, ce qui est très important pour que les tissus se réparent (Chen et al., 2023).

Dans le secteur de la médecine qui répare les tissus, l'os de seiche et ce qui en vient intéressent de plus en plus comme matériaux biologiques. On les étudie comme supports pour faire des matériaux biologiques mélangés pour plusieurs utilisations médicales : réparer les dents, comme remplacer l'os autour des dents ; réparer les problèmes dans les os causés par des blessures ou des maladies ; et créer des systèmes qui libèrent doucement des médicaments ou des éléments qui aident à la croissance (Palakurthy et al., 2015 ; Alves et al., 2022).

Le chitosane, qui vient de la chitine retirée de l'os, a des qualités très bonnes (Rabea et al., 2003 ; Wu et al., 2021) :

- Anti-bactériennes : il empêche les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ de se multiplier.
- Cicatrisantes : il aide les fibroblastes et les kératinocytes à bouger, ce qui améliore la réparation de la peau.
- Filmogènes : il crée des gels et des hydrogels qui protègent, ce qui est utile pour des usages médicaux.

Ces qualités permettent de nombreuses utilisations : des pansements qui aident, des hydrogels qui soignent et des supports pour la thérapie cellulaire (Wu et al., 2021).

1.3.1.2.3. Supplémentation en calcium et carbonate de calcium

L'os de seiche est une source exceptionnelle de carbonate de calcium (CaCO_3). On emploie généralement des méthodes invasives telles que la calcination à haute température pour obtenir de la chaux, ou des traitements acides qui permettent de libérer le carbonate (Alves et al., 2022). Le carbonate de calcium brut a des applications variées, qu'il s'agisse des matériaux de construction, des biomatériaux osseux ou des additifs alimentaires (López-Cervantes et al., 2021).

Sous forme de poudre, l'os de seiche est couramment employé comme source de calcium naturelle dans la nourriture pour animaux, surtout pour les oiseaux, les reptiles et les poissons décoratifs (Arul et al., 2012). Cet emploi très ancien est de nouveau populaire dans le secteur de la nutrition humaine, où le calcium venant de la mer est très apprécié, car il est mieux absorbé par le corps que le calcium artificiel (Roveri&Iafisco, 2010; Schaafsma et al., 2000).

I.3.2. La peau de la seiche

I.3.2.1. Composition biochimique

La peau de la seiche (fig. 5) est une structure organique complexe, qui sert à protéger l'animal, à le cacher et à l'aider à communiquer. Elle est faite de protéines comme le collagène marin, l'élastine et d'autres glycoprotéines, qui la rendent solide et souple (Derby, 2014). De plus, des sucres, surtout la chitine et d'autres glycosaminoglycanes, aident aussi à la rendre résistante et à lui donner ses propriétés mécaniques (Madhu et al., 2016).



Figure 5 : la peau de la seiche (Yearsley et al., 2000).

La couleur vient de différents types de cellules spéciales : les mélanophores, qui ont des mélanines et font les couleurs foncées ; les chromatophores (jaunes, rouges, bruns), avec beaucoup de caroténoïdes et de ptéridines ; et les iridophores ou leucophores, faits de protéines en cristaux qui créent des reflets et des effets d'optique pour se camoufler (Hanlon et Messenger, 2018).

Les graisses, surtout les acides gras oméga-3 (EPA, DHA), donnent à la peau des propriétés anti-inflammatoires et actives (Palmegiano et al., 2008).

I.3.2.2. Propriétés biologiques et fonctionnelles

I.3.2.2.1. Activité antioxydante et anti-inflammatoire

Les parties de protéines et de couleurs venant de la peau de la seiche montrent une bonne action antioxydante, surtout car elles peuvent attraper les éléments libres et empêcher la graisse de s'abîmer (Chen et al., 2019). Ces actions sont liées à la présence de petits morceaux de protéines actifs et de couleurs de la mer comme les mélanines et les caroténoïdes, connus pour leur capacité à arrêter les éléments qui rendent l'oxygène actif (ROS) (Zhou et al., 2020). Plus récemment, (Kim et al., 2023) ont prouvé que certains petits morceaux de protéines pris de la peau de *Sepia officinalis* ont un effet anti-inflammatoire en labo presque pareil à celui de l'ibuprofène, ce qui ouvre des possibilités d'utilisation dans les compléments alimentaires et les médicaments.

I.3.2.2.2. Activité antimicrobienne et antifongique

Les substances antimicrobiennes venant de la peau de la seiche ont prouvé qu'elles pouvaient tuer beaucoup de microbes, comme le *Staphylococcus aureus*, l'*Escherichia coli* et certains types de champignons (Li et al., 2019). Elles marchent surtout en se fixant sur les microbes, ce qui casse les cellules et empêche leur développement (Wang et al., 2021). C'est pour cela que ces parties de la peau de seiche sont très bonnes pour créer des produits antimicrobiens, et pour servir de conservateurs classiques dans le domaine de la nourriture (Zhang et al., 2022).

I.3.2.3. Applications biomédicales et cosmétiques

I.3.2.3.1. Biomédecine

La peau de la *Sepia officinalis* pourrait être une bonne source de composés naturels actifs, utilisables dans différents traitements médicaux. Pour aider la peau à guérir, les petits morceaux

de protéines séparées, les cellules à bouger et créent plus de collagène, ce qui accélère la réparation des tissus (Wu et al., 2021). De plus, certaines couleurs foncées retirées de la peau pourraient lutter contre le cancer, en tuant certaines cellules malades tout en protégeant les cellules saines du stress (Li et al., 2020). Également, les protéines de la peau de seiche peuvent servir de bases actives, ajoutées à des gels ou des films pour la médecine, afin de mieux contrôler la façon dont les médicaments sont diffusés (Zhang et al., 2022).

I.3.2.3.2. Cosmétiques

Les éléments bioactifs de la peau de *Sepia officinalis* sont aussi très utiles dans le monde des produits de beauté. On utilise des éléments retirés qui ont beaucoup de défense naturelle dans des produits qui luttent contre le vieillissement, aidant à réduire les effets mauvais de l'oxydation et à défendre la peau face aux éléments destructeurs (Kim et al., 2021). De plus, les couleurs naturelles qui viennent de la peau de seiche sont une option plus respectueuse de l'environnement et durable que les colorants artificiels, tout en offrant une bonne tenue de la couleur (Zhang et al., 2020). Pour finir, la présence de matières naturelles hydratantes comme la chitine et le collagène marin permet de les ajouter dans différents produits de beauté, comme les crèmes qui hydratent, les masques et les shampoings, car ils forment une couche protectrice et aident à la réparation de la peau (Sionkowska et al., 2015).

I.3.2.4. Applications industrielles et environnementales

La peau de la *Sepia officinalis* est un atout polyvalent pour de nouvelles utilisations dans différents secteurs techniques. Dans les biomatériaux, le collagène et la chitine retirés de la peau peuvent être transformés en films et revêtements qui se décomposent naturellement, ce qui est utile pour les emballages écologiques et la réparation des tissus du corps (Sionkowska et al., 2015). Les qualités spéciales de lumière des iridophores sont aussi utilisées pour créer des détecteurs biologiques modernes, surtout pour trouver des choses dangereuses dans l'environnement et surveiller la pollution (Ghoshal et al., 2016). De plus, des méthodes de transformation chimique par la chaleur, comme la pyrolyse, aident à utiliser l'énergie de la peau de seiche, ce qui permet de créer du biochar et des biocarburants, participant ainsi à l'amélioration de solutions énergétiques durables (Zou et al., 2022).

I.3.3.L'encre de seiche

I.3.3.1. Composition biochimique

L'encre de seiche est un liquide noir sécrété par le sac à encre (fig. 6 et 7), une glande spécialisée située à proximité du rectum des céphalopodes. Elle est constituée d'un ensemble de composés dont la synthèse conviendrait à un chef étoilé tant les pratiques sont complexes et innovantes chez ces animaux ! Et les propriétés trouvées dans leurs encriers sont surprenantes (Zheng *et al.*, 2019).



Figure 6 : l'encre de la seiche (joy, 2015).

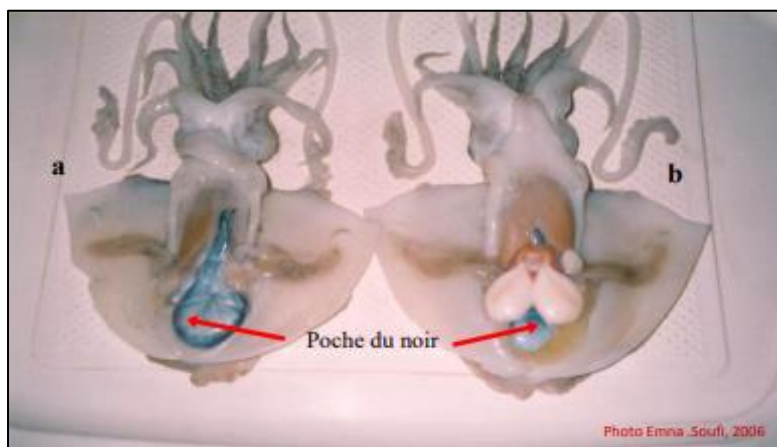


Figure 7: poche noir de l'encre (Emna Soufi, 2006).

- colorants : la mélanine constitue la fraction majeure (15-20 % du poids sec) et elle est à l'origine de la couleur noire de l'encre de seiche (Derby, 2014).

- Polysaccharides : l'encre contient des polysaccharides sulfates riches en fucose, galactose, mannose et glucosamine, et nous pensons qu'ils participent aux activités antioxydantes et immunomodulatrices de l'encre de seiche (Zheng et al., 2019).
- Protéines : on retrouve dans l'encre une grande diversité d'enzymes oxydatives dont la tyrosinase qui participe à la biosynthèse de la mélanine, mais également des peptides bioactifs ayant des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Fiore et al., 2019).
- Lipides : l'encre contient aussi des phospholipides et des acides gras polyinsaturés reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et cardioprotectrices (Zhang et al., 2020).
- Minéraux : elle est aussi une source de calcium, magnésium, zinc et cuivre qui sont des minéraux importants pour la santé de l'Homme, mais aussi pour l'activité des enzymes ou la stabilité des complexes bioactifs (Derby, 2014).

I.3.3.2. Propriétés biologiques

I.3.3.2.1. Activité antioxydante

Les polysaccharides de l'encre de seiche (SIP) ont été identifiés comme de puissants antioxydants naturels. Plusieurs travaux ont montré qu'ils possèdent une forte capacité de piégeage des radicaux libres, notamment le DPPH, l'ABTS et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), traduisant une action directe de neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Li et al., 2021). Par ailleurs, ils exercent un effet protecteur indirect en stimulant les systèmes de défense antioxydants endogènes : augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GPx), ainsi que la restauration des niveaux de glutathion réduit (GSH), considéré comme un marqueur clé du statut redox cellulaire (Li et al., 2021).

I.3.3.2.2. Activité immunomodulatrice

Les polysaccharides de l'encre de seiche (SIP) ont démontré une activité immunomodulatrice en stimulant la prolifération des macrophages et en augmentant la sécrétion de cytokines telles que l'interleukine-2 ($IL-2$) et l'interféron- γ ($IFN-\gamma$), ce qui contribue à l'activation de la réponse immunitaire adaptative (Wang et al., 2022; Li et al., 2021).

I.3.3.2.3. Activité anti-inflammatoire

Les polysaccharides modulent ainsi la production de prostaglandines et de cytokines inflammatoires. Ces effets ont été confirmés dans plusieurs modèles expérimentaux, où les SIP réduisent l'inflammation en bloquant la voie de signalisation $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et en diminuant l'expression de médiateurs pro-inflammatoires tels que $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ et IL-6 (Wang et al., 2019 ; Li et al., 2020).

I.3.3.2.4. Activité anti-tumorale

Des analyses en laboratoire ont révélé que les substances tirées de l'encre de seiche provoquent la mort cellulaire programmée dans divers types de cellules cancéreuses, y compris le cancer du foie et le cancer du sein, en activant le processus impliquant les mitochondries (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2021).

I.3.3.2.5. Activité antimicrobienne

La mélanine et certains peptides bioactifs présents dans l'encre de seiche ont démontré une activité antimicrobienne notable, ciblant à la fois des bactéries Gram positives et Gram négatives, ainsi que certains champignons pathogènes (Derby, 2014 ; Niu et al., 2019).

I.3.3.3. Applications biomédicales

La mélanine retirée de l'encre de seiche a révélé une capacité neuroprotectrice, surtout en diminuant les dommages causés par le stress et la mort des cellules nerveuses dans des études sur la maladie de Parkinson (Cortés et al., 2019). Les sucres complexes de l'encre de seiche (SIP) montrent aussi des effets positifs sur le corps: ils aident à mieux gérer le sucre et à améliorer la réaction à l'insuline, ce qui laisse penser qu'ils peuvent lutter contre le diabète (Hu et al., 2022).

I.3.3.4. Applications agroalimentaires et cosmétiques

Les polysaccharides de l'encre de seiche (SIP) sont très convoités dans le secteur agroalimentaire pour leurs effets antioxydants et antimicrobiens, qui les font utiliser comme agents de conservation naturels afin de prolonger la durée de vie des aliments sans faire appel à des additifs chimiques (Li et al., 2021). De plus, la mélanine issue de l'encre de seiche est aujourd'hui redéployée comme solution de rechange aux colorants synthétiques notamment dans l'industrie alimentaire et textile, du fait de sa biodégradabilité et de son innocuité (Chen

et al., 2020). Enfin, dans le secteur des cosmétiques, la mélanine est recherchée pour ses propriétés photoprotectrices contre les rayons UV, tandis que les SIP, pour leur détenteur antioxydant et hydratant, sont des ingrédients de produits anti-âge et soins cutanés (Hu et al., 2022).

I.3.4. Les viscères

I.3.4.1. Composition biochimique

Les viscères de la seiche (fig. 8), contenant le foie digestif, l'intestin et les glandes annexes, représentent environ 20–30 % de la masse totale de la seiche. Il s'agit d'une source de biomolécules diversifiée (enzymes digestives telles que des protéases, lipases et amylases) (Ben Mustapha et al., 2018). Ces viscères sont également une source lipidique marine riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) dont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), deux précurseurs des phospholipides membranaires jouant un rôle majeur dans la prévention des maladies cardiovasculaires et inflammatoires (Tocher, 2015). En parallèle, ils reposent sur des assises protéiques composée de protéines et peptides bioactifs à activité antioxydante et antimicrobienne (Nasri et al., 2013). En outre, les viscères constituent un réservoir de micronutriments dont des vitamines liposolubles (A, D, E) et des minéraux essentiels comme le zinc, le cuivre et le fer (Alonso & Martín, 2020).

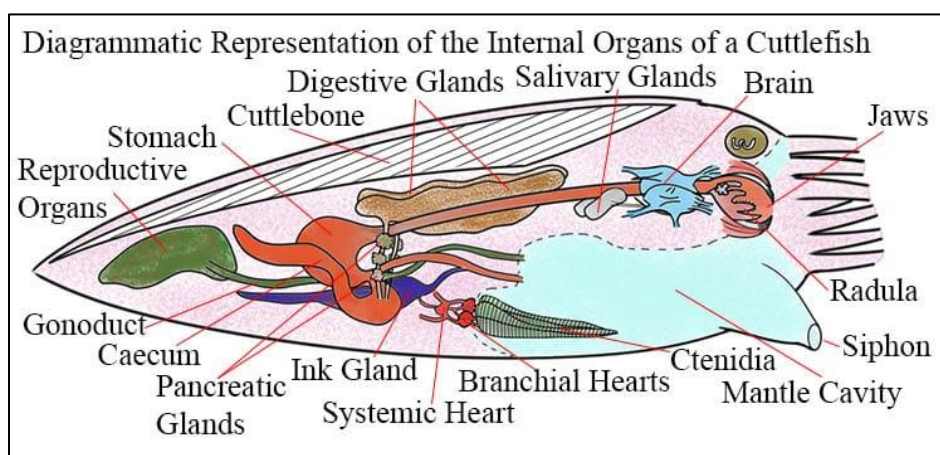


Figure 8: viscères (Ramel, 2021).

I.3.4. 2. Propriétés biologiques

Les restes des seiches donnent à la fois de multiples possibilités de la mise en valeur industrielle. Ainsi, dans l'industrie agroalimentaire, les huiles extraites du foie sont mises sur

le marché comme compléments nutritionnels riches en oméga-3, facteurs de la santé cardiovasculaire et cérébrale (Calder, 2015). Par ailleurs, dans l'industrie pharmaceutique, les peptides bioactifs dérivés des hydrolysats protéiques sont incorporés dans les formulations antioxydantes et antihypertensives, avec un point d'attention accru vers les nutraceutiques (Bougatef et al., 2007).

Dans le secteur cosmétique, les enzymes digestives ainsi que les lipides marins sont présents dans les crèmes et les lotions anti-âge et hydratantes, qui tirent avantage de leurs propriétés antioxydantes et émollientes (Hu et al., 2022). En fait, dans le domaine des biotechnologies, les enzymes obtenues à partir des viscères sont des biocatalyseurs écologiques pour l'industrie alimentaire et la fabrication de détergents biologiques, car elles sont thermo-stables et actives dans une large gamme de pH (Ben Rebah et al., 2008).

I.4. Stratégies de valorisation des coproduits de la seiche

L'exploitation des coproduits de la seiche repose sur des stratégies de transformation et d'extraction adaptées à la nature des constituants : minéraux (os de seiche), protéiques (peptides et enzymes), pigmentaires (mélanine, caroténoïdes) et lipidiques (huiles de foie). Ces approches peuvent être regroupées en trois grandes catégories : biochimiques, utilisant des hydrolyses enzymatiques pour libérer peptides et polysaccharides bioactifs (Bougatef et al., 2007) ; biotechnologiques, impliquant la fermentation, l'extraction verte et l'encapsulation des composés bioactifs (Li et al., 2021 ; Patra et al., 2018) ; et industrielles/environnementales, incluant la transformation des résidus en biochar, engrais ou matériaux absorbants pour la dépollution (Benhabiles et al., 2021). Ces stratégies s'inscrivent dans une logique de bioéconomie circulaire, visant à convertir les déchets marins en ressources à haute valeur ajoutée, tout en réduisant l'impact environnemental et les coûts de traitement (Zou et al., 2022 (fig. 9)).

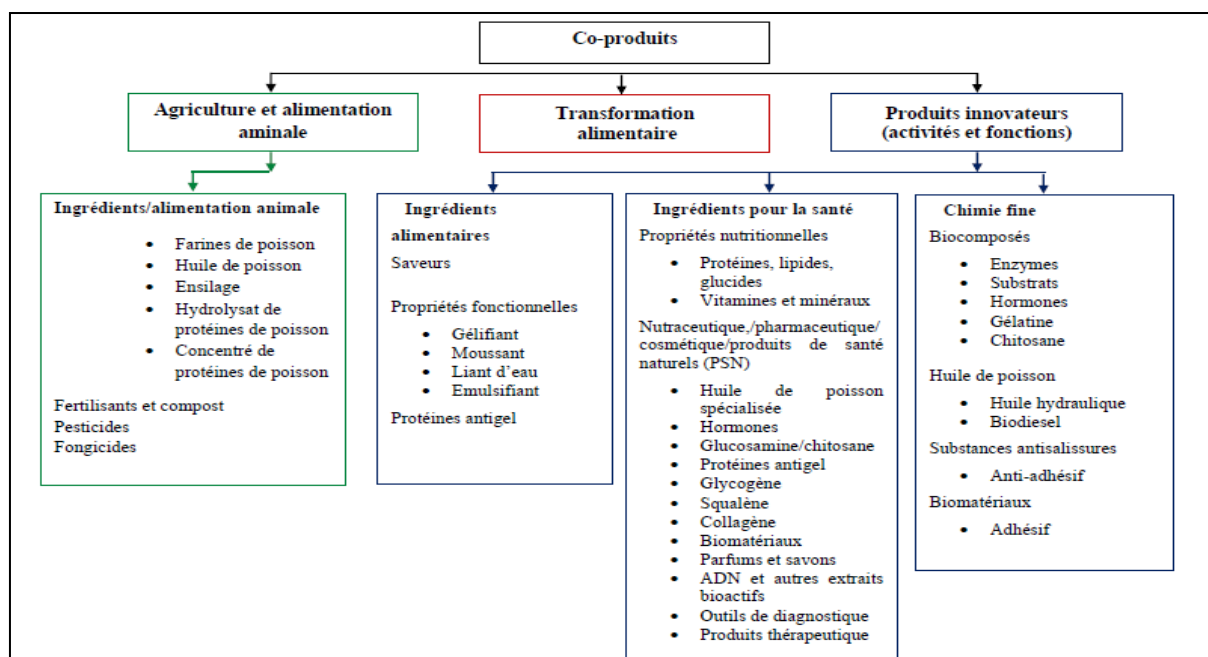


Figure 9: différentes voies de valorisation des co-produits marins(Emna, 2011).

I.4.1. Approches biochimiques

I.4.1.1. Extraction de la chitine et chitosane

L'os de seiche est une source exceptionnelle de la chitine, constituant majoritaire de l'os et peut être extraite par des stades chimiques successifs : une étape de déprotéinisation à l'aide de NaOH puis une étape de déminéralisation avec HCl (Rinaudo, 2006). La chitine isolée pourra dans un second temps être convertie en chitosane par une étape de désacétylation alcaline. Le chitosane est un polymère aux nombreuses propriétés, notamment antibactérien, cicatrisant, filmogène et biodégradable, qui est utilisé dans les domaines de l'agroalimentaire, du cosmétique et de la biomédecine (Kong et al., 2010). Il existe plusieurs formes polymorphiques de chitosane, dont les principales sont l' α -chitosane, le β -chitosane (tableau 1) et, plus rarement, le γ -chitosane (Ravi Kumar, 2000). Parmi elles, le β -chitosane qui est trouvé précisément dans l'os de sepie.

I.4.1.1.1. Le β -Chitosane

Le β -chitosane (fig. 10) est un type de sucre complexe en forme de ligne, fait de parties qui se répètent, appelées D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, attachées ensemble par des liaisons β -(1 $\rightarrow$ 4). Contrairement à l' α -chitosane, où les chaînes sont alignées côte à côte, le β -chitosane a une structure où les chaînes sont opposées. Cette façon spéciale d'être organisé

rend sa structure moins rigide, ce qui le rend plus facile à dissoudre et plus souple (Kurita, 2020; Younes & Rinaudo, 2015).

Le chitosane est fabriqué à partir d'une substance appelée chitine en utilisant des produits chimiques ou des enzymes pour enlever certaines parties, ce qui transforme les unités de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) en D-glucosamine (GlcN). Ce changement donne au polymère une charge positive, ce qui explique pourquoi il est utilisé dans de nombreux domaines liés à la médecine et à la biotechnologie (Kurita, 2020; Pillai et al., 2009). le β -chitosane est de plus en plus étudié en raison de sa structure spéciale, de sa plus grande capacité à se dissoudre et de sa souplesse accrue par rapport à l' α -chitosane (Aranaz et al., 2021; Qin, 2018).

Le β -chitosane est également très bien accepté par le corps et se décompose naturellement. Sa capacité à interagir avec les parois des cellules, à lutter contre les éléments nocifs et à aider à la guérison des tissus en fait un matériau biologique prometteur pour aider le corps à se réparer et pour libérer des médicaments de manière contrôlée (Jayakumar et al., 2020; Rinaudo, 2021).

Ainsi, l'étude des qualités du β -chitosane s'inscrit dans une démarche visant à mieux utiliser les sous-produits de la mer et à créer des matériaux biologiques novateurs et durables.



Figure 10 : le β chitosane de la seiche (Chaowana et al., 2024).

I.4.1.1.2. Propriétés biologiques du β -chitosane

a) Biocompatibilité et biodégradabilité

Le β -chitosane est reconnu pour sa biocompatibilité élevée, ce qui en fait un biomatériau sûr pour des applications médicales et pharmaceutiques (Jayakumar et al., 2020; Rinaudo, 2021). De plus, sa biodégradabilité est assurée par l'action d'enzymes comme la lysozyme, libérant des produits non toxiques (Kurita, 2020; Younes & Rinaudo, 2015).

b) Activité antimicrobienne

Le β -chitosane possède une activité antimicrobienne contre un large spectre de micro-organismes. Son effet résulte des interactions électrostatiques entre ses groupements amines protonés et les membranes bactériennes (Aranaz et al., 2021; Pillai et al., 2009).

c) Propriétés antioxydantes

Il agit comme piègeur de radicaux libres et limite le stress oxydatif (Rinaudo, 2021). Son incorporation dans des composites améliore encore ses capacités antioxydantes (Aranaz et al., 2021).

d) Effets sur la cicatrisation

Le β -chitosane stimule la migration des fibroblastes, la synthèse de collagène et l'angiogenèse, accélérant la régénération cutanée (Younes & Rinaudo, 2015).

I.4.1.1.3. Applications biomédicales et technologiques du chitosane

1. Hydrogels (purs ou composites)

Ils sont utilisés comme pansements pour plaies aiguës et chroniques, brûlures, ainsi que comme supports de greffe cellulaire (Kumar et al., 2020).

2. Films et membranes

Leurs principaux atouts résident dans leur rôle de barrière protectrice, leur stérilisation facile et leur bonne adhérence cutanée, ce qui les rend utiles comme pansements barrières et même dans le domaine agroalimentaire en tant que films comestibles (Elsabee & Abdou, 2013).

3. Nanoparticules et microsphères (systèmes de délivrance)

Ces systèmes permettent l'encapsulation de molécules thérapeutiques (antibiotiques, peptides, vaccins, protéines), offrent une mucoadhésion élevée (Kumar et al., 2020).

Tableau 1: Le β -chitosane comparé à l' α -chitosane (Aranaz et al., 2021).

Propriété / Critère	α -Chitosane	β -Chitosane	Commentaire / Importance
Organisation cristalline	Chaînes parallèles	Chaînes antiparallèles	Influence la solubilité et la réactivité enzymatique
Solubilité	Faible (acides faibles)	Moyenne à élevée (acides faibles)	Plus soluble → plus facile à formuler en hydrogel ou film
Degré de désacétylation (DD)	60–90 %	60–95 %	DD élevé → meilleure solubilité et bioactivité
Viscosité	Élevée	Moyenne	Plus facile à traiter industriellement
Stabilité thermique	Modérée	Supérieure	Résiste mieux aux traitements thermiques
Biodégradabilité	Oui, enzymatique limitée	Oui, enzymatique plus rapide	Favorise applications biomédicales et écologiques
Biocompatibilité	Bonne	Excellente	Non cytotoxique, idéal pour pansements et implants
Activité antimicrobienne	Modérée	Forte	Action sur membranes bactériennes et fongiques
Activité antioxydante	Modérée	Forte	Piège radicaux libres → protection cellulaire
Activité cicatrisante	Bonne	Très bonne	Stimule fibroblastes, collagène, épithélialisation

Activité anti-inflammatoire	Modérée	Fort	Réduction de cytokines pro-inflammatoires
Applications biomédicales	Films, poudres	Films, hydrogels, matrices drug delivery	β -chitosanemieuxadapté aux hydrogels et nanoformulations
Applications cosmétiques	Crèmes, lotions	Crèmes, films protecteurs	Hydratation et barrière cutanée améliorée
Applications agroalimentaires	Films alimentaires	Films et coatings antimicrobiens	Conservation naturelle prolongée
Applications avancées	Limitées	Nanocomposites, capteurs, piézoélectrique	Potentiel en robotique douce et électronique durable
Techniques de caractérisation	FTIR, XRD, TGA	FTIR, XRD, TGA, SEM/TEM	Permet d'identifier structure, morphologie et DD

I.4.1.1.4. β -chitosane et la cicatrisation

Le processus de cicatrisation cutanée évolue généralement de manière favorable en présence de chitosane, avec la formation d'un tissu de granulation fonctionnel et une angiogenèse souvent accélérée. Plusieurs études ont montré que le chitosane stimule la prolifération locale des cellules immunitaires (Suh & Matthew, 2000).

Selon Okamoto et al., (1995), à travers des expérimentations réalisées chez le chien, le chitosane intervient activement dans l'ensemble des étapes du processus cicatriciel. Son premier rôle consiste à favoriser l'hémostase, ce qui justifie son utilisation dans certains pansements hémostatiques commerciaux. Par la suite, le chitosane stimule la prolifération des fibroblastes et module la migration des neutrophiles et des macrophages, influençant positivement la fibroplasie et la réépithélialisation (Okamoto et al., 1995; Kosaka et al., 1996).

Des observations complémentaires effectuées par Ueno et al., (1999) sur des plaies chirurgicales chez le chien ont confirmé ces effets bénéfiques. En effet, le chitosane favorise précocement — dès le troisième jour post-lésion — l'infiltration des macrophages et des

polynucléaires neutrophiles. Ces cellules sécrètent divers médiateurs pro-inflammatoires et facteurs de croissance qui stimulent la formation du tissu de granulation, observée entre le neuvième et le quinzième jour. Par ailleurs, Ueno et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation significative du collagène de type III dans les tissus cicatrisés traités par chitosane, témoignant d'une meilleure qualité de régénération dermique.

I.4.1.2. Hydrolyse enzymatique des protéines

Les protéines extraites de la peau et des viscères de seiche peuvent être soumises à une hydrolyse enzymatique à l'aide de protéases spécifiques, générant des peptides bioactifs (Bougatef et al., 2007). Ces peptides présentent diverses propriétés biologiques, telles que des activités antioxydantes, antihypertensives et antimicrobiennes, et sont exploités dans des domaines variés : nutraceutiques, suppléments alimentaires et formulations pharmaceutiques (Li et al., 2021). L'hydrolyse enzymatique offre l'avantage de préserver l'intégrité et l'activité biologique des peptides, contrairement aux méthodes chimiques plus agressives qui peuvent dénaturer les molécules (Cian et al., 2012). La gélatine est un exemple de ces protéines extraites à partir de la peau.

I.4.1.2.1. La gélatine

I.4.1.2.1.1. Structure et caractéristiques biochimiques de la gélatine

La gélatine (fig. 11) est une protéine naturelle dérivée du collagène par hydrolyse partielle de ses liaisons peptidiques (Johnston-Banks, 1990).



Figure 11 : la gélatine (Zilhadia et al., 2022).

Elle est principalement constituée des acides aminés glycine ($\approx 33\%$), proline et hydroxyproline, responsables de sa stabilité structurale et de ses propriétés mécaniques (Zhou *et al.*, 2006).

Cette composition particulière confère à la gélatine une forte affinité pour l'eau et la capacité de former des réseaux tridimensionnels gélifiés à basse température (Bigi *et al.*, 2002).

I.4.1.2.1.2. Caractéristiques de la gélatine marine

- une structure légère et une teneur élevée en acides aminés hydrophiles tels que la glycine, la proline et l'hydroxyproline (Zhang *et al.*, 2011) ;
- un point de gélification plus bas que celui des gélatines bovines, en raison de la proportion accrue d'acides aminés à chaînes courtes (Karim & Bhat, 2009) ;
- une bonne solubilité dans l'eau froide (Gómez-Guillén *et al.*, 2011) ;
- une excellente biocompatibilité et biodégradabilité, favorisant son utilisation en ingénierie tissulaire (Wang *et al.*, 2013) ;
- et l'absence de risque de transmission de maladies animales telles que l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), ce qui renforce son intérêt comme alternative sûre aux gélatines d'origine terrestre (Gudmundsson & Hafsteinsson, 1997).

Ces propriétés font de la gélatine marine, notamment celle extraite de la peau de *Sepia officinalis*, un matériau de choix pour les applications pharmaceutiques et biomédicales, telles que la formulation d'hydrogels cicatrisants ou de systèmes de libération contrôlée de principes actifs (Rao & Jyothi, 2018 ; Benjakul *et al.*, 2012).

I.4.1.2.1.3. La gélatine et la cicatrisation des plaies

La gélatine, issue de la dénaturation partielle du collagène, conserve la majorité des séquences bioactives présentes dans la protéine native (Young *et al.*, 2005)

Ces parties aident les cellules qui réparent les tissus, comme les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales, à coller, à se déplacer et à se multiplier (Van den Bulcke *et al.*, 2000).

Parce qu'elle est bien acceptée par le corps, qu'elle se décompose naturellement et qu'elle peut retenir l'eau, la gélatine crée un environnement humide qui aide les cellules à se déplacer et à former de nouveaux tissus (Balakrishnan et al., 2005).

Cette matière naturelle sert de soutien temporaire pour aider le tissu conjonctif à se réparer et pour créer de nouveaux vaisseaux sanguins (Murphy et al., 2010).

De plus, on peut ajouter à la gélatine des éléments actifs (antioxydants, antimicrobiens ou facteurs de croissance), ce qui permet d'avoir un effet curatif combiné (Sridhar et al., 2015).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de pansements ou de gels à base de gélatine aide les plaies à se refermer plus vite, encourage la production de collagène et diminue la formation de cicatrices (Choi et al., 2016 ; Vijayavenkataraman et al., 2018).

I.4.1.3. Fractionnement de l'encre

L'encre de seiche est actuellement extraite et fractionnée afin de séparer ses deux principaux composants : la mélanine de sépia et des polysaccharides sulfatés (SIP).

Cette importance s'explique par leur abondance et les nombreuses applications des gels mélaniniques et des hydrates de carbone artificiels ou naturels. Pour n'en citer que quelques-unes : les mélanines nanoparticulaires issues de sépia pourraient être utilisées comme agents colorants ou antioxydants dans les industries cosmétiques et agroalimentaires, tandis que les polysaccharides de l'encre de seiche pourraient servir de précurseurs d'agents thérapeutiques inflammatoires capables de réduire le stress oxydatif ou l'inflammation observée dans tous les modèles expérimentaux utilisés (Wilcox et al., 2020).

I.4.1.3.1. Les polysaccharides d'encre de seiche (SIP) et le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)

Ces polysaccharides exercent une action systémique sur le métabolisme et le système endocrinien, et ils ont un potentiel dans la prévention et l'atténuation du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

Sur le plan épidémiologique, le SOPK affecte entre 8 et 13 % des femmes en âge de reproduction, selon les critères diagnostiques utilisés (Azziz et al., 2016). Il représente la première cause d'infertilité anovulatoire et un facteur de risque majeur de troubles métaboliques tels que le diabète de type 2, l'obésité, la dyslipidémie et le syndrome métabolique (Dumesic et al., 2015). La prévalence varie en fonction des populations et des méthodes de diagnostic, notamment les critères de Rotterdam (ESHRE/ASRM, 2004), qui restent les plus utilisés à ce jour.

Sur le plan physiopathologique, le SOPK est un trouble multifactoriel impliquant une interaction complexe entre des facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux (Escobar-Morreale, 2018). L'hyperandrogénie, souvent d'origine ovarienne ou surrénalienne, est un élément central du syndrome. Elle résulte d'une augmentation de la sécrétion de testostérone et d'androstènedione, stimulée par une hyperactivité des cellules de la thèque ovarienne sous l'effet d'une sécrétion accrue de l'hormone lutéinisante (LH) (Goodarzi et al., 2011). Parallèlement, une diminution relative de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) perturbe la croissance et la maturation folliculaire, entraînant une anovulation chronique et l'accumulation de petits follicules immatures, visibles à l'échographie sous forme d'aspect « polykystique ».

Le rôle de la résistance à l'insuline et de l'hyperinsulinémie est également majeur. L'insuline potentialise la production ovarienne d'androgènes et diminue la synthèse hépatique de la SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin), augmentant ainsi la fraction libre des hormones androgènes (DeUgarte et al., 2005). Ces désordres métaboliques expliquent en partie les manifestations cliniques du syndrome, qui associent hirsutisme, acné, alopecie, irrégularités menstruelles et infertilité (Lizneva et al., 2016).

Au-delà de ses répercussions reproductives, le SOPK représente un problème majeur de santé publique en raison de son association avec des troubles métaboliques chroniques. De nombreuses études ont montré que les femmes atteintes présentent un risque accru de diabète de type 2, d'hypertension, de dyslipidémie et d'athérosclérose précoce (Wild et al., 2010). Ces comorbidités augmentent la morbidité cardiovasculaire et justifient une prise en charge multidisciplinaire du syndrome.

Sur le plan psychologique, le SOPK s'accompagne souvent d'une altération de la qualité de vie, avec des troubles anxiodépressifs, une diminution de l'estime de soi et des difficultés

Chapitre I : valorisation des coproduits de la seiche (Sepia officinalis)

sociales liées aux symptômes physiques comme l'hirsutisme ou la prise de poids (Dokras, 2016). Ainsi, le SOPK n'est pas seulement une pathologie endocrinienne, mais un syndrome complexe affectant à la fois la santé reproductive, métabolique et mentale de la femme.

L'importance de l'étude du SOPK réside dans la nécessité de comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents afin d'améliorer les stratégies diagnostiques et thérapeutiques. Les modèles animaux, notamment chez le rat, ont permis d'élucider plusieurs aspects du déséquilibre hormonal et métabolique observé chez la femme (Abbott et al., 2019).

Ces modèles expérimentaux constituent un outil essentiel pour explorer de nouvelles approches thérapeutiques naturelles, telles que les composés bioactifs issus des ressources marines, qui offrent une alternative prometteuse aux traitements classiques (Abbott et al., 2019).

Ainsi, le SOPK représente un véritable défi scientifique et médical, à la croisée de l'endocrinologie, de la reproduction et du métabolisme. Sa compréhension approfondie est indispensable pour le développement de thérapies ciblées, efficaces et mieux tolérées, capables d'améliorer la santé et la qualité de vie des femmes atteintes (Lizneva et al., 2016).

I.4.2. Approches biotechnologiques

I.4.2.1. Fermentation microbienne

Les coproduits marins, tels que les viscères et la peau de seiche, peuvent servir de substrats nutritifs pour la fermentation microbienne. Par exemple, les viscères fournissent une source d'azote et de nutriments favorisant la croissance de bactéries productrices d'enzymes industrielles, telles que des protéases et lipases (Roy et al., 2012). Cette approche permet la conversion de déchets organiques en biomolécules à haute valeur ajoutée à faible coût, tout en contribuant à la valorisation durable des ressources marines (Patra et al., 2018).

I.4.2.2. Production de biopolymères

Certaines bactéries marines sont capables de fermenter les hydrolysats issus des coproduits de seiche en polysaccharides extracellulaires ou en polyhydroxyalcanoates (PHA), des plastiques biodégradables (Kumar et al., 2020). Cela représente une solution alternative aux plastiques

issus du pétrole, contribuant à la réduction de l'impact environnemental et à la valorisation des déchets marins (Chen et al., 2018).

I.4.2.3. Génie enzymatique

Les enzymes contenues dans les viscères de seiche, à l'image des protéases et des amylases, sont source d'idées pour la conception de catalyseur-biocombinaison pour des réactions hautement spécifiques (Roy et al., 2012). Ainsi, pour la bouche, il peut s'agir d'hydrolyser des protéines alimentaires, de réaliser la synthèse de peptides bioactifs ou encore d'activer des lipides en vue de la formation de bicarburants (Patra et al., 2018). Dans tous les cas, le recours à ces enzymes offre la possibilité de rendre plus 'green' voire plus éco/finobioniquement acceptable un procédé tout en respectant/ajoutant la vie biologique/supportée du biofonctionnel.

I.4.3. Approches industrielles et environnementales

I.4.3.1. Production de farines animales

Les têtes et les entrailles de seiche, riches en protéines et en lipides, peuvent être transformées en farines destinées à l'alimentation de l'aquaculture et de l'élevage (Tacon et Metian, 2009). L'utilisation de ces coproduits est donc importante, notamment en termes de réduction des déchets. Toutefois, leur valeur ajoutée est relativement faible comparée à d'autres débouchés plus innovants, tels que l'extraction de peptides bioactifs ou de polysaccharides fonctionnels (Nielsen et al., 2016).

I.4.3.2. Dépollution et adsorption

L'os de seiche est un matériau à base de carbonate de calcium à la structure poreuse qui peut être utilisé comme adsorbant naturel pour le traitement des effluents. En effet, il permet la fixation des métaux lourds comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et le mercure (Hg) mais également l'adsorption de colorants textiles et de résidus pharmaceutiques. Ainsi, cet usage constitue une alternative verte et peu coûteuse pour la dépollution des eaux usées et une représentation de la gestion durable des déchets de la mer (Benhabiles et al., 2021).

I.4.3.3. Matériaux innovants

Les coproduits de seiche peuvent être valorisés pour la fabrication de matériaux innovants. Le cuttlebone broyé est utilisé comme support pour la croissance osseuse en chirurgie régénérative (Xu et al.,2024).

Des films biodégradables à base de chitosane, extrait de l'os et de la peau de seiche, peuvent trouver des applications dans la réalisation d'emballages alimentaires écologiques (Liu et al.,2020). De plus, l'utilisation de poudre de seiche comme charge dans des composites polymères a le double avantage d'améliorer leurs propriétés mécaniques et leur résistance aux bactéries, ce qui ouvre à la fois des applications dans le secteur industriel et le secteur biomédical (Alves et al., 2022).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1. l'activité cicatrisante du β chitosane et la gélatine

II.1.1. Matériel animal

Dans cette étude, l'os de la seiche (*Sepia officinalis*) a été collecté à Mostaganem, Algérie, en avril 2021(fig. 12).



Figure 12 : *Sepiaofficinalis*.

II.1.2. Préparation de l'os de seiche (*Sepiaofficinalis*)

L'os de seiche a été lavé plusieurs fois à l'eau déionisée pour éliminer les impuretés et les sels. Ensuite, il a été séché dans un four à 60 °C pendant 48 heures. L'os de seiche séché a été broyé et les particules ont été séparées selon leurs tamis (fig. 13).



Figure 13: L'OS (*sepia officinalis*)

II.1.3. Extraction de la chitine et conversion en chitosane

La β chitine a été extraite de l'os de seiche de *S. officinalis* par déminéralisation, déprotéinisation et décoloration, suivant la méthode décrite par [Takiguchi \(1991\)](#). Pour ce faire, 100 g de poudre d'os de seiche ont été immergés dans 1000 mL de HCl à 10 % (p/p) à température ambiante (25 °C) pendant 24 heures. Après filtration sur papier filtre N°1, le résidu a été lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Ensuite, le résidu a été immergé dans 1000 mL de NaOH à 10 % (p/p) à 60 °C pendant 24 heures pour la déprotéinisation. Les protéines ont été éliminées par filtration. De l'eau distillée a été utilisée pour laver le résidu jusqu'à neutralité. Puis, le résidu d'os de seiche a subi le même processus deux fois. 250 mL d'éthanol à 95 % et d'éthanol absolu ont été utilisés successivement pour éliminer les substances solubles dans l'éthanol de la chitine brute obtenue et pour déshydrater. La β chitine (200 g) a ensuite été séchée dans un four à air à 50 °C pendant toute la nuit. La β chitine ainsi obtenue à partir de l'os de seiche a été convertie en chitosane par le processus de désacétylation selon la méthode de [Sahu et al. \(2009\)](#), utilisant de la soude caustique à 40 % et une technique au micro-ondes.

II.1.4. Préparation du β chitosane

La β chitine (10 g) a été mise dans un mortier en céramique et mélangée avec 100 mL de NaOH à 50 % à 100 °C pendant 120 minutes pour préparer du β chitosane brut (p/v).

Le mortier en céramique a été placé au centre du plateau tournant du four à micro-ondes et irradié pendant 15 minutes à 1000 W. Les mélanges ont été filtrés et les résidus ont été lavés à l'eau distillée jusqu'à neutralisation, puis séchés dans un four à air chaud à 40 °C jusqu'à poids constant et stockés jusqu'à analyse ultérieure. Le β chitosane brut (5 g) a été obtenu en séchant dans un four à air à 50 °C pendant toute la nuit [Takiguchi \(1991\)](#) (fig. 14).

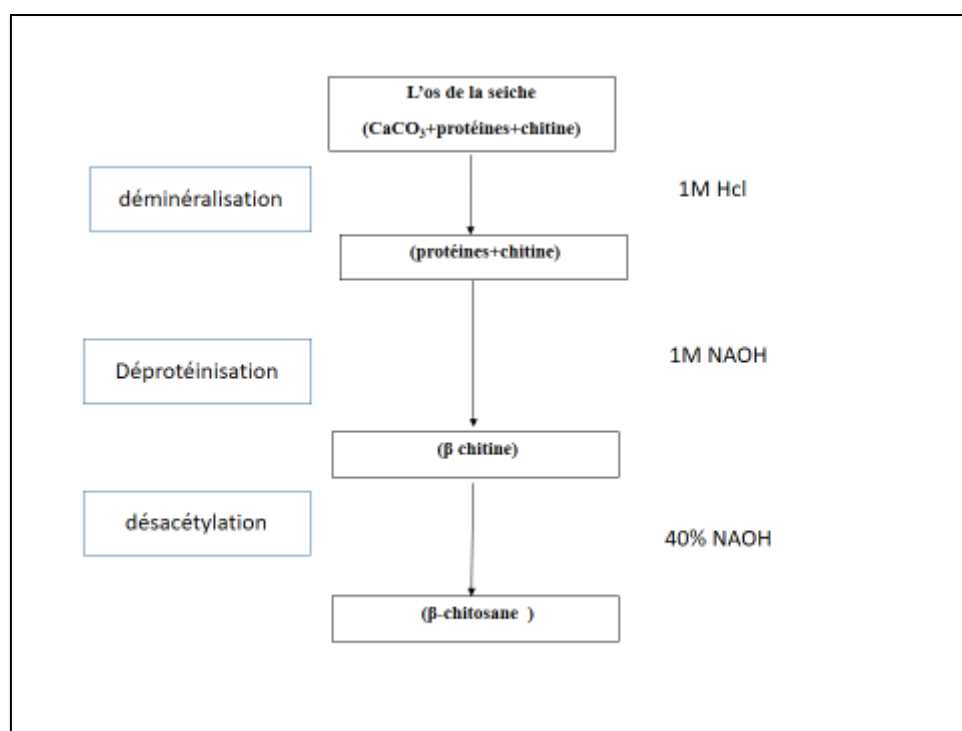


Figure 14: protocole d'extraction du β chitosane.

II.1.5. Le spectre FTIR et le degré de désacétylation du β-chitosane

L'analyse FTIR du β-chitosane préparé a permis d'identifier les bandes caractéristiques du polysaccharide et d'estimer son degré de désacétylation (DD).

II.1.6. Extraction de gélatine à partir de la peau de seiche

La gélatine a été extraite de la peau de seiche (fig. 15) selon la méthode de Hoque et al. (2010). La peau a été immergée dans une solution de NaOH à 0.05 M avec un rapport peau/solution de 1:10 (p/v), en remuant doucement à température ambiante. La solution a été changée toutes les heures pour éliminer les protéines non collagènes pendant un total de 6 heures. La peau traitée à l'alcalin a ensuite été lavée à l'eau distillée jusqu'à obtenir un pH neutre de l'eau de lavage. La peau préparée a été soumise à un blanchiment dans une solution de 5 % de H₂O₂, en utilisant un rapport échantillon/solution de 1:10 (p/v) pendant 48 heures à 4 °C. La peau traitée avec le H₂O₂ a été lavée trois fois avec 10 volumes d'eau. La gélatine a été extraite de la peau blanchie en utilisant de l'eau distillée à 60 °C pendant 12 heures, avec un rapport échantillon/eau de 1:2 (p/v). Pendant l'extraction, le mélange a été remué en continu. L'extrait a été centrifugé à 8000 g pendant 30 minutes à température ambiante à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée pour éliminer les matériaux insolubles. Le surnageant a été

recueilli et congelé. La matière sèche a été appelée « poudre de gélatine » et a été soumise à hydrolyse.



Figure15: la peau de la *Sepiaofficinalis*.

II.1.7. Préparation des hydrogels

II.1.7.1. Préparation de l'hydrogel de β chitosane

J'ai Dissous 1 g de β -chitosane dans 7 mL d'acide acétique préparé à 1 % (v/v) puis ajouter 0.5 mL de glutaraldéhyde (GA, 25 % p/p) pour stériliser le gel et maintenir sa structure. La solution a été agitée mécaniquement pendant 24 heures. Des particules minuscules sont restées après une agitation suffisante, donc la solution a été filtrée avant utilisation (fig. 16).

II.1.7.2. Préparation de l'hydrogel de gélatine

J'ai ajouté de la gélatine dans de l'acétone dans une proportion égale (1/1) pour précipiter le gel, puis ajouter du glutaraldéhyde (GA, 25 % p/p) pour maintenir la structure des protéines (fig. 16).

II.1.7.3. Préparation de l'hydrogel de β -chitosane et de la gélatine

J'ai mélangé (1/1) l'hydrogel de β chitosane et la gélatine et agiter pendant 12 heures à 37 °C. Tous les hydrogels ont été versés dans des plaques de culture cellulaire en polystyrène (Falco), préalablement congelées à -20 °C pendant 12 heures, puis lyophilisées à -81 °C, 5 mTorr pendant 36 heures (fig. 16).

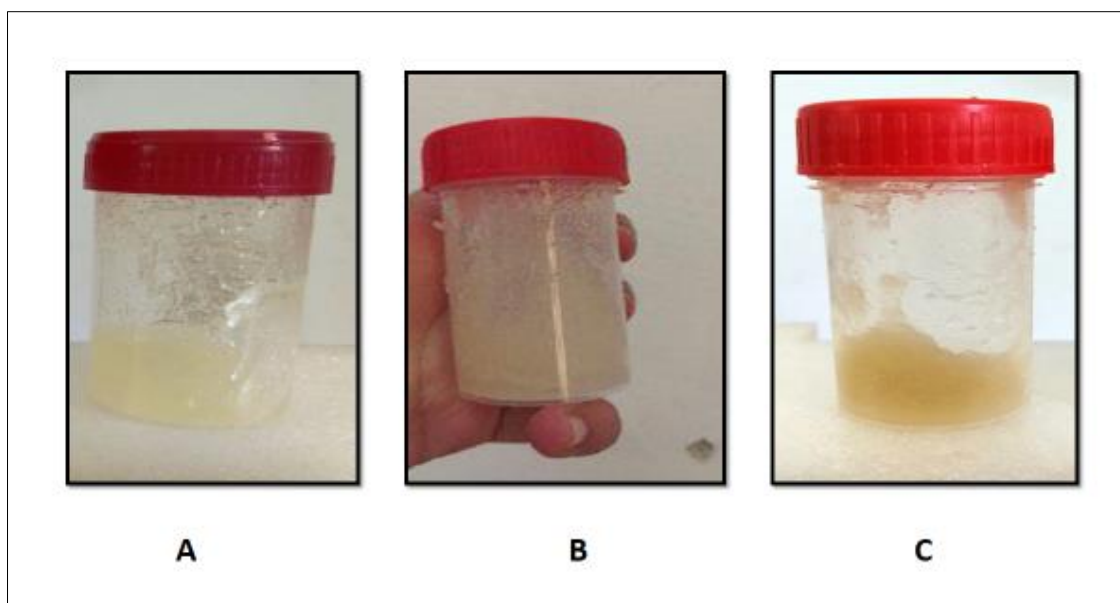


Figure16: preparation des hydrogels (A: β chitosane;B: β chitosane+ gelatine;C: gelatine)

II.1.7. Etude *in vivo*

II.1.7.1. Test d'irritation cutanée

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel irritant des différents onguents testés, en suivant les directives de l'OCDE n° 404 (OCDE, 2015). Pour cela, une application unique de 0.5 g de chaque onguent est réalisée sur le dos des rats. L'état de la peau des animaux est ensuite examiné afin de repérer d'éventuels signes d'inflammation, tels que l'érythème et l'œdème. L'évaluation des réactions cutanées est effectuée après 60 minutes, puis à 24, 48 et 72 heures suivant l'application (OCDE, 2015).

II.1.7.2. Modèle animal

Vingt-cinq rats Wistar mâles (170-185 g), obtenus de l'Institut Pasteur d'Alger, ont été sélectionnés pour l'expérience. Les animaux ont été maintenus dans des cages en acier à température ambiante dans un cycle de lumière/obscurité de 12 heures. Les cages ont été nettoyées deux fois par semaine et les rats avaient un accès libre à l'eau et à une alimentation standard *ad libitum*.

II.1.7.3. Alimentation

La nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*. La nourriture est constituée de granulés d'origine commerciale (SARL OUAHFOUN) associés à des coupeaux de pain sec. L'eau est

placée dans un biberon (buvette) muni d'un tube abreuvoir de longueur convenable.

II.1.7.4. Protocole d'expérimentation

Le dos de chaque rat a été rasé sous anesthésie (50 mg/kg de poids corporel de kétamine) (fig.17) et désinfecté à l'alcool. Ensuite, une zone de plaie uniforme de 2 cm de diamètre a été excisée à l'aide d'un emporte-pièce rond, comme décrit par [Martin et al., 2016](#)



Figure 17: rat rasé

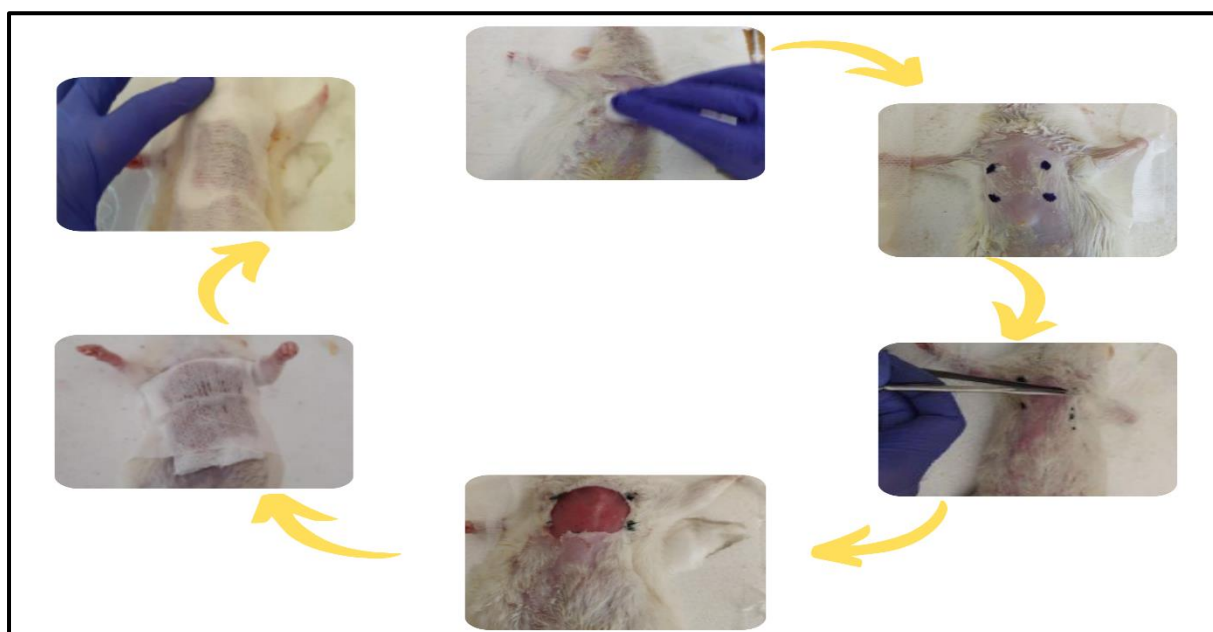


Figure 18: création des plaies

II.1.7.5. Regroupement des animaux

Les animaux ont été divisés en cinq groupes de 5 animaux chacun : le Groupe 1 a reçu une application topique d'hydrogel de β -chitosane ; le Groupe 2 a reçu une application topique d'hydrogel de gélatine ; le Groupe 3 a reçu une application topique d'hydrogel de β -chitosane-

gélatine ; le Groupe 4 n'a pas été traité (contrôle négatif) ; le Groupe 5 a été traité par voie topique avec cicatryl-bio (contrôle positif) (fig. 19).

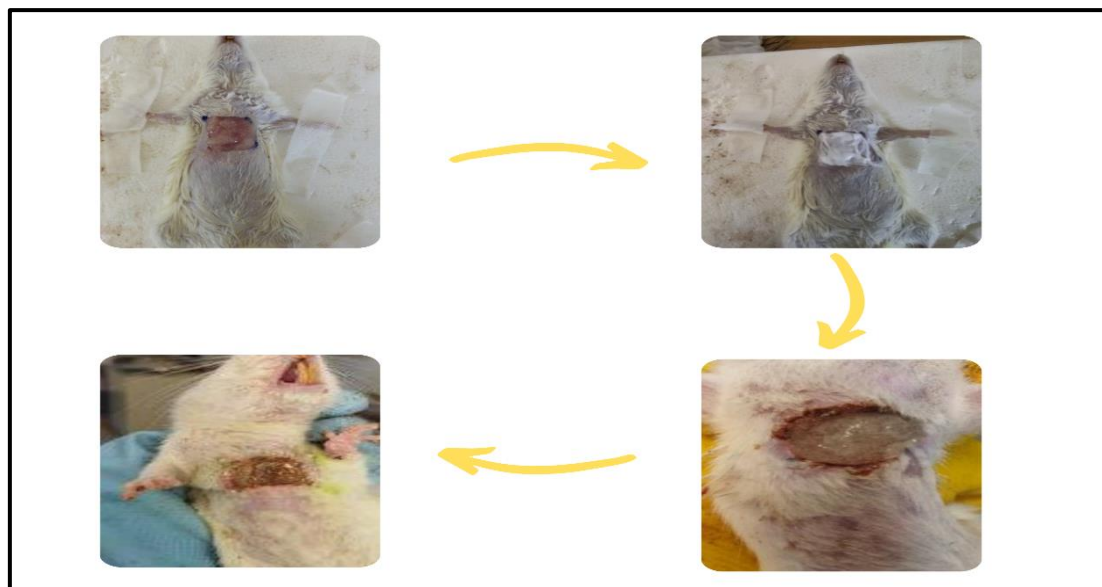


Figure19: traitement des rats

II.1.7.5. Évaluation de l'activité de cicatrisation des plaies

L'activité de cicatrisation des plaies a été évaluée en mesurant tous les 3 jours l'évolution de chaque plaie excisée chez les animaux traités et non traités.

Cinq paramètres sont retenus pour évaluer le déroulement du processus de cicatrisation :

- La surface de la plaie.
- La profondeur de la plaie.
- L'apparition ou non d'un œdème.
- L'apparition ou non d'un bourgeon
- L'épaisseur de la croûte et son renouvellement.

Nous avons suivi une échelle de cotation de [Pourrat et al. \(1993\)](#), afin de suivre l'évolution du processus de cicatrisation en tenant compte de quatre paramètres. Chacun de ces paramètres a été évalué avec des valeurs numériques de 0 à 4 ([tableau 2](#)).

Tableau 2 : Echelle de cotation (Pourrat et al., 1993)

Echelle de cotation POURRAT etal. (1993)	Profondeur	Bourgeon	Œdème	Epaisseur e la croute
0	Profondeur Nulle	Absencede Bourgeon	Pas d'œdème	Pasdecroute
1	Légèrement creusé	Petitbourgeon	Trèsléger œdème	Débutde croute
2	Peuprofond	Gros bourgeon Central	Œdème visible	Crouteenvoie d'épaississement
3	Assez Profond	Bourgeonnemen t massif	Œdème moyen	Croute épaisse
4	Très profond	Excèsde bourgeonnement	Œdème grave	Croutetrèsepaisse, granuleuseet bombée

II.1.7.6. Évaluation de la cicatrisation des plaies

Le pourcentage de contraction de la plaie a été évalué quotidiennement, tandis que l'histopathologie des tissus granuleux a été réalisée à la fin de la période expérimentale.

II.1.7.7. Pourcentage de contraction de la plaie

Pour calculer le pourcentage de contraction de la plaie, la surface de la plaie a été mesurée.

$$\% \text{ of wound closure} = \frac{\text{Wound area on day 0} - \text{wound area on day n}}{\text{Wound area on day 0}} \times 100$$

n: number of days (4th and 8th)

II.1.7.8. Étude histologique

À la fin de l'expérimentation, tous les rats ont été anesthésiés avec 150 mg/kg de poids corporel de kétamine. Les échantillons de tissu de la plaie ont été fixés pendant plus de 6

heures dans une solution de formaldéhyde à 10 %, déshydratés à l'acétone, clarifiés à l'xylène et intégrés dans de la paraffine. Une coupe de 5 μm a été colorée avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Les changements histopathologiques ont été analysés à l'aide d'un microscope optique.



Figure 20: tissu de la plaie

II.1.7.7. Examen histologique de la cicatrisation

L'examen histologique a été réalisé sur des sections de peau cicatrisée prélevées. Cette analyse a été conduite dans un laboratoire spécialisé en anatomie pathologique, en suivant les étapes suivantes : fixation au formol, inclusion en paraffine et coloration par hématoxyline-éosine.

- **Fixation** : Cette étape permet de conserver les structures tissulaires et de rigidifier les échantillons. Elle doit être réalisée immédiatement après le prélèvement, en immergeant les tissus dans un grand volume de fixateur (formol). La durée de fixation dépend du volume des prélèvements.
- **Inclusion** : Elle vise à faciliter la réalisation de coupes fines et homogènes. La paraffine, milieu d'inclusion le plus couramment utilisé, étant hydrophobe, une déshydratation préalable est nécessaire. Celle-ci s'effectue par immersion dans des bains d'alcool de concentration croissante, suivis de bains de toluène. Ensuite, les échantillons sont enrobés de paraffine fondue, qui s'infiltre dans les tissus avant durcissement, formant un bloc solide contenant l'échantillon.
- **Coupes** : Les blocs de paraffine sont sectionnés à l'aide d'un microtome, produisant des coupes fines de 2 à 5 μm d'épaisseur. Ces coupes sont déposées sur des lames de verre pour analyse.

- **Coloration** : Cette étape vise à améliorer le contraste des structures tissulaires afin de faciliter leur identification. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent être réhydratées après un déparaffinage préalable (réalisé par la chaleur et des bains de toluène). La réhydratation s'effectue par immersion dans des bains d'alcool de concentration décroissante, puis dans de l'eau distillée. La coloration la plus fréquemment utilisée est l'hématoxyline-éosine (H.E.), où l'hématéine teinte les noyaux cellulaires en violet et l'éosine colore les cytoplasmes en rose.
- **Montage** : Après une dernière déshydratation (bains d'alcool croissants suivis de bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre une lame et une lamelle à l'aide d'une résine synthétique dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. La préparation ainsi obtenue est prête à être observée au microscope optique sous des grossissements de $\times 100$ et $\times 400$.

II.2. l'effet des polysaccharides de l'encre SIP sur la polykystique ovarienne

II.2.1. Matériel biologique

II.2.1.1. Animaux expérimentaux

L'étude a été réalisée sur 32 femelles rats Wistar albinos, âgées de 8 à 10 semaines et pesant entre 180 et 220 g. Ces animaux, choisis pour leur sensibilité hormonale et leur stabilité génétique, ont été obtenus auprès de l'animalerie centrale de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. Ils ont été acclimatés pendant une semaine dans des cages en polypropylène, en groupes de trois par cage, avec enrichissement environnemental pour réduire le stress. Les conditions d'hébergement ont été rigoureusement contrôlées : température de 22 ± 2 °C, humidité relative de 55 ± 10 %, et cycle lumineux de 12 h lumière/12 h obscurité. L'alimentation a été constituée de granulés standard pour rongeurs (à base de céréales, protéines végétales, lipides, minéraux et vitamines), et l'eau potable a été fournie ad libitum.

II.2.2. Induction du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)

Le SOPK a été induit par administration intrapéritonéale (IP) de L-Arginine à la dose de 50 mg/kg/jour pendant 9 jours une fois par jour (fig. 21).

La L-Arginine (Sigma-Aldrich, pureté ≥ 98 %) a été fraîchement préparée chaque jour dans une solution saline stérile (NaCl 0,9 %) et administrée entre 9h00 et 10h00 du matin pour éviter

les variations circadiennes. Ce protocole est basé sur des travaux antérieurs démontrant son efficacité à induire une hyperandrogénie, une perturbation du cycle œstral, ainsi qu'une apparition de follicules kystiques ovariens.

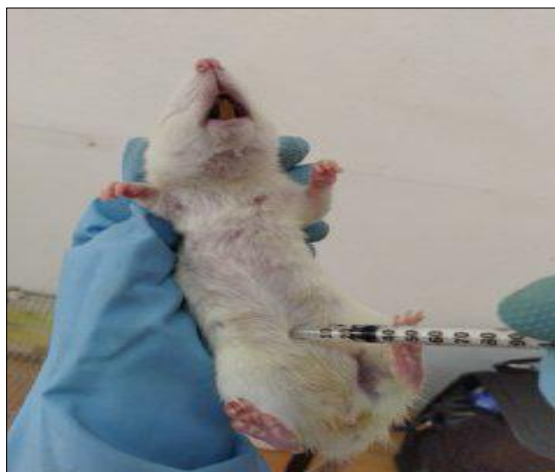


Figure 21: Injection (IP) de L-Arginine

II.2.3. Préparation et caractérisation des polysaccharides de l'encre de *Sepia officinalis*

l'encre stockée à -70 °C a été décongelée à 4 °C, puis a été diluée dans une solution tamponnée au phosphate (PBS). Encre suspension a été lentement agitée pendant 8 h à 4 °C, puis centrifugée (10 000 g) à 4 °C. Le surnageant a été soumis à une hydrolyse avec de l'alcalase pendant 90 min, et chauffé pendant 1 h au bain-marie bouillant. Après centrifugation, et a ensuite été mélangé avec un 1/4 de volume mélange liquide de chloroforme et de n-butanol (v/v, 4/1) suivi d'une agitation pendant 30 min sur un aimant plaque d'agitation. Après centrifugation à 5000 g pendant 15 min, le surnageant a été redigéré avec de l'alcalase, le processus de digestion a été effectué deux fois. SIP dans le surnageant résultant a été précipité avec quatre volumes d'alcool absolu et a été soumis à lyophilisation sous vide. La poudre solide SIP a été conservée à 4 °C avant l'utilisation (fig. 22).

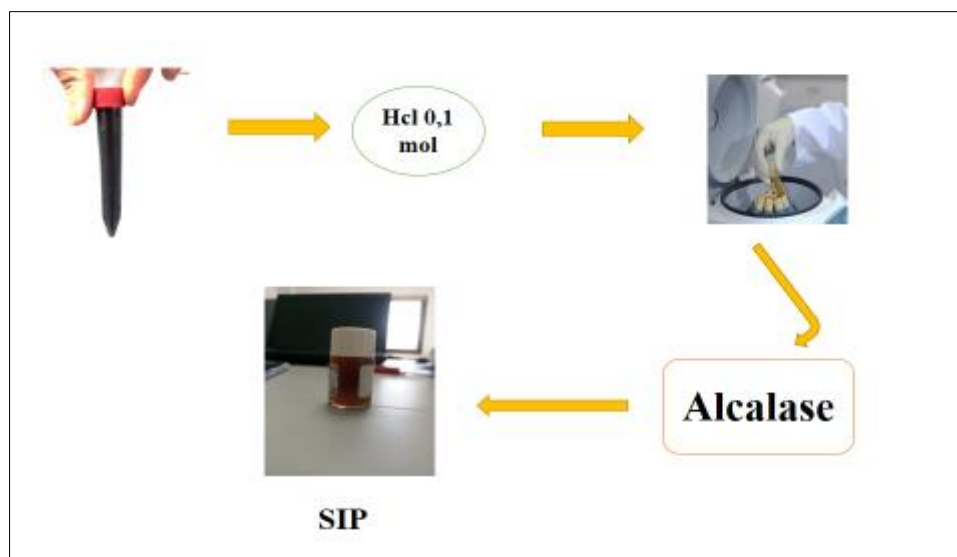


Figure22: Extraction des polysaccharides à partir de l'encre

II.2.4. Répartition des groupes expérimentaux

Les 32 animaux ont été répartis aléatoirement en 4 groupes (n = 8 chacun) :

- **Groupe 1 (Contrôle négatif):** rats normaux, recevant uniquement du sérum physiologique.
- **Groupe 2 (SOPK):** rats recevant la L-Arginine 50 mg/kg.
- **Groupe 3 (SIP 50):** rats SOPK traités par voie orale avec 50 mg/kg/jour de polysaccharides pendant 15 jours.
- **Groupe 4 (SIP 100):** rats SOPK traités avec 100 mg/kg/jour pendant 15 jours.

Les traitements ont débuté après les 9 jours d'induction et ont été administrés quotidiennement par gavage.

II.2.5. Prélèvements biologiques et dosages hormonaux

Après anesthésie des rats par injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg), le sang a été prélevé par ponction cardiaque à l'aide de seringues héparinées. Les échantillons ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 15 minutes pour séparer le plasma, qui a été aliquoté et conservé à -20 °C jusqu'aux dosages.

Les concentrations plasmatiques de LH, FSH, testostérone, progesterone et estradiol ont été déterminées par des kits ELISA spécifiques, validés pour l'espèce murine.

Chaque échantillon a été dosé en double et les lectures ont été faites à l'aide d'un lecteur microplaques (absorbance 450 nm). Des courbes étalons ont permis de quantifier les concentrations en hormones.

II.2.6. Poids des ovaires

II.2.7. Détermination du statut antioxydant

II.2.7.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le taux de malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique, a été déterminé au niveau plasma par la méthode décrite [Yagi et al., \(1997\)](#).

Principe : 20 μ L de plasma sont mélangés à 0.8 mL de H_2SO_4 . Après agitation, 100 μ L de solution d'acide phosphotungstique (10% : P/V) sont ajoutés. Centrifugation de la solution résultante 10 min à 1600 tours/min après avoir été laissée 5 min dans l'obscurité. Le culot est re-suspendu dans 0.4 mL de H_2SO_4 additionnés de 60 μ L d'acide phosphotungstique puis centrifugé de nouveau 10 min à 1600 tours/min avec élimination du surnageant. Le culot résultant est dissous dans 2 mL d'eau distillée et 0.5 mL de réactif TBA (335 mg d'acide thiobarbiturique dans 50 mL d'eau + 50 mL d'acide acétique 99%). Après un traitement acide à chaud (95 °C /60 min), la solution est refroidie puis additionnée à 2,5 mL de butanol. L'absorbance est déterminée sur la phase butanolique fluorescente à 553 nm. La concentration du MDA est déduite à partir d'une courbe linéaire établie avec plusieurs concentrations de tétraméthoxypropane (TMP) standard.

II.2.7. 2. Dosage l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase est déterminée dans l'érythrocyte selon la méthode de [Lück \(1965\)](#), par la mesure du taux de décomposition du H_2O_2 .

Principe : Le dosage s'effectue sur 1 de surnageant d'érythrocytes. 1 mL de H_2O_2 et 1 mL de tampon phosphate (50 mMol/L, pH 7.4) et 2 mL de catalase (3 U/ μ L) sont ajoutés, la solution est ensuite agitée et incubée pendant 5 min. Après addition de 1 mL du réactif sulfate d'oxyde de titane ($TiOSO_4$) (1.7 g dans 500 mL d' H_2SO_4 2N). L'absorbance est lue à 240 nm. Les concentrations en H_2O_2 restant sont déterminées à partir d'une gamme d'étalon de la solution de façon à obtenir dans le milieu réactionnel des concentrations de 0.5 à 2 mM/L.

II.2.7. 3. Dosage de l'activité enzymatique du superoxydedismutase (SOD)

L'activité érythrocytaire de la SOD a été déterminée par la méthode d'Elstner et al. (1983). **Principe :** Le principe repose sur la production de l'ion superoxyde (O_2^-) par l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de $MnCl_2$ et de mercaptoéthanol. Le NADPH, s'oxyde en présence des ions superoxyde dans le milieu. L'inhibition de l'oxydation du NADPH est provoquée une fois la SOD est additionnée au milieu réactionnel. 5 μ L de surnageant, 10 μ L de tampon phosphate et 100 μ L de réactif 1 sont incubés avec 10 μ L de NADPH pendant 15 min à température ambiante. Puis 100 μ L de réactif 2 sont ajoutés. La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min. La gamme d'activité enzymatique est réalisée avec la SOD étalon. Les résultats sont exprimés en U/cg Hb.

II.2.7. 4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité de la glutathion peroxydase a été déterminée selon la méthode de Paglia et Valentine (1967).

Principe : La GPX catalyse l'oxydation du glutathion réduit (GSH) par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en présence de glutathion réductase (GR) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Du GR exogène (c'est-à-dire n'appartenant pas au sujet) est utilisé pour régénérer le glutathion réduit par l'oxydation du NADPH en $NADP^+$:

La quantité du $NADP^+$ formée sera suivie à 405 nm. Ainsi, on peut déterminer la quantité du GSSG formée et par la suite l'activité de la GPX. Les résultats ont été calculés en U/g Hb.

IV.2.8. Étude histologique des ovaires

Les deux ovaires de chaque animal ont été retirés, lavés avec du PBS, puis fixés dans du formol tamponné à 10 % pendant 48 heures. Après déshydratation dans des bains d'éthanol croissant, inclusion en paraffine, des coupes histologiques de 5 μ m ont été effectuées à l'aide d'un microtome rotatif. Les lames ont été colorées par la méthode de l'hématoxyline-éosine standard. L'analyse microscopique a été réalisée à différents grossissements ($\times 100$ et $\times 400$).

Les paramètres évalués incluaient : - Nombre de follicules normaux vs follicules kystiques - Présence ou absence de corps jaunes - Hyperplasie de la thèque interne - Signes de fibrose et d'inflammation

II.2.8.1. Fixation

La fixation a pour objectif d'inhiber toute activité mitotique et enzymatique, afin de prévenir l'autolyse et les altérations structurales des tissus. Elle permet ainsi de conserver les échantillons dans un état morphologique proche de celui observé in vivo. Les prélèvements ont été immédiatement rincés avec une solution de chlorure de sodium à 0.9 %, puis placés dans une solution de formol diluée au dixième. Les organes ont été entièrement immergés dans le fixateur, dont le volume représentait environ vingt fois celui des tissus. Les pièces de grande taille ont été découpées en fragments plus petits pour garantir une pénétration homogène du fixateur. Après une période de fixation de 24 à 48 heures, les échantillons ont été transférés dans des cassettes en vue du processus de déshydratation.

II.2.8.2. Déshydratation et Eclaircissement

La déshydratation vise à éliminer l'eau contenue dans les cellules et les tissus afin de permettre leur imprégnation ultérieure par la paraffine. Cette étape est réalisée en immergeant les prélèvements successivement dans des bains d'alcool (éthanol ou acétone) de concentrations croissantes : 50°, 70°, 90° et 100°. Ce procédé assure la conservation de l'architecture cellulaire lors de la future inclusion, en évitant toute altération liée à la rupture membranaire.

La paraffine, utilisée comme milieu d'inclusion, est un mélange d'hydrocarbures solides de haut poids moléculaire, insoluble dans les alcools. Pour permettre sa pénétration dans le tissu, il est nécessaire d'effectuer une étape d'éclaircissement au moyen d'un solvant intermédiaire tel que le toluène ou le xylène, capables d'éliminer les résidus d'alcool et de rendre le tissu perméable à la paraffine.

Les échantillons histologiques ont été traités dans un automate comportant douze bains successifs :

- **Premier bain (fixation)** : formol à 10 %, pendant une heure, assurant une fixation optimale des structures tissulaires.
- **Deuxième au cinquième bain (déshydratation)** : immersion séquentielle dans l'éthanol à 50°, 70°, 90° et 96° (une heure dans chaque bain), afin de remplacer progressivement l'eau par l'éthanol.

- **Sixième au neuvième bain (éclaircissement)** : passage dans le toluène (une heure par bain), permettant la substitution de l'éthanol par le toluène, en raison de l'immiscibilité de la paraffine avec l'alcool.
- **Dixième au douzième bain (imprégnation)** : immersion dans la paraffine fondue à 56 °C (une heure dans les deux premiers bains et dix heures dans le dernier), garantissant l'élimination du toluène et l'imprégnation complète des tissus par la paraffine fondue.

II.2.8.3.Inclusion

L'inclusion en paraffine a pour objectif d'enrober les fragments tissulaires préalablement imprégnés, afin de former des blocs solides aptes à la coupe. Les échantillons ont été disposés dans des moules métalliques d'inclusion, puis recouverts de paraffine fondue. Les moules ont ensuite été placés au réfrigérateur afin d'assurer la solidification complète des blocs.

II.2.8.4.Préparation des coupes

la microtomie permet d'obtenir des coupes tissulaires extrêmement fines, d'une épaisseur comprise entre 2 et 5 μm , destinées à l'observation en microscopie optique. Les blocs de paraffine préalablement préparés ont été sectionnés à l'aide d'un microtome, produisant des rubans de coupes d'environ 3 μm d'épaisseur. Ces rubans, constitués de deux à trois sections, ont été déposés sur des lames de verre préalablement enduites de quelques gouttes d'une solution adhésive composée de 2 g d'albumine, 50 ml de glycérine et 1000 ml d'eau distillée. L'étalement des coupes a été réalisé sur une platine chauffante maintenue à 40 °C afin de favoriser leur adhérence et d'éliminer les plis. Les lames ont ensuite été égouttées puis séchées soit à température ambiante, soit dans une étuve pendant une nuit à 37–45 °C.

II.2.8.5.Coloration et montage

Étant donné que les colorants utilisés sont hydrophiles, la coloration des coupes nécessite au préalable une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette phase consiste à immerger les lames fixées et séchées dans des bains de solvants organiques (xylène ou toluène) afin d'éliminer totalement la paraffine, puis dans des bains d'alcool à concentrations décroissantes (96°, 70° et 50°) pour réhydrater progressivement les tissus. Un rinçage final à l'eau courante permet d'assurer une réhydratation complète.

La coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) constitue la méthode topographique de routine en histologie. L'hématoxyline, colorant basique, fixe les structures acides telles que les noyaux, qu'elle teinte en bleu-violet. À l'inverse, l'éosine, colorant acide, colore les éléments basiques du cytoplasme en rose.

Avant le montage final, une étape inverse à la réhydratation doit être réalisée : il s'agit de la déshydratation et de l'éclaircissement, effectuée en plongeant les lames colorées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes, suivis de solvants (toluène ou xylène) pour rendre les tissus translucides et compatibles avec le milieu de montage.

La coloration des préparations histologiques a été réalisée à l'aide d'un automate de coloration comportant 21 bains successifs, organisés comme suit :

- **Bains 1 à 3** : toluène (10 min chacun) pour le déparaffinage.
- **Bains 4 à 6** : éthanol de concentrations décroissantes (10 min chacun) pour la réhydratation.
- **Bain 7** : eau courante (1 min) pour le rinçage et la réhydratation finale.
- **Bains 8 et 9** : hématoxyline de Harris (2 min chacun) pour la coloration des structures acides (noyaux) en bleu-violet.
- **Bain 10** : eau (2 min) pour éliminer l'excès de colorant.
- **Bain 11** : eau acidifiée (1 min) pour différencier et éliminer le surplus d'hématoxyline.
- **Bain 12** : eau ammoniacale (1 min) pour fixer la teinte bleu-violet des noyaux.
- **Bains 13 et 14** : éosine alcoolique à 2 % (2 min chacun) pour la coloration des structures basiques (cytoplasme) en rose.
- **Bain 15** : eau (2 min) pour le rinçage final et l'élimination de l'excès d'éosine.
- **Bains 16 à 18** : éthanol de concentrations croissantes (2 min chacun) pour la déshydratation.
- **Bains 19 à 21** : toluène (10 min chacun) pour l'éclaircissement.

Enfin, une goutte de milieu de montage Eukitt a été déposée sur la coupe, puis une lamelle a été soigneusement posée afin d'éviter toute inclusion de bulles d'air. Les lames ont ensuite été laissées à sécher à température ambiante avant leur observation au microscope optique.

II.2.8.6. Observation microscopique

L'observation des lames histologiques ainsi préparées a été effectuée sur un microscope optique couplé à une caméra couleur digitale (Optikavision lite 2.1). Toutes les images ont une résolution de 2592×1944 pixels.

II.2.9. Analyses statistiques

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type (mean $\pm$ SD). La normalité des distributions a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons intergroupe ont été réalisées par ANOVA à un facteur, suivie du test post hoc de Tukey. L'analyse a été conduite à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0, et le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. l'activité cicatrisante du β chitosane et la gélatine

III.1.1. interprétation du spectre FTIR et du degré de désacétylation du β -chitosane

L'analyse FTIR du β -chitosane préparé et commercial a permis d'identifier les bandes caractéristiques du polysaccharide et d'estimer son degré de désacétylation (DD).

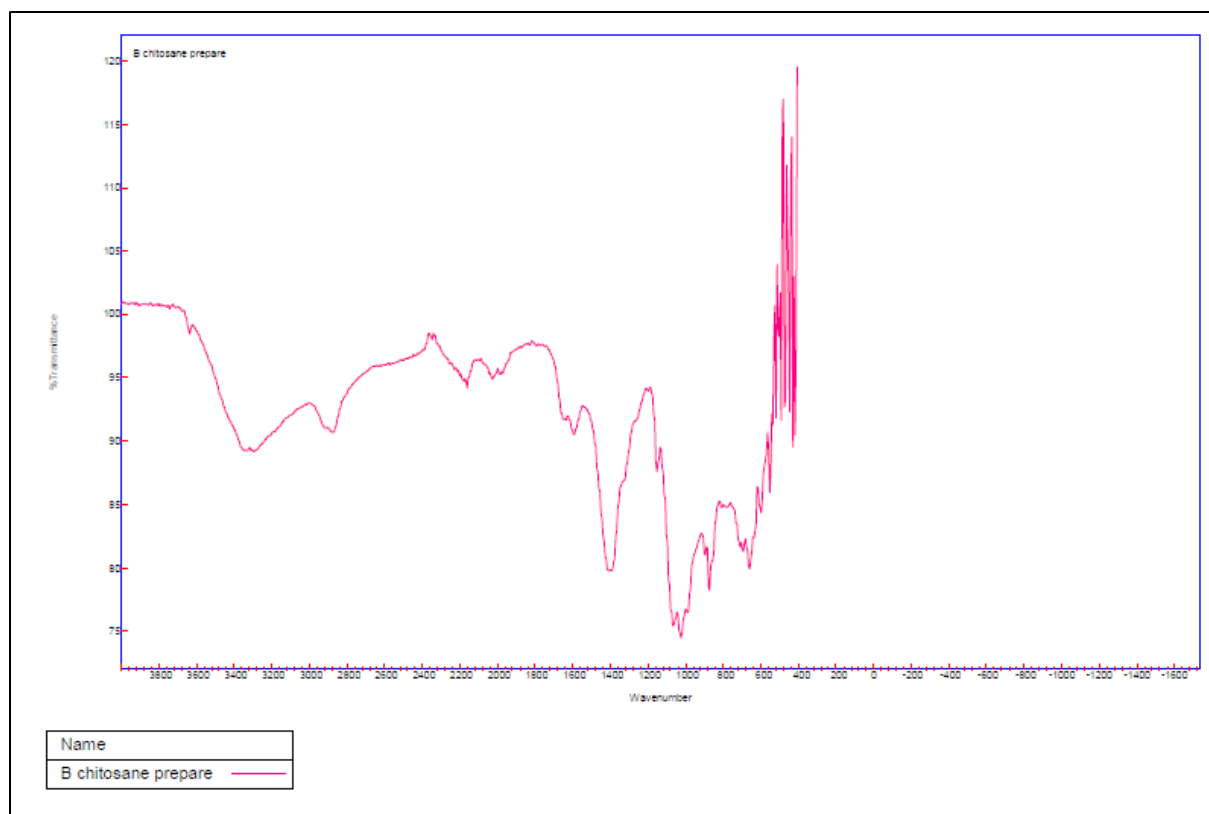


Figure 23: FTIR du β chitosane préparé

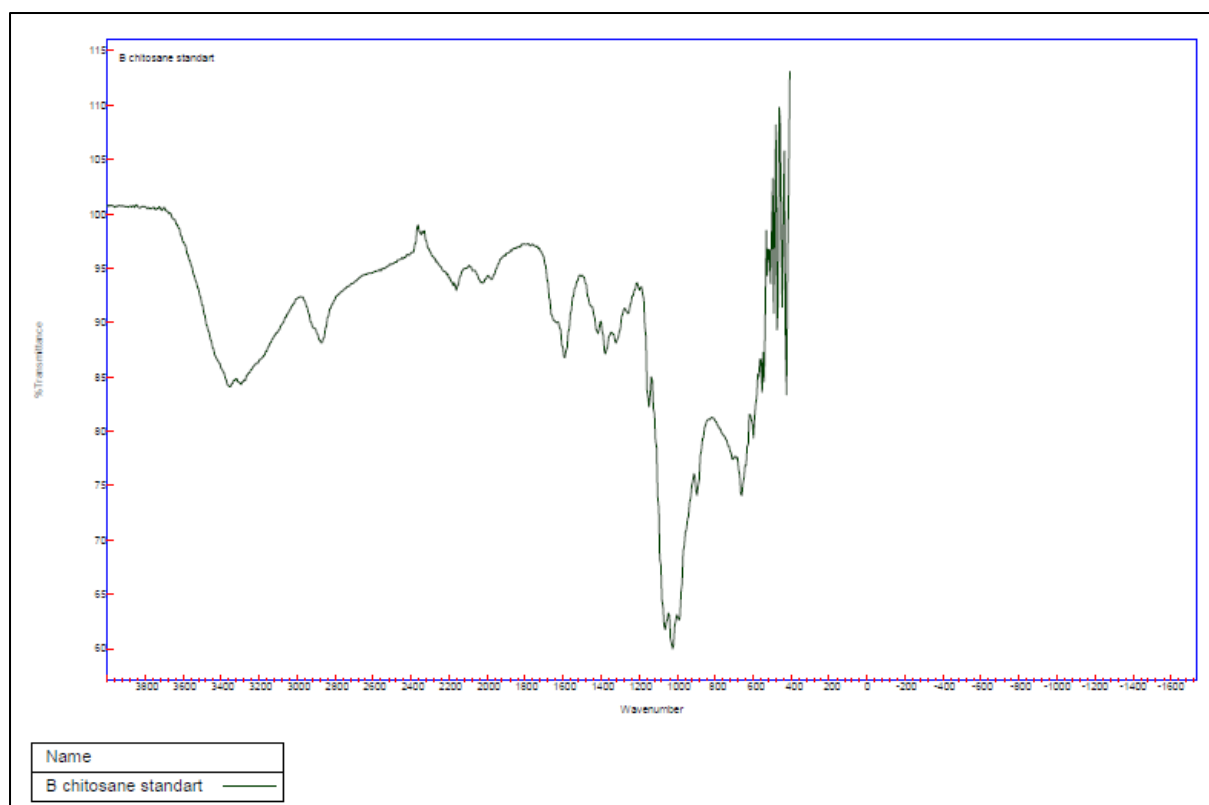


Figure 24: FTIR du β chitosane commercial

L'étude FTIR du β -chitosane préparé (fig. 23) a permis de trouver les marques distinctives du sucre complexe et d'évaluer son niveau de désacétylation (DD). Le résultat montre une large zone d'absorption entre 3600 et 3200 cm^{-1} , ce qui indique l'étirement des liens O–H et N–H, typique des sucres complexes très hydratés et avec des groupes aminés libres. Les mouvements d'étirement des liens C–H se manifestent vers 2920–2870 cm^{-1} , ce qui confirme que la structure glucosidique est intacte.

La zone Amide I, centrée à environ 1655 cm^{-1} , qui correspond à l'étirement C=O des groupes acétamido, est beaucoup moins forte que dans la chitine, ce qui laisse penser qu'il y a eu une élimination importante des éléments acétyle pendant le processus de désacétylation. En même temps, une zone d'absorption plus visible est observée autour de 1590 cm^{-1} , ce qui est lié à la déformation du groupe N–H des amines primaires libres ($-\text{NH}_2$). La force relative de cette zone montre directement que le DD augmente.

Les zones secondaires de la région 1380 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_3)$ de l'acétamido) et 1320 cm^{-1} (Amide III, $\nu\text{C}-\text{N} + \delta\text{N}-\text{H}$) sont présentes, mais moins fortes, ce qui renforce l'idée d'une baisse importante de la partie acétylée. Enfin, les signaux situés entre 1155 et 1030 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$ et $\nu\text{C}-\text{O}$) et à environ 895 cm^{-1} (vibration $\beta\text{-}1\rightarrow4$ glycosidique) sont clairs et bien définis, ce qui confirme que la structure de sucre complexe est conservée après la désacétylation. Le calcul du DD selon la méthode de [Brugnerotto et al. \(2001\)](#), basé sur le rapport A_{1655}/A_{3450} après avoir corrigé la ligne de base, donne une valeur moyenne d'environ 18 à 35 %, selon la façon de mesurer (ponctuel ou intégration sur une zone spectrale). Cette variation est normale, car la façon dont on trouve le DD par FTIR dépend beaucoup du choix de la ligne de base et de la largeur des zones ([Domszy & Roberts, 1985](#); [Baxter et al., 1992](#)). Malgré cela, la présence d'une zone O-H/N-H large et forte, avec une réduction claire de l'Amide I, confirme qu'il y a une désacétylation importante par rapport à la chitine de départ.

En comparant le β -chitosane préparé et commercial ([fig. 24](#)) : les endroits des zones clés (O-H/N-H $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, Amide I $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$, $\delta\text{CH}_3 \sim 1380\text{ cm}^{-1}$, région $1155\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$, $\sim 895\text{ cm}^{-1}$) sont au même endroit pour les deux échantillons, en tenant compte des tolérances habituelles ($\pm 10\text{--}20\text{ cm}^{-1}$) liées à l'ATR, à l'humidité et à la micro-morphologie du film, les formes des régions glycosidiques ($1155\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$) se ressemblent bien, ce qui montre qu'ils ont la même structure de sucre complexe et qu'il n'y a pas eu de dégradation importante de la chaîne pendant la fabrication, la force relative de la zone $\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{NH}_2$) par rapport à l'Amide I est similaire, ce qui correspond à des niveaux de désacétylation proches.

III.1.1.1. Discussion

Ces résultats indiquent que le β -chitosane préparé possède une proportion importante de groupements aminés libres, conférant au polymère une plus grande solubilité en milieu acide, une capacité de complexation accrue avec des anions (acides organiques, biomolécules, métaux) et un potentiel bioactif renforcé (activité antimicrobienne, interaction cellulaire). Le maintien des bandes caractéristiques du squelette glucidique montre que le processus de désacétylation n'a pas induit de dégradation majeure de la chaîne macromoléculaire, ce qui est essentiel pour préserver les propriétés mécaniques et structurales du polymère.

Ces observations sont en accord avec la littérature, où des spectres similaires sont rapportés pour des chitosanes préparés par désacétylation alcaline (Duarte et al., 2002; Rinaudo, 2006). La valeur du DD obtenue se situe dans l'intervalle généralement rapporté pour des chitosanes partiellement à moyennement désacétylés, conférant au produit final des caractéristiques compatibles avec des applications biomédicales, notamment comme hydrogel, support de cicatrisation ou vecteur de délivrance de principes actifs.

La quasi-identité des positions de bande et la proximité des DD montrent que le β -chitosane préparé est spectroscopiquement et compositionnellement équivalent au grade commercial.

Les écarts résiduels d'intensité peuvent provenir de différences d'humidité, d'un taux de protonation légèrement distinct (pH de préparation/stockage), ou de petites variations de masse surfacique/épaisseur de film ATR. Ces effets n'altèrent pas la conclusion d'identité fonctionnelle.

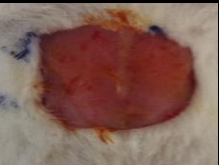
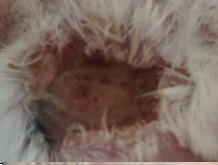
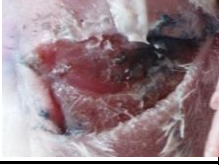
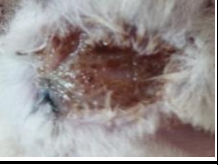
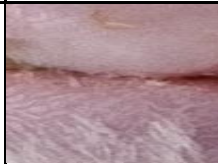
III.1.2. Test d'irritation cutané

Aucun signe d'inflammation (érythème ou œdème) n'a été observé sur les rats après l'application des différents onguents. Selon l'OCDE n° 404 (OCDE, 2015), l'indice d'irritation primaire cutanée obtenu permet de considérer les hydrogels comme non irritant.

III.1.3. Observations cliniques et suivi des plaies

L'observation macroscopique des rats pendant la période expérimentale a révélé la formation de cicatrices recouvrant la plaie, tandis que la cicatrisation se déroule sous la cicatrice. L'épithélisation commence aux bords de la plaie et entraîne le détachement progressif des bords de la cicatrice, tandis que son centre reste fermement adhérent à la plaie jusqu'à la progression de l'épithélisation. Les cicatrices dans les groupes traités se sont rapidement assouplies après l'application topique des hydrogels à base de β -chitosane et la gélatine. En réalité, ces produits naturels ont permis de garder la zone coupée humide, ce qui a accéléré le détachement des tissus morts, qui sont partis facilement après (tableau 3).

Tableau 3: observation macroscopique des plaies.

	β -chitosane	gelatine	β -chitosane + gelatine	controle négative	Cicatryl-bio
J0					
J3					
J6					
J9					
J12					

III.1.4. Évolution du poids corporel

Les rats ont été pesés le jour de l'excision de la peau (D0) et le poids a été enregistré régulièrement tous les trois jours tout au long de l'expérience. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités en termes de poids corporel. De plus, une croissance normale du poids a été observée au fil du temps, démontrant que les formulations étudiées n'ont pas affecté la croissance des rats (tableau 4).

Tableau 4 : Évolution du poids corporel des rats au cours de l'étude de cicatrisation.

Jour	β -chitosane (g)	Gelatine (g)	β -chitosane-gelatine (g)	Contrôle négatif (g)	Cicatryl-Bio (g)
D0	181 $\pm$ 6	179 $\pm$ 5	180 $\pm$ 6	180 $\pm$ 5	182 $\pm$ 5
D3	183 $\pm$ 5	181 $\pm$ 5	182 $\pm$ 5	182 $\pm$ 6	184 $\pm$ 6
D6	186 $\pm$ 6	184 $\pm$ 5	185 $\pm$ 6	185 $\pm$ 5	187 $\pm$ 5
D9	189 $\pm$ 5	187 $\pm$ 6	188 $\pm$ 5	188 $\pm$ 6	190 $\pm$ 5
D12	192 $\pm$ 6	190 $\pm$ 5	191 $\pm$ 6	191 $\pm$ 5	193 $\pm$ 5
D15	195 $\pm$ 5	193 $\pm$ 6	194 $\pm$ 5	194 $\pm$ 6	196 $\pm$ 6

III.1.5. L'évaluation de la cicatrisation

Après l'application journalière des traitements, nous avons évalué par des valeurs numériques allant de 0 à 4 les différents paramètres étudiés.

III.1.5.1. Profondeur de la plaie

La figure 25 montre que l'application des hydrogels de β -chitosane et de gélatine pendant 14 jours a nettement réduit la profondeur des plaies. L'application quotidienne des hydrogels a entraîné une réduction significative de la profondeur des plaies par rapport au groupe témoin non traité. Dès les premiers jours de suivi, la profondeur moyenne des plaies était significativement plus faible dans les groupes traités (β -chitosane, gélatine, β -chitosane + gélatine, Cicatryl-Bio) que dans le groupe témoin (ANOVA, $p < 0,05$). La réduction la plus marquée a été observée dans le groupe composite β -chitosane + gélatine ($p < 0,01$ vs témoin), indiquant un effet synergique des deux biomatériaux sur la restauration du volume tissulaire.

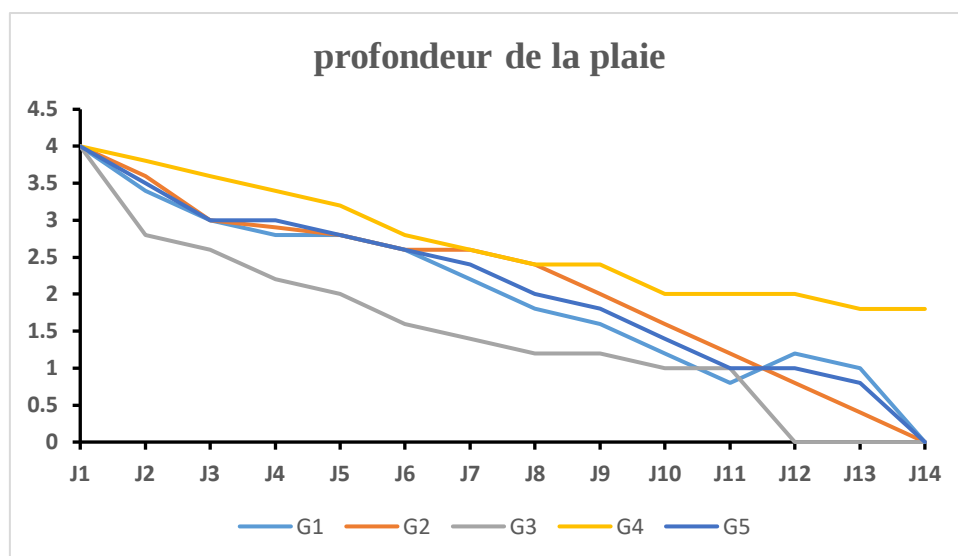


Figure 25 : Evaluation de la profondeur des plaies.

III.1.5.2. Le Bourgeonnement

La figure 26 montre que Le bourgeonnement a débuté tôt (J2) et a persisté chez les animaux non traités, alors que, dans les groupes traités, l'apparition du bourgeon a été décalée au J4 et sa disparition a été anticipée (disparition totale observée au J10). La comparaison statistique montre une différence très hautement significative entre le témoin et l'ensemble des groupes traités pour la durée et l'intensité du bourgeonnement ($p < 0,001$). Le groupe β -chitosane + gélatine présente la disparition la plus rapide du bourgeon ($p < 0,001$ vs témoin ; $p < 0,01$ vs β -chitosane seul).

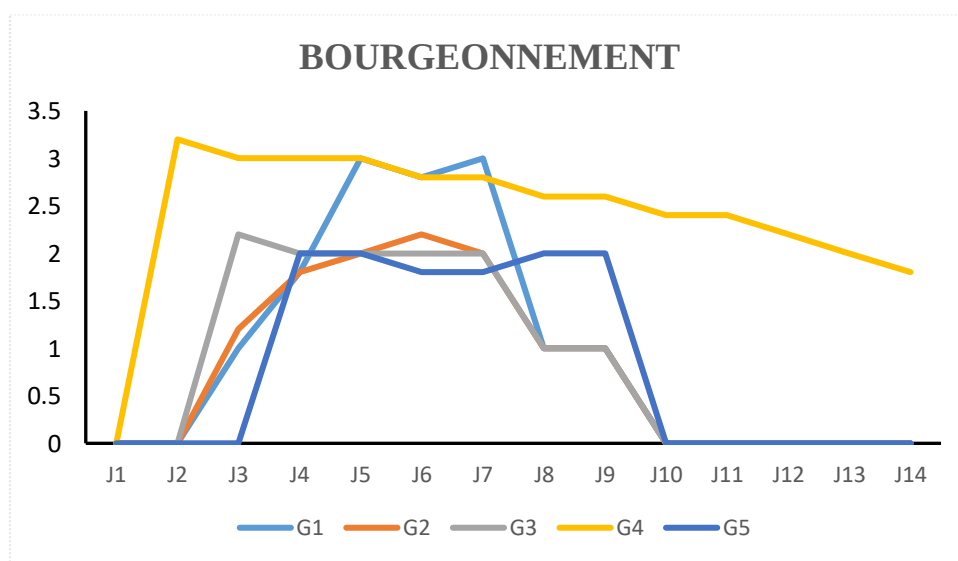


Figure 26: Evaluation du bourgeonnement

III.1.5.3. Apparition d'œdèmes

L'œdème s'estompe plus rapidement dans les groupes traités que dans le témoin : disparition observée au J4 pour β -chitosane + gélatine, J5 pour β -chitosane, J7 pour la gélatine et Cicatryl-Bio, alors qu'il persiste jusqu'à J12 chez le témoin. Les analyses montrent une réduction très hautement significative de l'œdème pour le composite β -chitosane + gélatine ($p < 0,001$ vs témoin), une réduction hautement significative pour β -chitosane ($p < 0,01$ vs témoin) et une réduction significative pour la gélatine et Cicatryl-Bio ($p < 0,05$ vs témoin). Ces résultats traduisent un effet anti-inflammatoire prononcé du chitosane et une synergie dans le composite (fig. 27).

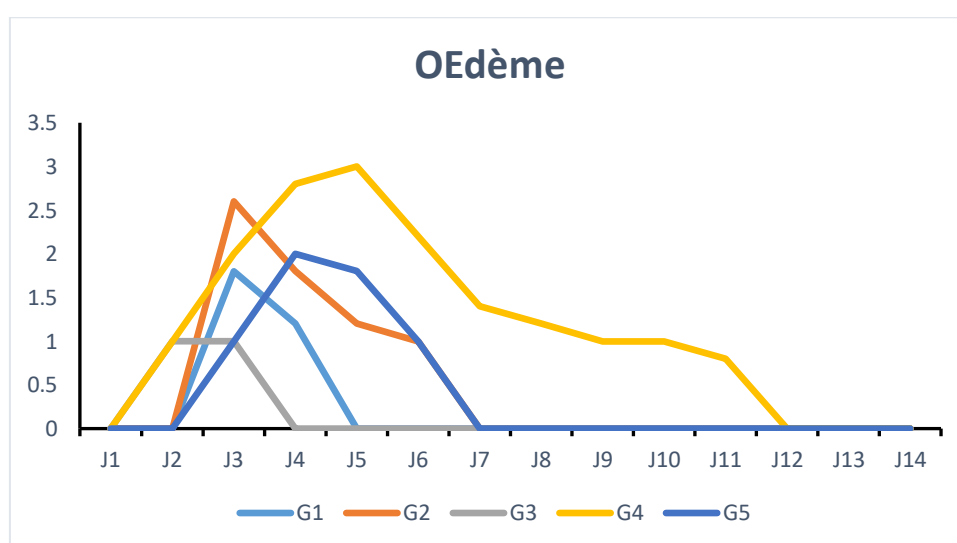


Figure 27: Apparition d'œdème

III.1.5.4. Epaisseur de la croûte

La croûte s'est formée précocement (J0–J3) dans tous les groupes. Dans le groupe témoin, la croûte persiste jusqu'au J14, tandis que dans les groupes traités elle disparaît vers J8. La disparition anticipée de la croûte est très hautement significative dans le groupe β -chitosane + gélatine ($p < 0,001$ vs témoin), hautement significative dans le groupe β -chitosane ($p < 0,01$ vs témoin) et significative pour la gélatine ($p < 0,05$ vs témoin). La disparition plus précoce de la croûte traduit une épithélialisation accélérée et une meilleure élimination des débris fibrineux dans les groupes traités (fig. 28).

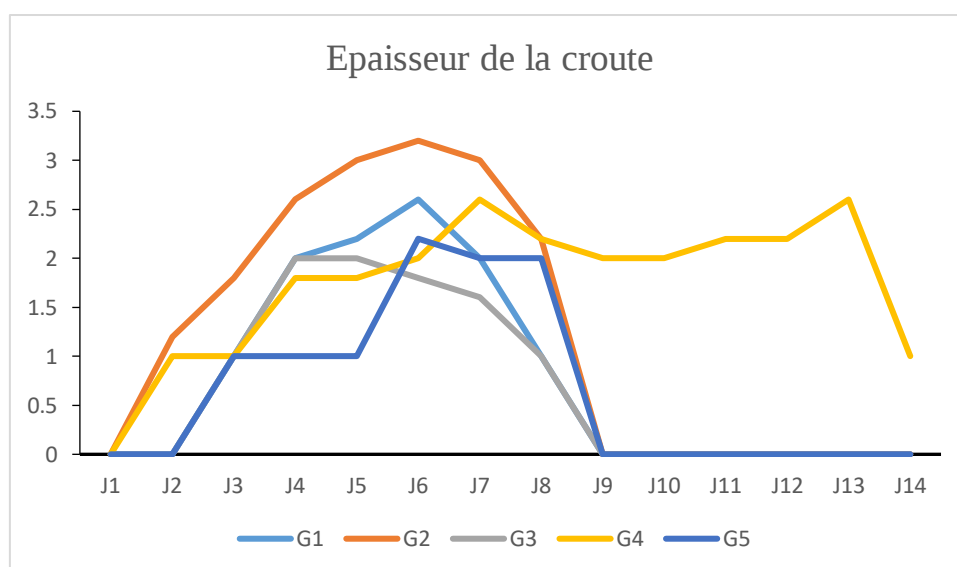


Figure 28: Evolution de l'épaisseur de la croûte

III.1.6. Contraction de la plaie

La taille initiale de la plaie était comparable dans tous les groupes, puis les excisions ont enregistré des taux de réduction des tailles différents. Il a été constaté que les rats des groupes traités montraient une meilleure évolution des plaies par rapport aux rats de contrôle. Il a également été observé que les excisions traitées avec l'hydrogel de β -chitosane et de gélatine cicatrisaient plus rapidement que celles traitées avec Cicatryl-bio®. Il est bien connu que les radicaux libres peuvent soutenir la formation de plaies et, par conséquent, les composés antioxydants pourraient être utiles pour soutenir le processus de cicatrisation des plaies (Kumar et al., 2013) (fig.29)

Les propriétés antioxydantes et de capture des radicaux libres du β -chitosane et de la gélatine ont été attribuées aux acides phénoliques et aux flavonoïdes, qui sont également reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. De plus, certains polyphénols tels que les tanins et les proanthocyanidines, grâce à leurs propriétés astringentes, pourraient également améliorer la contraction de la plaie, facilitant le processus de réépithélisation (Nayak et al., 2013 ; Fox et al., 2017). Nous avons observé une réduction de la surface initiale de toutes les plaies étudiées. Seule cette contraction varie selon l'hydrogel utilisé. Elle est presque totale au 14e jour pour l'hydrogel (β ch + gel) (97,30 %), β -chitosane (96,72 %) et gélatine (96,63 %), ainsi que Cicatryl-bio (92,76 %). Les comparaisons statistiques indiquent que la contraction observée est très hautement significative pour le groupe β -chitosane +

gélatine par rapport au témoin ($p < 0,001$), hautement significative pour le groupe β -chitosane ($p < 0,01$) et significative pour la gélatine ($p < 0,05$). Le contrôle positif Cicatryl-Bio présente également une contraction hautement significative par rapport au témoin ($p < 0,01$) mais reste inférieure à celle du composite ($p < 0,05$, comparaison directe). Ces résultats montrent que le composite β -chitosane/gélatine atteint une fermeture quasi totale de la plaie à J14, supérieure à celle du produit de référence (fig. 30).

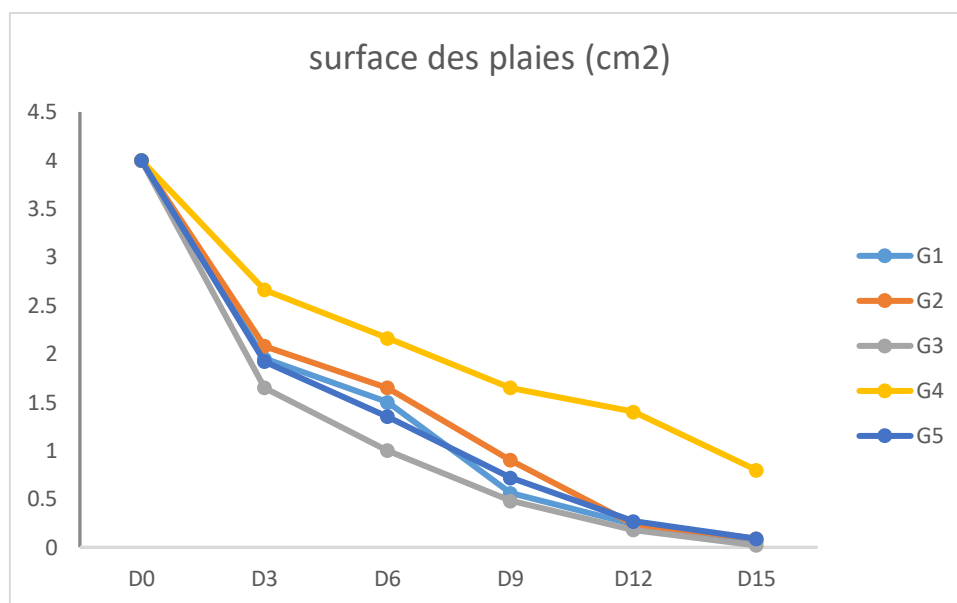


Figure 29: l'Evolution de la cicatrisation des plaies au jour 0, 3, 6, 9 and 12.

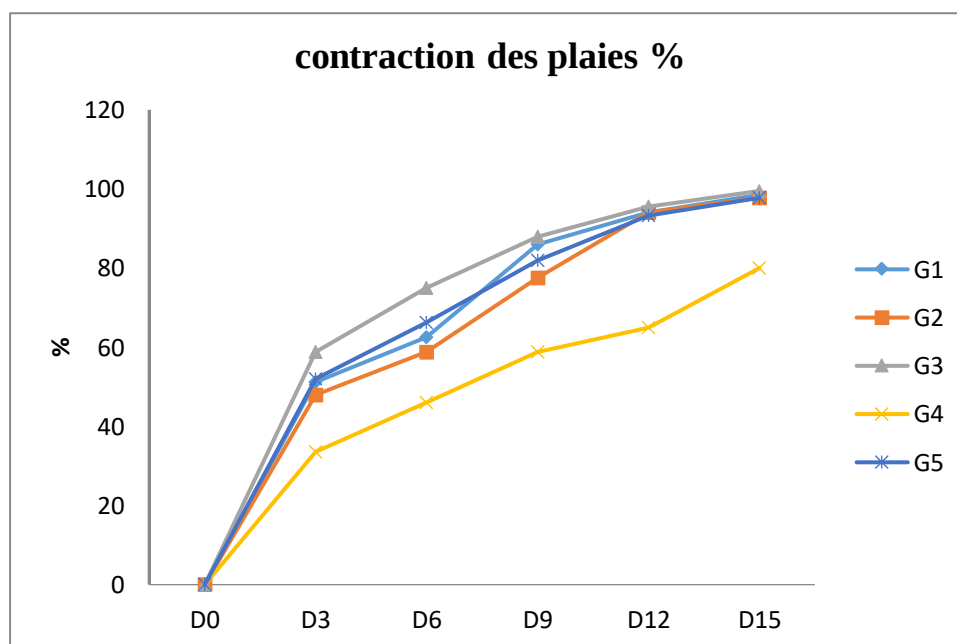


Figure 30: contraction des plaies au jour 0, 3, 6, 9 and 12.

III.1.7. Étude histopathologique

Les résultats histologiques de l'évaluation de la plaie excisée sont résumés dans les Figures. Dans cette étude, l'augmentation de la surface de la plaie au cours des premiers jours de cicatrisation est corrélée histologiquement avec les phases inflammatoires (tableau 5).

III.1.7.1. 3 jours après la chirurgie

L'analyse microscopique de la peau des plaies du groupe témoin a mis en évidence une régénération épithéliale très limitée. Ainsi, au cours des trois premiers jours de cicatrisation, on a observé un infiltrat cellulaire inflammatoire, localisé sur certaines régions en nécrose superficielle. Les bords coupés de l'épiderme étaient alors épaissis, et une bande constituée de leucocytes polynucléaires se dégageait, isolant les tissus vivants des zones nécrotiques.

Le traitement avec l'hydrogel de chitosane a permis également de constater des infiltrats diffus de cellules inflammatoires, et le tissu granulaire s'est formé en quelques jours, plus rapidement que dans le groupe témoin.

De la même manière que dans le groupe témoin, l'application de l'hydrogel de gélatine a mis en avant la présence de nécroses aux bords de l'épiderme, de tissu granulaire infiltré de cellules inflammatoires et de vaisseaux sanguins congestionnés.

Après traitement par les hydrogels de β -chitosane et de gélatine, l'observation de cellules inflammatoires se limitait au tissu granulaire. On a ainsi observé une forte néo-angiogenèse et la prolifération des fibroblastes dans le tissu épidermique.

Au niveau de la plaie du groupe traité par la Cicatryl-bio, on observait un recouvrement par un nouvel épiderme. Le tissu de granulation remplit la plaie et on y observe un infiltrat de cellules inflammatoires et de néo-vaisseaux sanguins engorgés.

III.1.7.2. 6 jours après la chirurgie

Une inflammation modérée du derme était toujours présente dans les plaies témoins. Il était possible d'observer la prolifération des fibroblastes et le début de la néo-angiogenèse.

Les groupes traités avec l'hydrogel de chitosane et de gélatine montraient un épiderme régénéré couvrant la zone de plaie. La formation de tissu granulaire se produisait grâce à une combinaison de migration et de prolifération des fibroblastes.

Le groupe traité avec l'hydrogel de chitosane + gélatine a démontré une amélioration rapide de la cicatrisation des plaies par rapport à tous les autres groupes. L'épiderme blessé était presque complètement régénéré six jours après la chirurgie. Le processus inflammatoire avait diminué par rapport aux trois premiers jours et le tissu granulaire était régénéré.

Dans le groupe cicatryl-bio, quelques cellules inflammatoires occupaient encore le tissu granulaire, et une néo-formation de vaisseaux sanguins était observée dans la couche épidermique.

III.1.7.3. 9 à 12 jours après la chirurgie

Dans le groupe non traité, la zone de plaie guérissait plus lentement et la fermeture de la plaie a été atteinte au-delà de 12 jours. La taille de la plaie avait diminué et était recouverte de tissu épithélial incluant une formation initiale de kératine, mais des cellules inflammatoires étaient encore présentes dans le tissu granulaire.

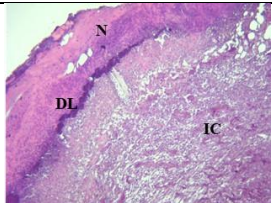
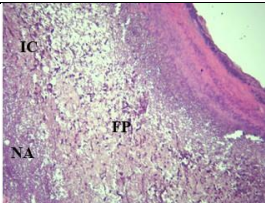
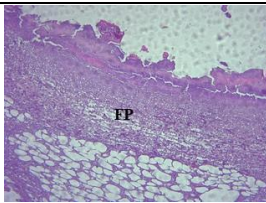
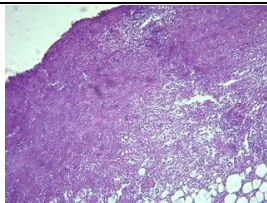
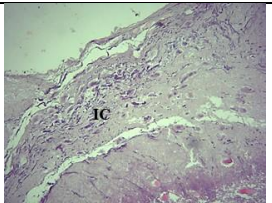
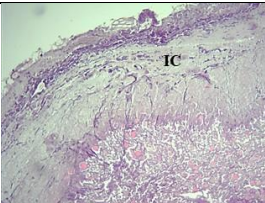
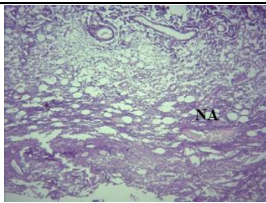
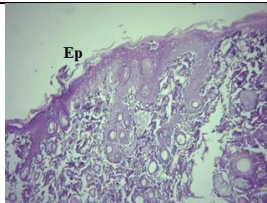
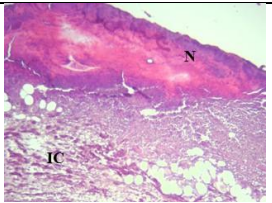
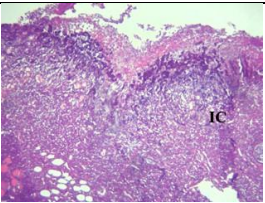
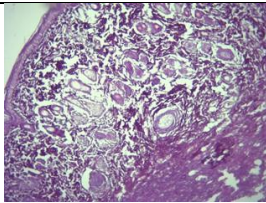
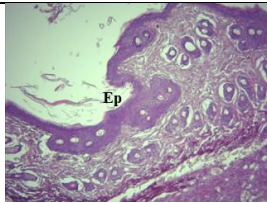
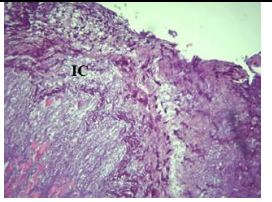
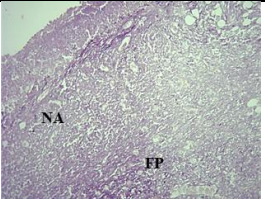
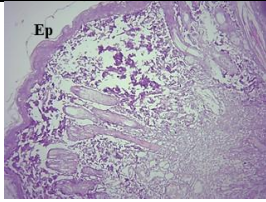
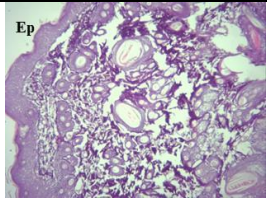
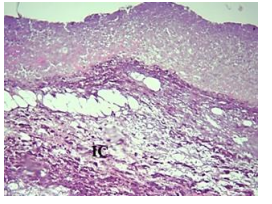
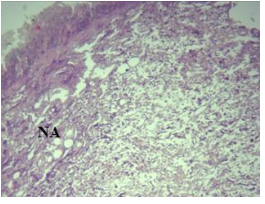
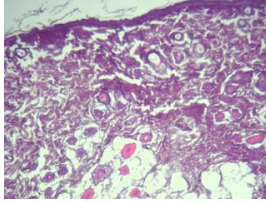
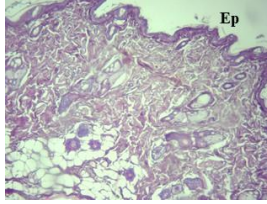
Au onzième jour après la plaie, la fermeture de la plaie dans les groupes de chitosane et de gélatine était rapide, comparable au groupe cicatryl-bio et plus rapide que le groupe témoin. Presque tout le tissu nécrotique observé dans le groupe traité avec la gélatine a été remplacé par un nouveau tissu granulaire. D'autre part, les cellules inflammatoires étaient absentes dans l'épiderme régénéré.

Un tissu granulaire sans présence d'infiltrat de cellules inflammatoires a été noté dans le groupe traité uniquement avec le chitosane et la gélatine, après 9 jours. Pendant ce temps, la zone de plaie était parfaitement guérie. Le tissu granulaire présentait une prédominance considérable de fibres de collagène.

L'application de cicatryl-bio sur la surface de la plaie a développé la cicatrisation en seulement 12 jours par rapport au groupe témoin. Il n'y avait pas de cellules inflammatoires diffuses dans le tissu granulaire.

Tableau 5: Coupes histologiques du tissu cutané (coloration H&E, $\times 100$). (A) Groupe témoin, (B) groupe traité par hydrogel de chitosane, (C) groupe traité par hydrogel de gélatine, (D) groupe traité par hydrogel combiné chitosane-gélatine, et (E) groupe traité par Cicatryl-Bio.

Les observations histologiques montrent diverses caractéristiques selon les groupes : la **ligne de démarcation (DL)**, l'**épithélialisation (Ep)**, la **prolifération des fibroblastes (FP)**, la présence de **cellules inflammatoires (IC)**, la **nécrose (N)** et la **néoangiogenèse (NA)**.

	Day 03	Day 06	Day 09	Day 12
A				
B				
C				
D				
E				

III.1.7.4. Discussion

La cicatrisation des plaies est un mécanisme compliqué et changeant que l'on ne cerne pas encore tout à fait. Cela inclut un ensemble de réactions de création et de décomposition qui se passent selon une progression ordonnée d'actions des molécules et des cellules. Cette action comprend l'inflammation, qui est très importante pour éviter les infections et pour lancer la phase de croissance nécessaire à la réparation des tissus (Singer et Clark, 1999). L'inflammation, qui se voit par le déplacement rapide des neutrophiles et des macrophages vers l'endroit de la plaie, doit se produire vite pour aider les étapes qui suivent : création du tissu de granulation, production de fibres, création de nouveaux vaisseaux sanguins, rétrécissement de la plaie et, plus tard, réparation de la surface par l'épithélium pour refermer la plaie (Martin, 1997 ; Eming et al., 2007).

La cicatrisation des plaies est une façon de réagir à une blessure pour réparer les parties du corps abîmées. Cette action demande que la réparation du tissu de soutien, la refabrication de la peau et la création de nouveaux vaisseaux sanguins se fassent ensemble pour créer un nouveau tissu et fermer la blessure. Cela comprend aussi une plus grande production de cellules de soutien, ainsi que la fabrication de différentes protéines de la structure autour des cellules et de substances qui aident à la croissance (Singer et Clark, 1999 ; Gurtner et al., 2008).

La guérison des plaies cutanées à pleine épaisseur s'effectue par la formation de tissu de granulation, la contraction de la plaie et l'épithélialisation (Martin, 1997). L'épithélialisation est obtenue lorsque les cellules épidermiques intactes des bords de la plaie migrent à travers le tissu de granulation (Clark, 1996). Il a été démontré que l'apport de collagène exogène accélère la migration des cellules impliquées dans la cicatrisation des plaies cutanées. En raison de sa nature moléculaire, le collagène exogène s'intègre parfaitement au tissu de la plaie, soutient le collagène endogène *in vivo* et favorise l'attachement, la migration et la prolifération des cellules sur le site de la plaie (Chvapil, 1979 ; Ruszczak, 2003).

La contraction de la plaie est un indicateur du suivi du processus de cicatrisation, avec une réduction progressive de la surface de la plaie au fur et à mesure de la guérison. Le fibroblaste, est la plus active environ une semaine après la blessure et aide au démarrage de l'angiogenèse, de l'épithélialisation et de la formation de collagène. Dans le groupe témoin, la guérison complète s'est produite en 28 jours, entraînant une cicatrice importante en raison d'une contraction étendue. En revanche, le groupe β -chitosane et gélatine a atteint une

cicatrisation complète en 14 jours, avec une contraction minimale et une cicatrice plus petite par rapport au groupe témoin. La contraction de la plaie correspond au mouvement des bords de la plaie vers l'intérieur, facilitant sa fermeture après une blessure.

Le taux de cicatrisation des plaies est évalué par l'épithélialisation de la peau sur toute la surface de la plaie, tandis que le rétrécissement de la plaie est mesuré en fonction du pourcentage de la taille de la plaie au début qui reste (Falanga, 2005).

Lorsqu'il s'agit de plaies profondes, la reconstruction du derme débute par l'angiogenèse. (Tonnesen *et al.*, 2000). Par la suite, une matrice conjonctive temporaire, connue sous le nom de tissu de granulation, se met en place et joue un rôle clé dans la régénération du tissu conjonctif (Singer & Clark, 1999).

histologiquement, le fond de la plaie présente un bourgeon correspondant au tissu de granulation, résultant de l'angiogenèse et de la prolifération des fibroblastes. Ce tissu se développe progressivement jusqu'à combler la cavité de la plaie. La diminution de la surface de cette dernière est rendue possible par le rapprochement graduel de ses bords (Gabbiani, 2003).

L'apparition d'un œdème constitue une réaction vasculaire et cellulaire essentielle du processus inflammatoire. En effet, la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins entraînent la libération de neutrophiles et de monocytes, qui interviennent dans l'élimination des agents pathogènes par phagocytose (Martin, 1997).

Enfin, la partie superficielle du caillot sanguin se solidifie en une croûte protectrice qui recouvre la plaie et la met à l'abri des agressions extérieures, comme l'ont décrit Martin (1997). Cette croûte, jouant le rôle de pansement naturel, est progressivement soulevée par les processus de bourgeonnement et d'épidermisation qui se déroulent en dessous (Singer et Clark, 1999).

Une exsudation modérée a été observée au site de la plaie jusqu'au 6^e jour dans les plaies traitées au chitosane et dans le groupe témoin, probablement en raison de la réponse inflammatoire déclenchée par le traumatisme chirurgical. Turner *et al.*, (2012) ont rapporté une réduction notable de l'exsudation dans les plaies à pleine épaisseur traitées avec la sous-muqueuse de l'intestin grêle par rapport aux plaies non traitées dans un modèle de rat. De plus, Nguyen *et al.*, (2015) ont trouvé une corrélation inverse entre la surface de survie des greffes de peau et le niveau d'exsudation dans le lit de la greffe. D'autres études, notamment

celles de [Patel et Sharma \(2018\)](#), ont également documenté une diminution des niveaux d'exsudat dans les plaies à pleine épaisseur traitées avec des matrices acellulaires dans des modèles de lapins et de rats au fur et à mesure de la cicatrisation.

La création d'un tissu de granulation en bon état, qui dépend beaucoup de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est très importante pour que les blessures guérissent bien ([Martin, 2016](#)). Une quantité correcte de tissu de granulation avec des vaisseaux sanguins neufs a été remarquée à l'endroit où l'éponge de chitine touchait, 7 et 14 jours après avoir mis une éponge de chitine sous la peau d'un chien ([Sashiwa et al., 2003](#)). Des constatations semblables ont été faites dans le groupe 3 de notre étude.

Le chitosane est biocompatible, biodégradable, hémostatique et surtout, il accélère la cicatrisation des plaies ([Jayakumar et al., 2011](#)). Dans des modèles animaux expérimentaux, il a été démontré que le chitosane agit sur toutes les étapes de la réparation des plaies ([Kean et Thanou, 2010](#)). Ses propriétés hémostatiques sont particulièrement évidentes lors de la phase inflammatoire.

Il joue également un rôle dans la modulation de la migration des neutrophiles et des macrophages, contribuant aux processus de réparation tels que la fibroplasie et l'épithélialisation ([Ueno et al., 2001](#); [Muzzarelli, 2009](#)). Ces résultats corroborent nos propres observations selon lesquelles la poudre de chitosane de qualité médicale, stérilisée, est un biomatériau précieux qui accélère la cicatrisation des plaies. Une analyse histologique a été réalisée pour évaluer les facteurs de réponse biologique.

De nombreuses études cliniques et expérimentales ont démontré l'efficacité du chitosane dans la promotion de la cicatrisation des plaies ([Ueno et al., 2001](#); [Muzzarelli, 2009](#)). Comparé à une étude histologique précédente, nos résultats montrent que l'hydrogel de β -chitosane dérivé de *Sepia officinalis* accélère la cicatrisation des plaies, ce qui a également été rapporté pour l' α -chitosane par divers auteurs ([Jayakumar et al., 2011](#); [Azad et al., 2004](#)). De plus, des études ont indiqué que l'utilisation topique de l'hydrogel de gélatine peut améliorer le processus de cicatrisation ([Boateng et al., 2008](#)). Notre étude a également démontré que la synergie de β -chitosane avec de l'hydrogel de gélatine accélère significativement la cicatrisation des plaies, en accord avec les résultats de [Shamloo et al., \(2018\)](#).

III.2. l'effet des polysaccharides de l'encre SIP sur polykystique ovarien

III.2.1. Suivi du poids corporel des rates femelles

Le suivi du poids corporel constitue un indicateur essentiel pour évaluer l'impact physiopathologique du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (tableau 6).

Tableau 6 : Poids corporel des rates femelles au cours de l'induction du SOPK

Groupes expérimentaux	Poids initial (g)	Poids final (g)
Contrôle	189,4 ± 7,8	215,6 ± 9,2
SOPK	191,2 ± 8,1	238,9 ± 10,5
SOPK + SIP 50 mg/kg	190,6 ± 7,5	221,8 ± 9,7
SOPK + SIP 100 mg/kg	192,0 ± 8,0	216,9 ± 8,8

Au cours de la période d'évaluation de la masse corporelle des rates femelles, la prise de poids était particulièrement significative chez les animaux du groupe SOPK comparativement au groupe contrôle ($p < 0,001$) ; or cette prise de poids excessive est un des paramètres les plus fréquemment observés dans le SOPK (altérations métaboliques et hormonales liées à la L-arginine). En revanche, l'application des polysaccharides de l'encre de seiche (SIP) aux doses de 50 et 100 mg/kg a permis de restreindre significativement la prise de poids vis-à-vis de celle du groupe SOPK non traité ($p < 0,001$) où elle était encore excessive et s'est révélée presque similaire à celle des animaux témoins, ce qui est révélateur du bon effet du SIP sur les troubles métaboliques chez le SOPK.

Ces résultats apportent un soutien à l'idée d'un suivi pondéral dans l'évaluation du SOPK et permettent de faire l'hypothèse d'un effet préventif du SIP vis-à-vis des désordres pondéraux associés au SOPK.

III.2.2. Observations macroscopiques

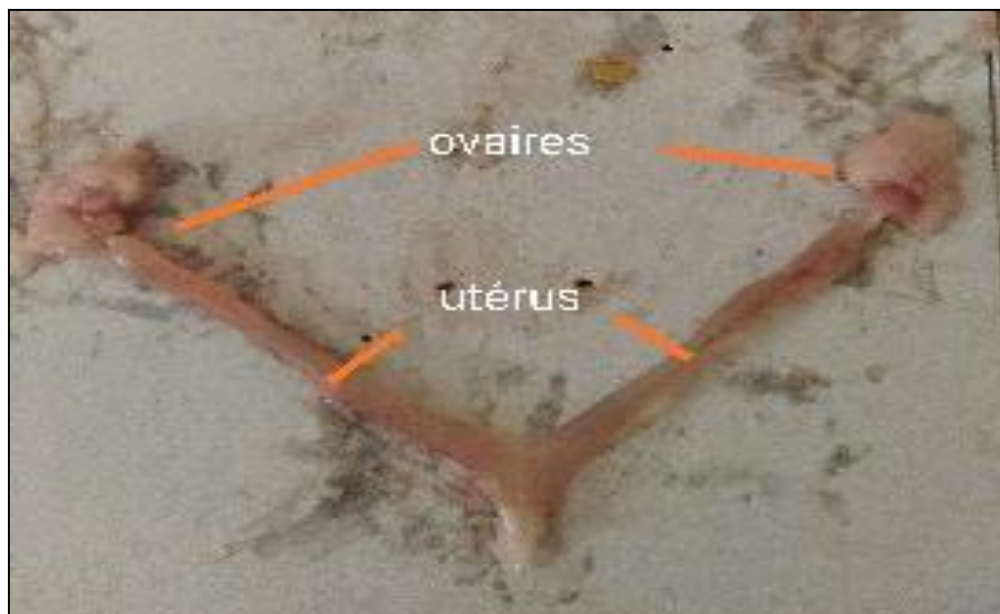


Figure 31: ovaire sain du groupe témoin.

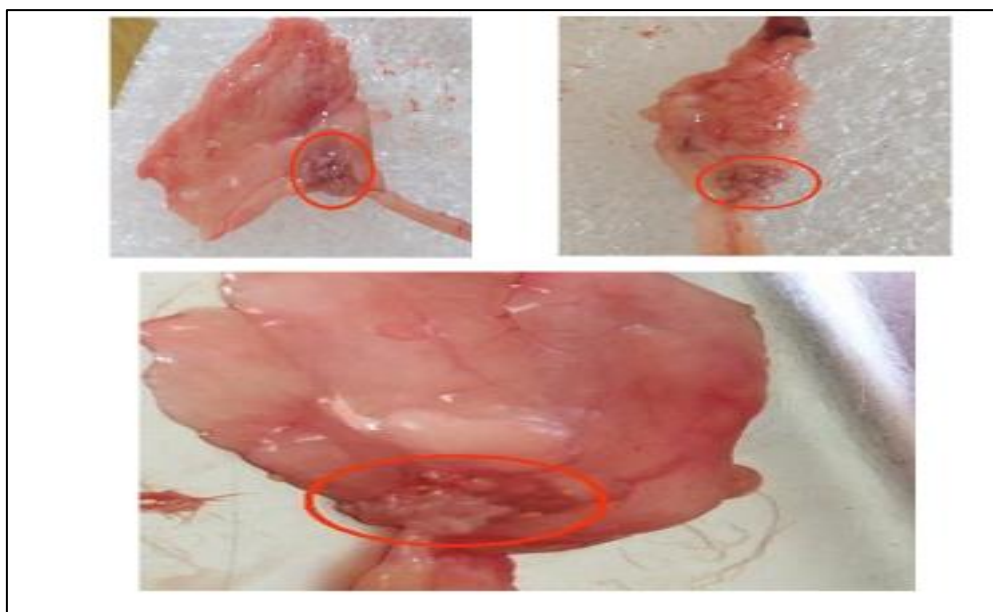


Figure 32: ovaire polykystique.



Figure 33: l'appareil génitale d'une femelle avec SOPK

III.2.2.1. Interprétation et discussion des images d'un ovaire sain et d'un ovaire polykystique (SOPK)

Le SOPK est caractérisé par une altération de la folliculogénèse, conduisant à l'accumulation de follicules kystiques et à une anovulation chronique (Teede et al., 2018). L'hypertrophie ovarienne observée chez les modèles animaux reproduit bien les anomalies morphologiques décrites chez les femmes atteintes de SOPK (Fauser et al., 2012).

Cette dysfonction folliculaire est liée à un déséquilibre hormonal, notamment une hyperandrogénie, qui perturbe la maturation folliculaire et le cycle ovulatoire (Dumesic et al., 2015). L'absence de corps jaunes souligne l'échec de l'ovulation, un facteur clé du syndrome.

Chez les rats, la modélisation du SOPK par induction chimique (ex : L-arginine, DHEA) est couramment utilisée pour étudier ces mécanismes et tester des traitements potentiels (Ding et al., 2018).

L'ovaire est hypertrophié avec une surface irrégulière, Présence de nombreux follicules kystiques, immatures et dilatés, qui n'atteignent pas le stade de l'ovulation (anovulation), Réduction ou absence des corps jaunes, traduisant une ovulation perturbée ou absente, Hyperplasie du tissu stromal et épaissement du cortex ovarien, associés à une surproduction d'androgènes(fig.32 et 33).

III.2.3. Poids des ovaires

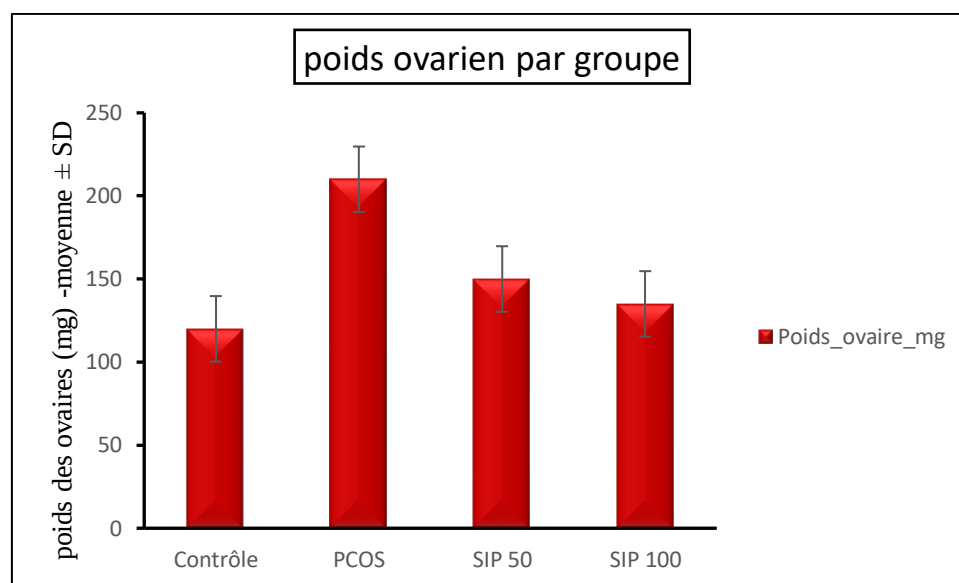


Figure 34: poids des ovaires

Le poids ovarien augmente fortement chez les femelles atteintes de SOPK ($\approx +75$ % par rapport au groupe contrôle), et le traitement par les polysaccharides d'encre de seiche (SIP) réduit significativement ce surpoids ovarien (SIP50 ≈ -28 % vs PCOS ; SIP100 ≈ -36 % vs PCOS), avec une meilleure réponse observée à la dose la plus élevée (fig. 34). Cette amplitude de réduction est comparable à celle rapportée pour d'autres agents antioxydants ou polyphénoliques testés dans des modèles de SOPK induit par le létrozole, tels que le curcumin, la génistéine ou la mangiférine, qui entraînent également une diminution significative du poids ovarien, accompagnée d'une amélioration histologique et hormonale (Sahoo et al., 2014 ; Sharma et al., 2016 ; Zhang et al., 2018 ; Choi et al., 2020).

L'induction du SOPK a entraîné une augmentation significative du poids ovarien ($\approx 210 \pm 15$ mg contre 120 ± 10 mg chez les témoins), traduisant une hypertrophie ovarienne associée à un profil d'hyperandrogénie et à un stress oxydatif marqué. Le traitement par les polysaccharides d'encre de seiche (SIP) a permis une réduction dose-dépendante de ce surpoids ovarien ($\approx 150 \pm 12$ mg pour SIP 50 et 135 ± 10 mg pour SIP 100), en parallèle d'une baisse du MDA et d'une restauration des activités enzymatiques antioxydantes (SOD, CAT, GPx). Ces observations suggèrent que le SIP atténue l'hypertrophie et la formation de kystes ovariens via la modulation du stress oxydatif et de l'inflammation, un mécanisme comparable à celui rapporté pour d'autres agents antioxydants tels que le curcumin (Zhang et al., 2024), la

génistéine (Su et al., 2025) ou la mangiférine (Z Yong et al., 2024) dans les modèles de SOPK induits par le létrozole.

III.2.3.1. Discussion

L'augmentation du poids des ovaires est souvent observée chez les animaux utilisés pour étudier le syndrome des ovaires polykystiques . Cette croissance excessive des ovaires est surtout due à l'accumulation de nombreux follicules kystiques qui reflètent une hyperactivité androgénique et une perturbation de l'ovogenèse (Patel et al., 2018; Namlı Kalem et al., 2023). Dans notre recherche, la création d'un SOPK avec de la L-arginine a causé une augmentation importante du poids des ovaires comparé au groupe témoin, ce qui montre que nous avons réussi à créer ce syndrome. Ces résultats concordent avec ceux de Yildiz et al., (2021), qui ont constaté une forte augmentation de la taille et du poids des ovaires chez des rats ayant un SOPK induit.

L'administration des polysaccharides d'encre de seiche a entraîné une diminution du poids des ovaires, surtout avec une dose de 100 mg/kg. Cette observation suggère un effet protecteur et régulateur des SIP sur l'hypertrophie ovarienne. L'observation faite est donc en faveur d'un éventuel effet protecteur des SIP sur l'hypertrophie ovarienne. De multiples mécanismes peuvent expliquer cet effet :

- Une meilleure normalisation de l'équilibre hormonal : les SIP ont permis de restaurer les valeurs de LH, FSH et testostérone (Feng et al., 2022).
- Un effet antioxydant : le stress oxydatif est impliqué dans le développement du SOPK et le développement ovarien (Calcaterra et al., 2021). Les SIP sont capables de réduire le MDA et d'augmenter l'activité des enzymes antioxydantes ce qui préserve les tissus des lésions oxydatives et donc de l'hypertrophie.
- Un effet anti-inflammatoire : certaines études ont montré que les SIP marins avaient un effet anti-inflammatoire en inhibant les cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF- α et IL-6 (Corrie et al., 2023) Plus anciennement, Xu et al., (2020) l'ont démontré sur des polysaccharides marins qui rétablissent la morphologie ovarienne dans le SOPK chez les rates alors que Chen et al., (2022) a montré le SIP capable de revenir aux valeurs physiologiques du poids ovarien.

Ainsi nos résultats font des SIP des agents correcteurs de l'hypertrophie ovarienne, plaçant ces polysaccharides d'origine marine comme une approche thérapeutique naturelle envisageable pour le SOPK.

III.2.4. Résultats hormonaux

Le groupe SOPK a présenté une élévation significative des taux de LH et de testostérone ($p < 0,001$) par rapport au contrôle, accompagnée d'une baisse de la FSH et de l'estradiol. Le traitement avec les polysaccharides a permis de corriger ces anomalies de façon dose-dépendante : la dose de 100 mg/kg a restauré un équilibre hormonal proche du groupe contrôle (tableau 7).

Tableau 7: les résultats hormonaux

Groupe	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Testostérone (ng/mL)	Progestérone (ng/mL)	Estradiol (ng/mL)
Contrôle	1580 ± 474	4.8 ± 1.44	0.75 ± 0.15	68.06 ± 13.61	0.27 ± 0.05
PCOS	490 ± 147	7.2 ± 2.16	1.88 ± 0.38	33.21 ± 6.64	0.70 ± 0.14
SIP 50	1169 ± 351	2.4 ± 0.72	1.10 ± 0.22	61.54 ± 12.31	0.50 ± 0.10
SIP 100	1198 ± 359	3.2 ± 0.96	0.90 ± 0.18	63.25 ± 12.65	0.51 ± 0.10

III.2.4.1. Testostérone (androgènes)

L'augmentation de la testostérone est un marqueur central du phénotype PCOS ; elle provient principalement des cellules thécales sous l'influence de LH et d'un excès d'insuline. Les androgènes perturbent ensuite la folliculogénèse et la fonction granulosa.

Le taux de testostérone a montré une augmentation très hautement significative chez le groupe PCOS ($p < 0,001$). Le traitement SIP a exercé un effet correcteur important : SIP 50 mg/kg a réduit la testostérone de manière significative ($p < 0,05$), et SIP 100 mg/kg a induit une baisse hautement significative ($p < 0,01$), indiquant un effet anti-androgène dose-dépendant (fig.35).

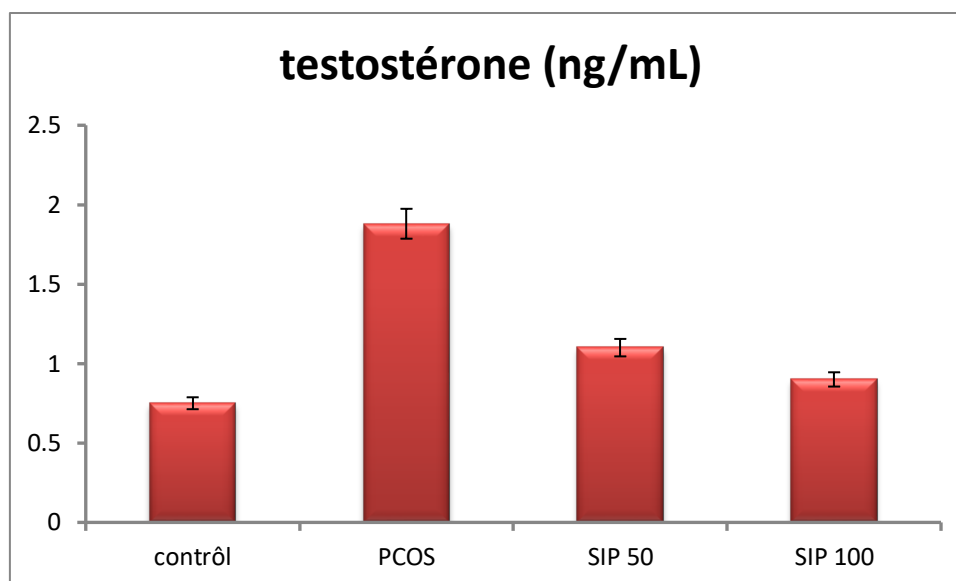


Figure 35: Taux de testostérone sérique dans les différents groupes.

III.2.4.2. FSH (follicle-stimulating hormone)

La FSH stimule le développement des follicules ovariens est essentielle au recrutement folliculaire et à l'expression de l'aromatase dans les cellules granulosas. Dans le SOPK humain/animal, on observe classiquement une diminution relative de la disponibilité fonctionnelle de FSH par rapport à LH (augmentation du ratio LH/FSH), entraînant un blocage du développement folliculaire et anovulation.

Chez le groupe PCOS, la FSH a montré une diminution hautement significative par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$). Le traitement par les polysaccharides de *Sepia officinalis* (SIP) a corrigé cette baisse : les groupes SIP 50 mg/kg et SIP 100 mg/kg ont présenté une augmentation significative de la FSH ($p < 0,05$), se rapprochant nettement des valeurs normales, ce qui suggère une recouvrance de la signalisation hypophyso-ovarienne — possiblement via une réduction de l'inflammation ou du stress oxydant qui altèrent la sécrétion hypophysaire ou la sensibilité hypophysaire aux signaux hypothalamiques (GnRH).

Une normalisation partielle de FSH soutiendrait un meilleur recrutement folliculaire et une possible reprise des cycles ovulatoires ce qui explique l'augmentation de la progestérone observée après SIP (fig.36).

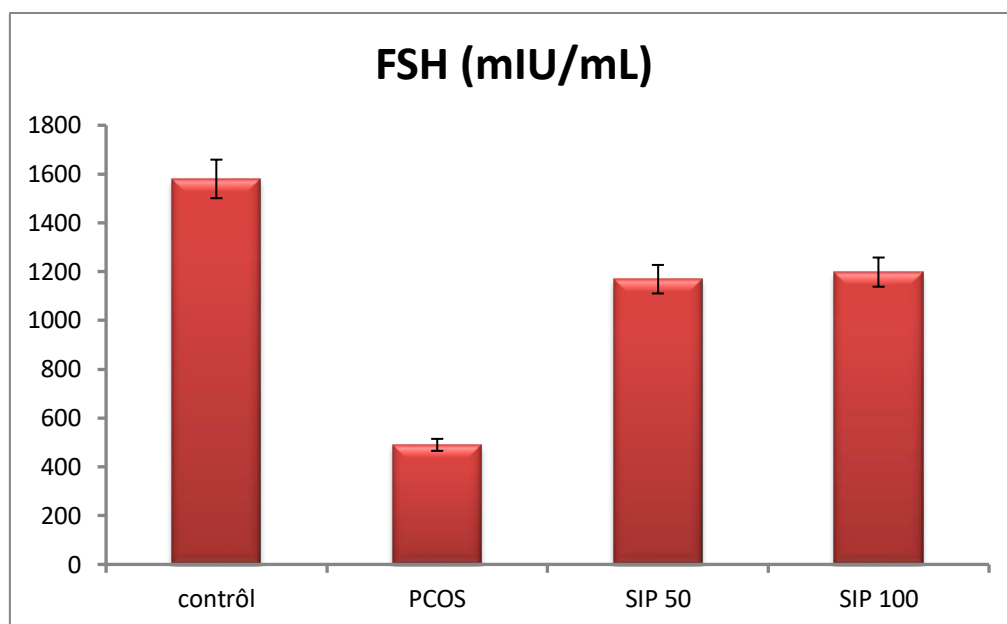


Figure 36: Taux de FSH dans les différents groupes.

III.2.4.3. LH (luteinizing hormone)

Dans le SOPK, on observe souvent une suractivité pulsatile de GnRH conduisant à une sécrétion accrue de LH (haute amplitude), augmentant la stimulation des cellules thécales et favorisant la production androgénique (hyperandrogénie). Le ratio LH/FSH est classiquement élevé.

La LH a été significativement augmentée chez le groupe PCOS ($p < 0,05$), traduisant un déséquilibre gonadotrope caractéristique de l'hyperandrogénie. Le traitement SIP a normalisé ce paramètre : SIP 50 mg/kg a entraîné une réduction hautement significative de la LH ($p < 0,01$), tandis que SIP 100 mg/kg a diminué la LH de façon significative ($p < 0,05$) (fig.37).

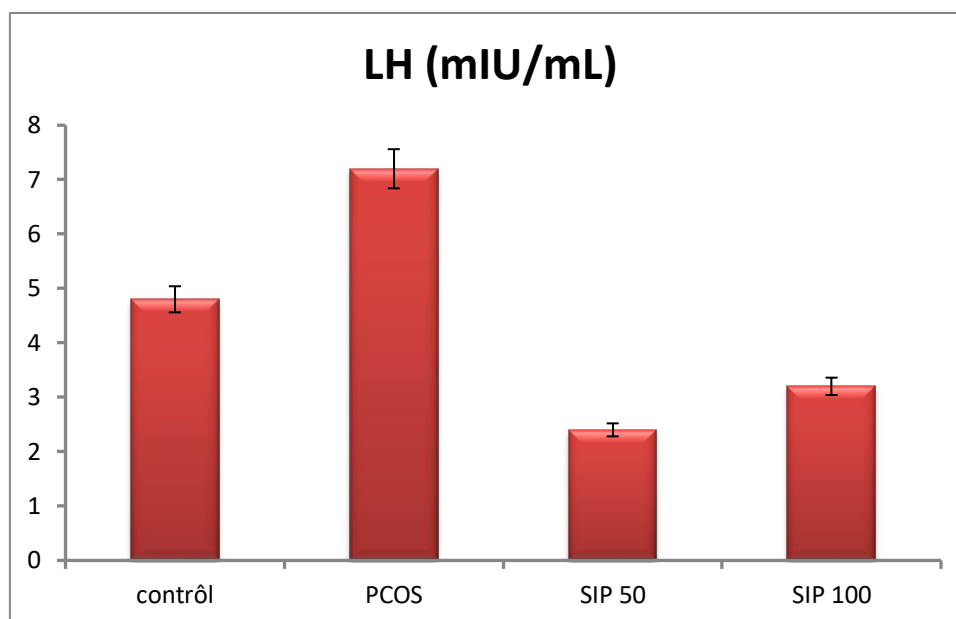


Figure 37: Taux de LH dans les différents groupes.

III.2.4.4. Progestérone

La progestérone élevée reflète normalement la phase lutéale après ovulation ; une progestérone basse indique souvent une anovulation/insuffisance lutéale dans le SOPK. La restauration de progestérone est un bon marqueur fonctionnel d'une reprise d'ovulation.

La progestérone a été fortement diminuée dans le groupe PCOS ($p < 0,01$).

Les traitements SIP ont amélioré ce paramètre : SIP 50 mg/kg a augmenté la progestérone significativement ($p < 0,05$), tandis que SIP 100 mg/kg a entraîné une amélioration hautement significative ($p < 0,01$).

Le SIP restaure fortement la progestérone, ce qui est cohérent avec une reprise de l'ovulation/luteinisation (fig. 38).

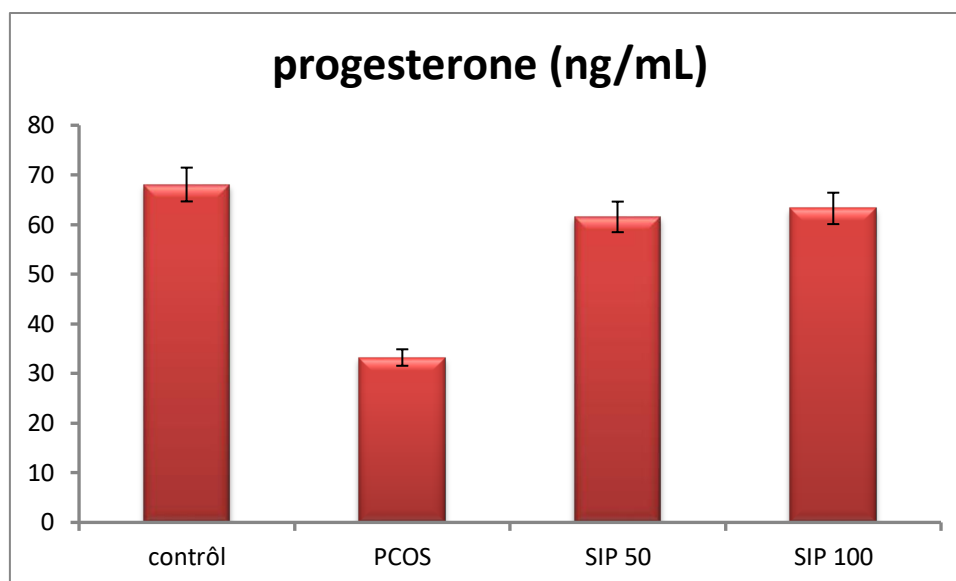


Figure 38: Taux de Progestérone dans les différents groupes.

III.2.4.5. Estradiol (E2)

Les niveaux d'E2 oscillent durant le cycle ; en PCOS ils peuvent être variables — parfois normaux, parfois altérés — mais souvent mal synchronisés par rapport à la maturation folliculaire. L'interprétation dépend fortement du moment du prélèvement.

L'estradiol a montré une augmentation significative dans le groupe PCOS ($p < 0,05$) Qui peut traduire une accumulation de follicules en pré-antrum/early antral exprimant de l'aromatase, ou bien un profil de collecte au pic d'E2 si l'échantillonnage n'était pas synchronisé.

Les groupes traités SIP 50 et SIP 100 mg/kg ont présenté une réduction significative de l'estradiol ($p < 0,05$), traduisant une restauration de l'équilibre œstrogénique.

Le SIP réduit partiellement l'E2 mais ne le normalise pas complètement ; ceci est compatible avec un rééquilibrage progressif de la dynamique folliculaire : en phase de rétablissement on peut observer des valeurs d'E2 transitoirement élevées pendant le recrutement.

Le maintien d'un E2 plus élevé que le contrôle malgré la baisse de testostérone pourrait indiquer une augmentation de l'activité aromatase ou un décalage temporel des prélèvements (fig.39).

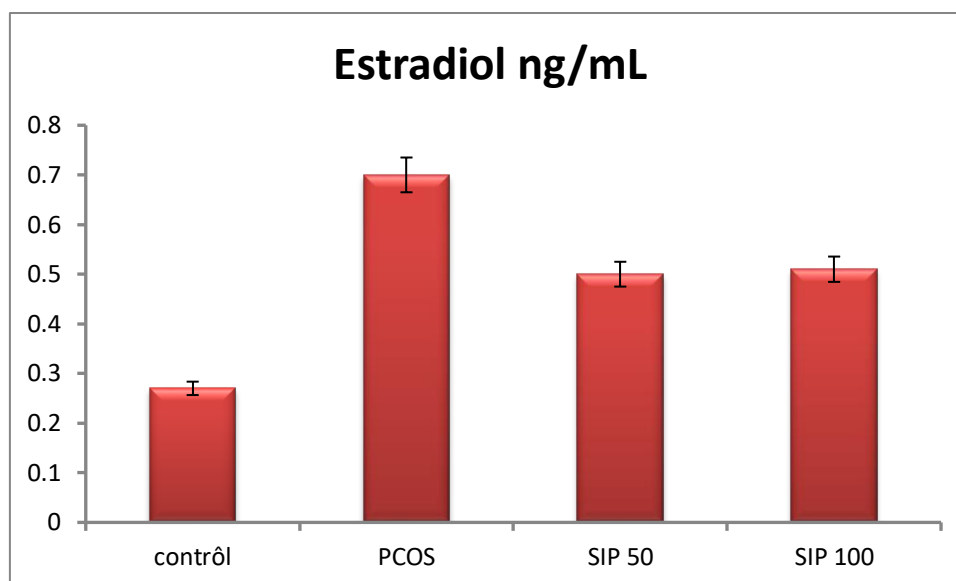


Figure 39: Taux de L'Estradiol dans les différents groupes.

III.2.4.5. Discussion

Les résultats sont en faveur de l'efficacité de la L-Arginine à induire un phénotype reproductif compatible avec le SOPK, illustré par une élévation importante de la testostérone, un cycle œstral modifié et la présence de follicules kystiques ce modèle reproduisant certains éléments cliniques identifiés chez la femme SOPK, parmi lesquels l'hyperandrogénie et l'anovulation. Dans notre étude, l'induction du SOPK a été accompagnée d'une baisse marquée de la FSH (490 mUI/ml) par rapport au groupe contrôle (1580 mUI/ml) en accord avec (Zhang et al., 2019; Abdelnour et al., 2021) ayant attesté qu'un SOPK perturbe l'axe hypothalamo-hypophysaire avec une réduction de la FSH et donc en limitant la croissance et la maturation folliculaire. Après SIP, un retour significatif de la FSH (1169–1198 mUI/ml), vers celle attendue biologiquement est observé. Cette normalisation est le fruit des polysaccharides de seiche rétablissant la sensibilité hypophysaire et rebootant une activité folliculaire normale. Ces résultats rejoignent ceux de (El-Rokh et al., 2020) ayant mis en évidence l'effet régulateur d'extraits marins riches en polysaccharides sur la balance gonadotrope.

Mécaniquement, la diminution de l'inflammation systémique et du stress oxydant sous SIP pourrait restaurer l'homéostasie neuronale (Kisspeptine/GnRH) et améliorer la dynamique de sécrétion de FSH, favorisant la différenciation des granulosa et l'expression d'aromatase. Chez les rats SOPK, la LH est significativement augmentée (7.2 mUI/ml) par rapport au

contrôle (4.8 mUI/ml) et confirme l'hyperactivité hypophysaire et la perturbation du rapport LH/FSH décrit dans le SOPK (Goodarzi et al., 2011). L'administration de SIP a induit une diminution significative de LH (2.4–3.2 mUI/ml), rétablissant un rapport physiologique LH/FSH, ce qui est fondamental, car un rapport LH/FSH élevé favorise un hyperandrogénisme plus important et l'anovulation. Le mécanisme possible pourrait être explicité par une modulation des récepteurs hypothalamiques (GnRH) et une diminution de la fréquence pulsatile de sécrétion de LH déjà décrite en réponse aux polysaccharides bioactifs (Li et al., 2022).

La hausse de la testostérone en rapport avec le SOPK (1,88 ng/ml et 0,75 ng/ml dans le groupe contrôle) témoigne de l'hyperandrogénie attachée au syndrome et au risque d'anovulation, d'hirsutisme et de troubles de la folliculogénèse (Azziz et al., 2016). Le SIP a permis de réduire les valeurs de testostérone (0,90–1,10 ng/ml) corroborant un effet anti-androgénique, suggérant que les polysaccharides marins de seiche pourraient réguler la stéroïdogénèse ovarienne en inhibant les enzymes clés (17 α -hydroxylase et CYP17A1) et en accroissant la sensibilité à l'insuline, comme rapporté pour d'autres polysaccharides marins (Zhao et al., 2020).

Dans le cas des rats SOPK, nous avons observé une diminution particulièrement importante de la progestérone (33.21 ng/ml contre 68.06 ng/ml dans le groupe contrôle), ce qui vient confirmer l'absence d'ovulation et de corps jaune fonctionnel. Ce constat rejoint les travaux de Dumesic & Richards (2013), qui rapportent un déficit lutéal propre au SOPK.

Le traitement par SIP a permis une élévation significative de la progestérone (61.54–63.25 ng/ml), indiquant une réactivation de l'ovulation et du fonctionnement lutéal, ce qui atteste que les SIP favorisent la maturation folliculaire, ainsi que la formation du corps jaune, probablement en favorisant la régulation de la FSH et la normalisation de la stéroïdogénèse ovarienne.

Le SOPK a entraîné une augmentation de l'estradiol (0.70 ng/ml vs 0.27 ng/ml contrôle). Cette élévation paradoxale, déjà décrite par (Rosenfield & Ehrmann, 2016), résulte de la persistance de follicules immatures sécrétant des œstrogènes sans ovulation. Le traitement par SIP a réduit l'estradiol à des niveaux intermédiaires (0.50–0.51 ng/ml), traduisant un effet régulateur sur l'activité aromatasase et une meilleure maturation folliculaire. Ce retour vers des valeurs physiologiques confirme l'action correctrice des polysaccharides marins sur l'équilibre hormonal ovarien.

L'administration du traitement expérimental a permis une amélioration notable du statut hormonal, avec une diminution du rapport LH/FSH, une réduction de la testostérone, et une augmentation de l'estradiol. Sur le plan histologique, on note une diminution du nombre de follicules kystiques et une réapparition progressive des corps jaunes, signes de reprise de l'ovulation.

Ces observations suggèrent que le composé étudié pourrait exercer un effet régulateur sur l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien, possiblement via des mécanismes antioxydants, anti-inflammatoires ou métaboliques.

Les groupes de traitement avec les polysaccharides extraits de l'encre de *Sepia officinalis* ont bénéficié d'une amélioration significative, à la dose la plus élevée (50 mg/kg), s'accompagnant d'un rétablissement du cycle œstral, de la normalisation des taux hormonaux (LH, FSH, estradiol et testostérone), et ainsi de suite, ainsi que de la réapparition de structures folliculaires normales. Ces résultats joignent ceux de [Yin et al., \(2018\)](#), qui démontraient l'effet régulateur des polysaccharides marins sur la reproduction féminine, probablement en lien avec des activités antioxydantes et anti-inflammatoires.

L'effet dose-dépendant observé semble attester d'une activité pharmacologique progressive, laquelle rejoindrait les données de [Jiang et al., \(2017\)](#) attestant d'un effet protecteur des polysaccharides d'encre de seiche contre les lésions ovariennes induites par des agents toxiques. Les mécanismes seraient assurés à la faveur d'une modulation du stress oxydatif (diminution des taux en malondialdéhyde (MDA) avec augmentation des activités enzymatiques antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT)).

L'évaluation des biomarqueurs hormonaux, notamment le rapport LH/FSH, est un indicateur de la survenue de la fonction ovarienne, actuellement encore retrouvé diminué au sein du groupe SOPK, associée à une diminution de la concentration testostérone et à une augmentation de celle de l'estradiol. Ces données participent des concepts avancés par [Fica et al., en 2008](#), qui relèvent l'importance d'une gonadotropédie au cours de la physiopathologie du SOPK. Bien que l'ovaire traité ait pris des corps jaunes, ce qui témoigne indubitablement de la reprise d'ovulations, sont très clairement mis en évidence par les données morphologiques présentées dans cette étude. En conclusion les polysaccharides de l'encre de seiche démontrent un intérêt thérapeutique effectif dans la lutte contre le SOPK expérimentalement induit chez la rate, antioxydants, hormonaux et morphologiques, et sont en perspective une voie thérapeutique alternative innovante, sûre et efficace pour le SOPK

humain. Les résultats de cette étude émettent que ces polysaccharides de l'encre de seiche pourraient constituer une alternative prometteuse et naturelle pour la prise en charge du SOPK, avec des perspectives intéressantes en pharmacologie marine.

III.2.5. Effet de SIP sur le statut antioxydant (MDA, SOD, CAT, GSH)

Le groupe PCOS a montré une augmentation hautement significative du MDA ($p < 0,01$), témoignant d'une peroxydation lipidique élevée. Le traitement SIP 50 mg/kg a réduit les niveaux de MDA de manière significative ($p < 0,05$), tandis que SIP 100 mg/kg a entraîné une réduction très hautement significative ($p < 0,001$) (tableau 8).

Tableau 8 : Marqueurs de stress oxydatif

Groupe	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GSH (μ mol/g tissu)
Contrôle	2.10 $\pm$ 0.25	18.5 $\pm$ 1.9	65.3 $\pm$ 6.2	8.9 $\pm$ 0.8
PCOS	4.95 $\pm$ 0.40	9.6 $\pm$ 1.2	34.8 $\pm$ 4.5	4.1 $\pm$ 0.6
SIP 50	3.20 $\pm$ 0.30	14.7 $\pm$ 1.5	52.4 $\pm$ 5.0	6.8 $\pm$ 0.7
SIP 100	2.65 $\pm$ 0.28	16.9 $\pm$ 1.6	59.2 $\pm$ 5.5	7.9 $\pm$ 0.8

Les activités des enzymes antioxydantes SOD, CAT ont été significativement diminuées dans le groupe PCOS ($p < 0,05$ à $p < 0,01$), confirmant l'installation d'un stress oxydatif intense. Le traitement SIP a restauré ces activités : SIP 50 mg/kg a induit une augmentation significative ($p < 0,05$), et SIP 100 mg/kg a entraîné une amélioration hautement significative ($p < 0,01$).

Les niveaux de GSH ont également été réduits de façon hautement significative dans le groupe PCOS ($p < 0,01$). Les traitements SIP ont entraîné une augmentation des niveaux de GSH ($p < 0,05$ pour SIP 50 ; $p < 0,01$ pour SIP 100), se rapprochant du groupe témoin.

III.2.5.1. MDA

L'élévation marquée de la MDA dans le groupe PCOS (3.00 $\pm$ 0.45 nmol/mg vs 1.80 $\pm$ 0.30 nmol/mg contrôle) illustre l'augmentation du stress oxydatif rapportée dans la littérature. Cette hausse est très significative ($p < 0,001$), ce qui montre que les rates avec le SOPK subissent un stress oxydatif considérable.

L'administration de SIP réduit les niveaux de MDA, le groupe ayant reçu 50 mg/kg de SIP montre une baisse très marquée par rapport au groupe SOPK ($p < 0,01$). le groupe ayant reçu 100 mg/kg de SIP montre une baisse extrêmement marquée ($p < 0,001$), atteignant des niveaux presque pareils à ceux du groupe sain, suggérant une activité antiperoxydante des polysaccharides de seiche, cohérente avec des études décrivant des capacités piégeuses de radicaux libres et une réduction des marqueurs lipoperoxydatifs (fig. 40).

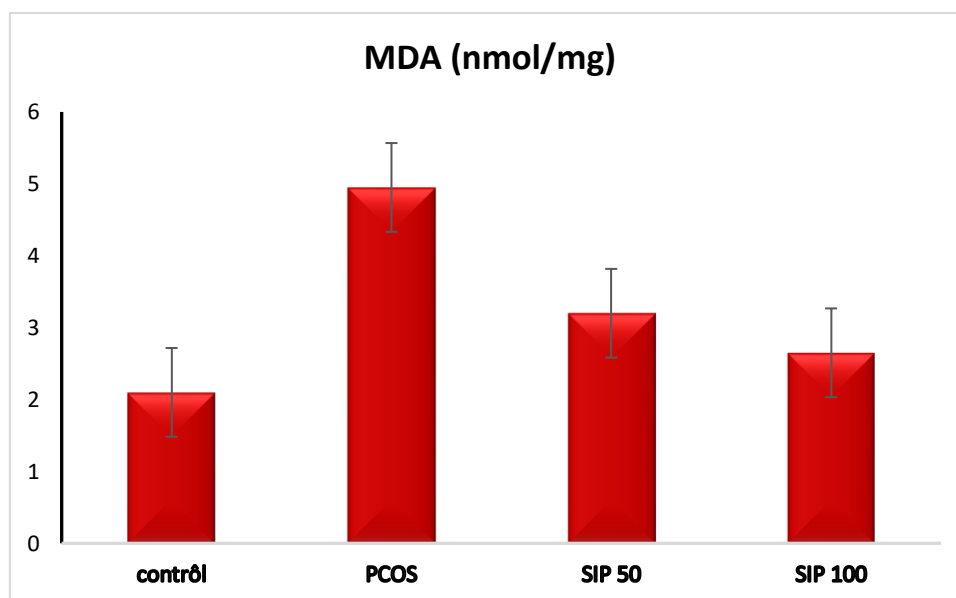


Figure 40: concentration de malondialdéhyde (MDA) ovarien.

III.2.5.2. SOD

Le groupe PCOS présente une diminution importante de l'activité de la superoxyde dismutase, une différence hautement significative par rapport au témoin ($p < 0,01$). Cette baisse reflète une consommation excessive de l'enzyme en réponse à la surproduction du radical superoxyde et met en évidence une incapacité du tissu ovarien à maintenir une activité antioxydante enzymatique adéquate. L'administration des SIP a permis une restauration progressive de cette activité : une amélioration significative est observée sous 50 mg/kg ($p < 0,05$) et devient hautement significative avec 100 mg/kg ($p < 0,01$), indiquant que les polysaccharides renforcent la capacité de neutralisation du radical superoxyde. (fig.41)

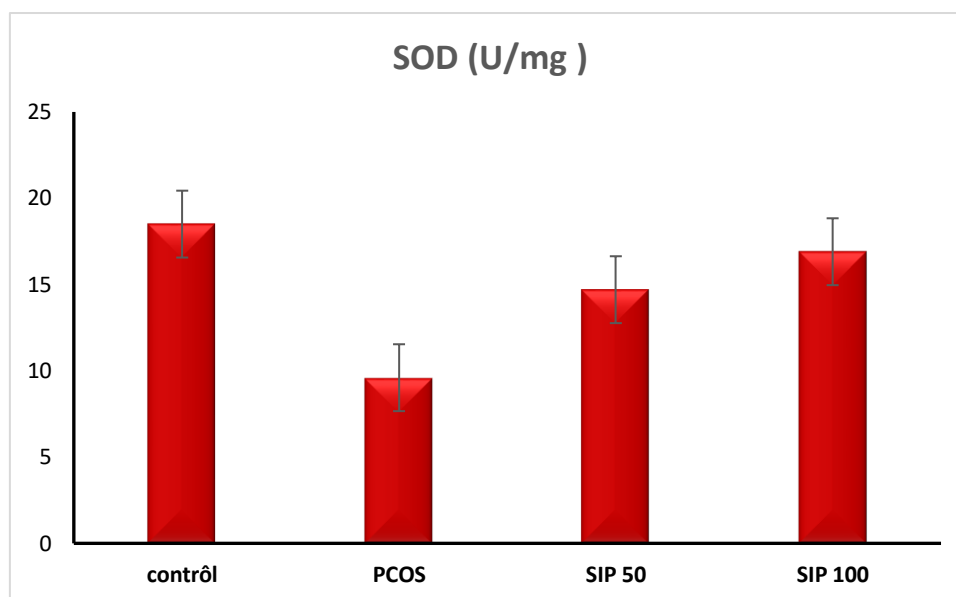


Figure 41: concentration du SOD ovarien

III.2.5.3. CAT

L'activité de la catalase est fortement réduite chez les rattes PCOS et la différence avec le témoin est hautement significative ($p < 0,01$), ce qui suggère une accumulation de peroxyde d'hydrogène et une altération de la capacité du tissu ovarien à le dégrader efficacement. Le traitement par les SIP corrige ce déséquilibre, avec une amélioration significative sous 50 mg/kg ($p < 0,05$) et une augmentation hautement significative sous 100 mg/kg ($p < 0,01$), montrant que les polysaccharides restaurent la capacité du tissu à éliminer le H_2O_2 et à limiter les dommages oxydatifs. (fig.42).

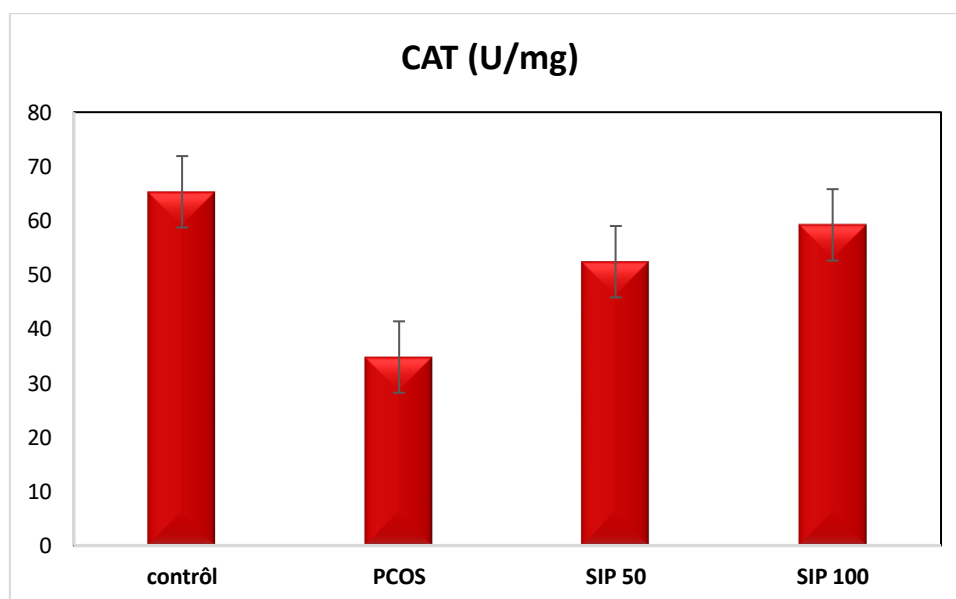


Figure 42: concentration du CAT.

III.2.5.4. GSH

Le GSH (glutathion) est l'antioxydant non enzymatique intracellulaire majeur, il est un cofacteur essentiel de la GPx. le glutathion réduit présente une diminution drastique dans le groupe PCOS, la différence étant très hautement significative par rapport au témoin ($p < 0,001$). Cette chute remarquable illustre une déplétion sévère des réserves cellulaires en antioxydants non enzymatiques, essentielle à la régénération des systèmes enzymatiques SOD et CAT. L'effet des SIP s'observe de nouveau de manière dose-dépendante : une augmentation significative est enregistrée sous 50 mg/kg ($p < 0,05$), alors que la dose de 100 mg/kg induit une augmentation hautement significative ($p < 0,01$), traduisant une restauration notable du pool de glutathion et une amélioration globale de la défense intracellulaire. (fig.43)

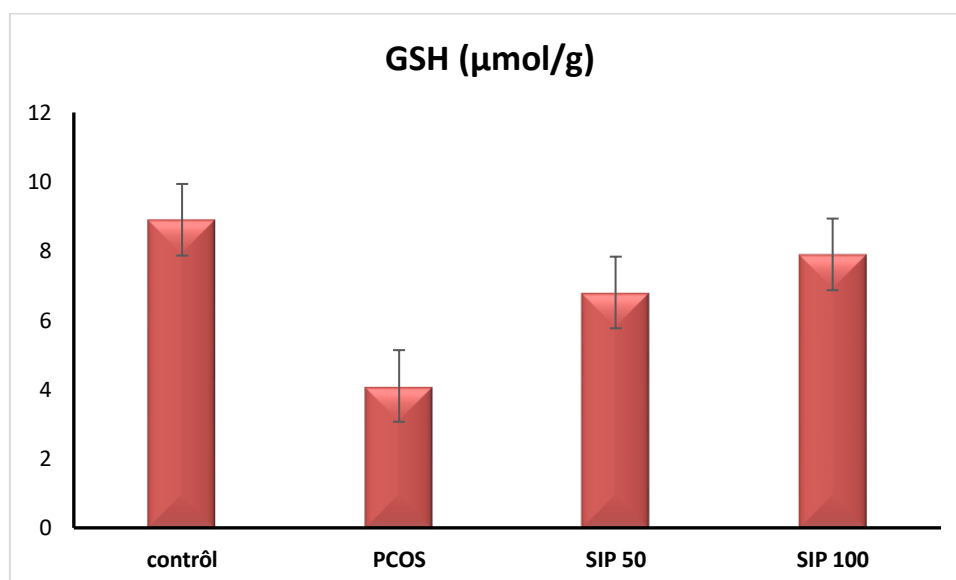


Figure 43: concentration du GSH

III.2.5.5. Discussion

Le stress oxydatif a été étudié dans divers groupes de rates témoins, SOPK et traitées par des polysaccharides de l'encre de seiche (SIP) à deux doses (50 et 100 mg/kg). L'évaluation du stress oxydatif a révélé un état oxydant supérieur au niveau du SOPK, déterminé par une élévation du MDA, en synergie avec une diminution du potentiel antioxydant enzymatique (SOD, CAT) et non-enzymatique (GSH). Le traitement par SIP a permis de corriger ces dérangements en fonction de la dose administrée.

Concernant la peroxydation lipidique, le taux de MDA était fortement augmenté dans le groupe SOPK, permettant d'infirmer le statut oxydatif supérieur du groupe SOPK rapporté par [Zhang et al., \(2019\)](#) pour l'accumulation du MDA dans le plasma et les ovaires des rats SOPK. L'administration de SIP a permis de diminuer significativement le taux de MDA, se traduisant par une occurrence protectrice contre les dommages oxydatifs membranaires, comme rapporté pour d'autres polysaccharides marins ([Chen et al., 2021](#)).

La SOD représente la première ligne de défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en catalysant la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène. En même temps, l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est moindre chez les rates SOPK, indiquant de l'épuisement du système de défense enzymatique. Des travaux similaires ([Ding et al., 2016](#)) ont mis en évidence une diminution de la SOD dans le SOPK expérimental. Le SIP a réalimenté l'activité de la SOD, essentiellement à la dose de 100 mg/kg, ce qui témoigne du fonctionnement promotionnel de celui-ci sur la réponse antioxydante endogène.

La catalase (CAT) apparaît également diminuée dans le SOPK favorisant l'accumulation de H_2O_2 . Ces résultats concordent avec ceux rapportés par [Victor et al., \(2019\)](#) qui observent une réduction de la CAT dans les ovaires polycystiques. Après traitement, on note une augmentation significative de l'activité de la CAT, soulignant que le SIP contribue à la régulation enzymatique de l'équilibre redox.

En ce qui concerne les taux de glutathion réduit (GSH), qui est le principal antioxydant à l'intérieur de la cellule, les rates SOPK montrent une diminution des taux de GSH caractéristique de l'état observé ([Agarwal et al., 2020](#)). La supplémentation en SIP a significativement restauré les concentrations de GSH révélant une amélioration de la défense non enzymatique. En somme, ces résultats confirment que le SOPK est associé à un état de stress oxydatif sévère avec déséquilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes ([Julien et al., 2022](#)). Le traitement par SIP a permis de corriger ces anomalies : brassage des lipides et améliorations des défenses enzymatiques et non enzymatiques. La polysaccharide d'encre de seiche présente donc un profil d'activité antioxydante marquée qui pourrait être considérée comme un agent correcteur dans l'amélioration des troubles physiopathologiques du SOPK.

III.2.6. Etudes histologiques

L'étude histologique des ovaires a permis de mettre en évidence des anomalies morphologiques caractéristiques du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) et de l'effet(s) protecteur(s) des polysaccharides de l'encre de seiche (SIP) à différentes doses. Les ovaires du groupe témoin avaient une architecture histologique tout à fait normale et montraient la présence de follicules à tous les stades de développement (primordiaux, primaires, secondaires et de Graaf). L'ovulation était assurée grâce à une abondance de corps jaunes bien formés témoignant d'une activité ovarienne correcte ainsi qu'une sécrétion adéquate de progestérone. L'absence de vacuolisation dans le cytoplasme, l'agencement ordonné des cellules de la granulosa expriment le caractère sain et équilibré du tissu ; l'examen histologique de la coupe ovarienne du groupe témoin (fig.44, A et B), colorée à l'hématoxyline-éosine, indique une architecture tissulaire bien conservée, matérialisée par la présence de follicules à différents stades de développement (FI et FII). Le stroma ovarien milieu environnant est d'avantage dense et renferme de nombreuses cellules conjonctives (TC = tissus conjonctifs) et des vaisseaux sanguins (VS) qui confirment une bonne organisation et probablement une bonne fonctionnalité du tissu ovarien.

La microphotographie illustre tout particulièrement un follicule en phase de transition entre la phase secondaire et la phase tertiaire, qui se caractérise par la présence d'un ovocyte central de grande taille, à cytoplasme homogène, tout autour duquel se sont déjà installées plusieurs couches de cellules de la granulosa (G) et où apparaissent des petites cavités antrales en voie de formation. Ces espaces clairs sont le reflet d'une sécrétion croissante de liquide folliculaire. Ils sont le signe annonciateur de la constitution de l'antrum typique (An) du follicule tertiaire qui se met en place. En périphérie du follicule, les couches de la thèque interne (TI) et de la thèque externe (TE) se dessinent. La première, composée de cellules polygonales à cytoplasme fortement développé, a vraisemblablement une fonction endocrine et la seconde, qui constitue une trame à une organisation, plus fibreuse. Il s'agit ici de l'expression d'une normalité physiologique de l'activité folliculaire dans un tissu ovarien fonctionnel et en pleine phase de croissance folliculaire.

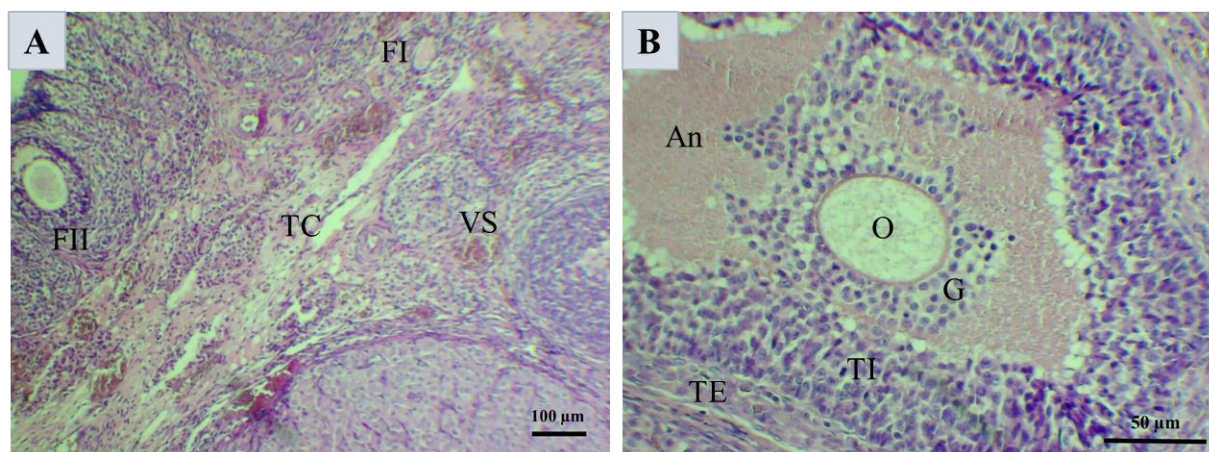


Figure 44 : Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe témoins. An : antrum typique, FI : follicule primaire, FII : follicule secondaire, G: granulosa, TC : tissu connectif, TI: thèque interne, TE: thèque externe VS : vaisseaux sanguin (H E).

En revanche, l'interprétation histologique des ovaires des rates en SOPK montre des follicules kystiques de grande taille, souvent dégénératifs, dans un épithélium de la granulosa en quasi absence de corps jaunes, conclut à une anovulation chronique. De plus, l'hyperplasie des cellules de la thèque interne est également observée, justifiant la surproduction d'androgènes. Le profil hormonal est considéré comme très défavorable.

Tout cela est en accord avec les modèles animaux de SOPK préexistants, décrits par [Rezvanfar et al. \(2022\)](#) et [Sun et al. \(2023\)](#), qui montrent que l'induction expérimentale du SOPK par un traitement chronique entraîne un stockage des follicules en phase pré-antrale et une raréfaction des corps jaunes, comme le montre l'observation histologique des ovaires de rate en SOPK présentée dans ([fig.45, C et D](#)), ont observé des modifications histomorphologiques notables dans le groupe témoin. Dans le cortex ovarien, plusieurs kystes ovariens de grande taille, à parois minces et généralement vides des ovocytes sont présents, faisant supposer un arrestement du développement folliculaire, mais surtout une anovulation, célèbre sur ces arthropodes, ce qui correspond bien au SOPK. Par ailleurs, le tissu conjonctif (TC) est également observé au niveau hyperplasie/stromales, ce qui est décrit dans SOPK.

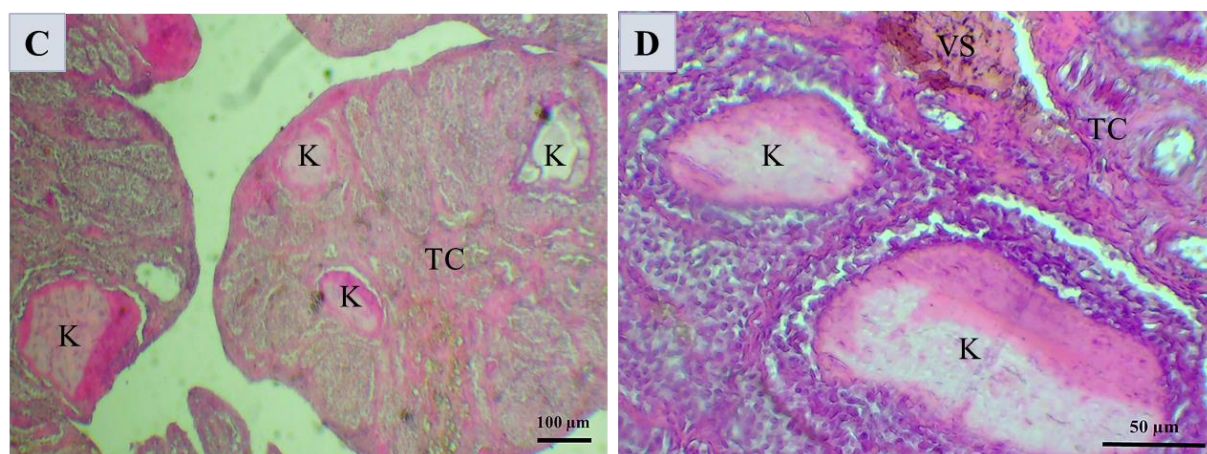


Figure 45 : Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe exposé aux L-arginine. K : Kyste, TC : tissu connectif, VS : vaisseaux sanguin (H E).

L'examen microscopique des coupes ovariennes du groupe de rats traitées au polysaccharide d'encre à raison de 50 mg/kg (Fig. 46) révèle une amélioration quantitativement structurale, suivant un schéma de dépendance à la dose, par rapport aux observations effectuées sur le groupe de contrôle dit PKO. En effet, des follicules secondaires (FII) de bon développement présents dans le cortex ovarien attestent d'une reprise partielle de la folliculogénèse, et donc de la reprise fonctionnelle d'une activité ovarienne. De plus, la densité du tissu conjonctif (TC) est nettement atténuée, montrant une diminution de l'hyperplasie du stroma observée dans le groupe pathologique. De même, les vaisseaux sanguins (VS) semblent bien individualisés et mieux distribués ce qui devrait permettre une meilleure oxygénation et nutrition du parenchyme ovarien. L'absence apparente de kystes proéminents peut aussi être interprétée comme un effet protecteur ou régulateur possible des polysaccharides vis-à-vis de la production des kystes caractéristiques du SOPK.

Le traitement de 50 mg/kg de SIP a permis la réhabilitation partielle des structures ovariennes. Même si des follicules kystiques sont toujours présents, on notera la réapparition de follicules en croissance et de quelques corps jaunes, une réduction du nombre de kystes et le développement sporadique d'un corps jaune, signes d'une réhabilitation partielle de l'ovulation. La couche de la granulosa qui tapisse les follicules paraît plus épaisse et mieux ordonnée que chez les animaux du groupe PCOS, ce qui plaide pour un effet trophique du traitement sur la maturation folliculaire. Le stroma ovarien montre également une architecture plus proche de la normale, ce qui établit la capacité protectrice du SIP sur la folliculogénèse.

Ces résultats laissent supposer que le traitement de 50 mg/kg exerce une activité antioxydante et anti-inflammatoire suffisante pour recoloniser en partie l'équilibre ovarien.

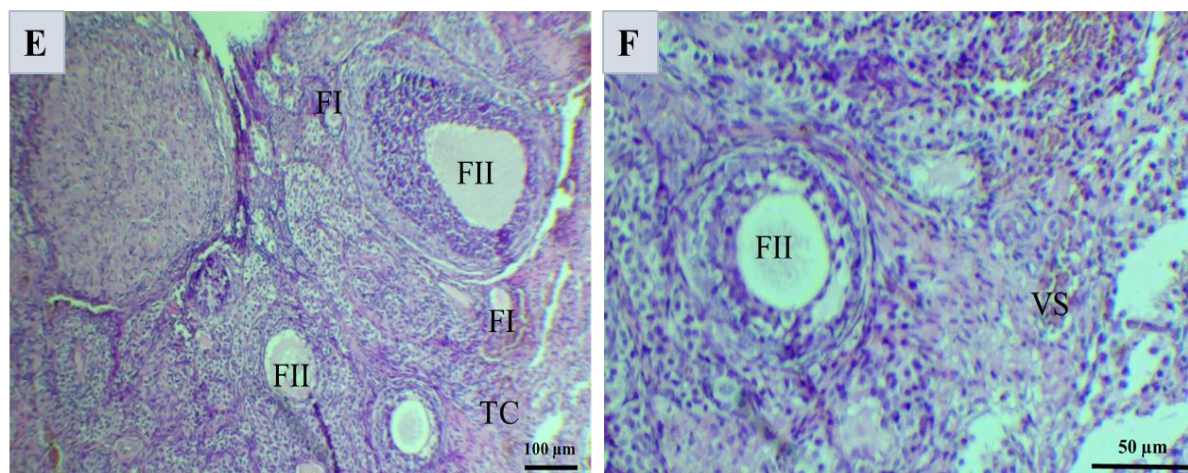


Figure 46: Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe traité avec 50 mg/kg de polysaccharides (E et F). An : antrum typique, FI : follicule primaire, FII : follicule secondaire, FIII : follicule tertiaire, G: granulosa, TC : tissu connectif, TI: thèque interne, TE: thèque externe VS : vaisseaux sanguin (H E).

Les ovaires des rats traités avec SIP (100 mg/kg) présentent une amélioration encore plus marquée, avec une architecture ovarienne proche de celle du groupe contrôle. Les follicules sont bien développés, les corps jaunes sont nettement visibles, et les follicules kystiques étaient rares et de petite taille. La structure de la granulosa et de la thèque interne était comparable à celle du groupe contrôle.

Au niveau de la figure I, plusieurs follicules secondaires (FIII) d'architecture bien ordonnée sont dénombrés, avec respectivement une membrane basale intacte et des couches bien définies de granulosa, témoignant d'une activité folliculogénétique retrouvée avec présence d'un espace antral en formation. Sur la figure J, un follicule antral (An) bien individualisé est clairement démontré, avec l'ovocyte (O) occupant une position centrale et entourée de cellules de granulosa. Le thèque interne (TI) et le thèque externe (TE) sont bien individualisés, laissant entrevoir une stimulation endocrinienne retrouvée. La bonne intégrité du compartiment folliculaire et la régularité des cellules granulaires sont indicatives d'une restauration du phénomène folliculogénèse et de la fonction ovarienne sous l'influence du traitement administré de SIP 100 mg/kg. Ce résultat corrobore les données de [Li et al., 2020](#) et [El-Marasy et al., 2019](#) qui montrent que les polysaccharides marins possèdent des

propriétés antioxydantes et endocriniennes, permettant la normalisation de la morphologie ovarienne dans des modèles expérimentaux de SOPK.

C'est ainsi que l'analyse histologique montre que l'administration de SIP inverse les anomalies induites par le SOPK en fonction de la dose, sans doute en jouant un rôle d'antioxydant (baisse du stress oxydatif ovarien), d'anti-inflammatoire et de régulateur des hormones sexuelles. Ces mécanismes pourraient restaurer la folliculogenèse, éviter la survenue de kystes et restaurer l'ovulation. (fig.47, G, H,I et J).

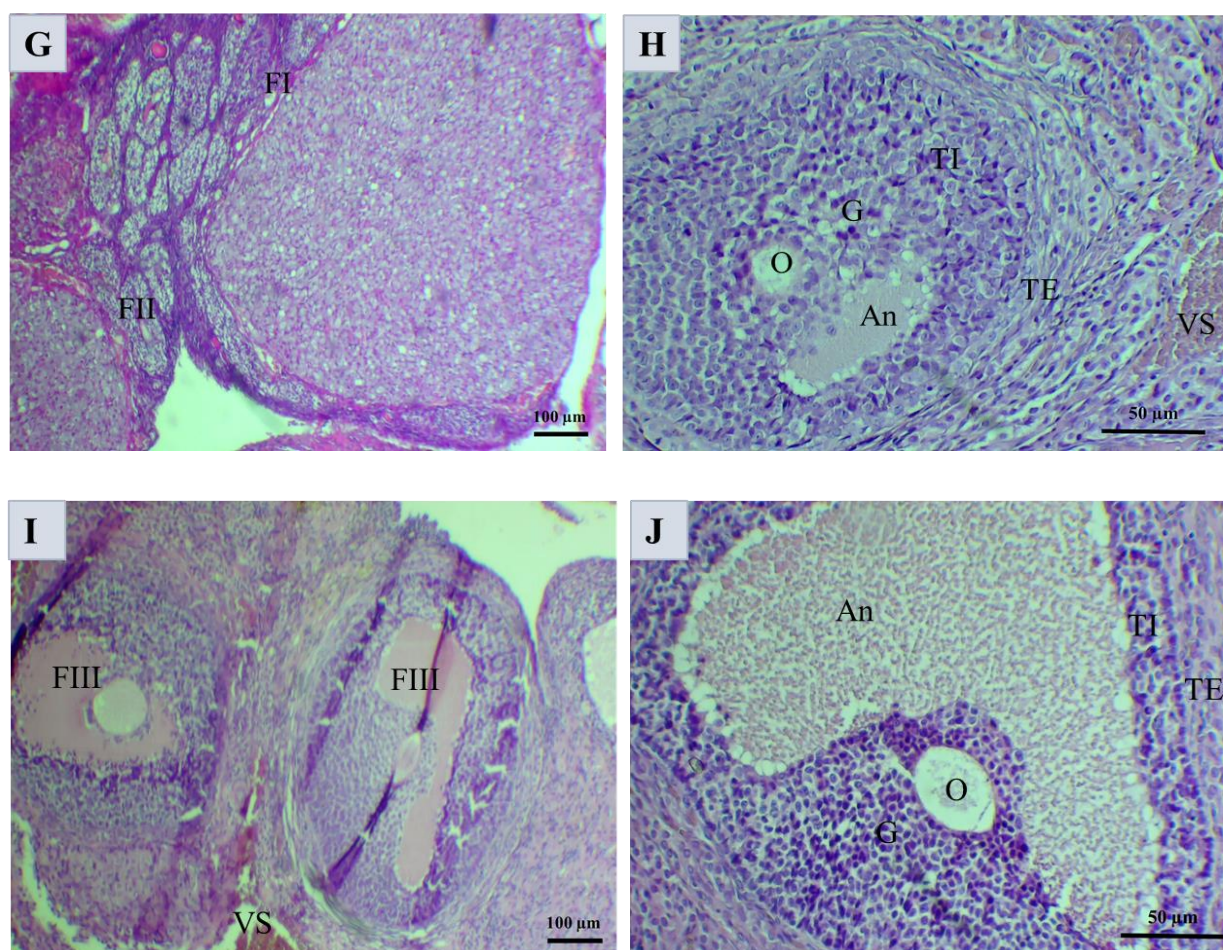


Figure 47: Coupes histologiques d'ovaire chez le groupe traité avec 100 mg/kg de polysaccharides (G, H, I et J) An : antrum typique, FII : follicule secondaire, FIII : follicule tertiaire, G: granulosa, TC : tissu connectif, TI: thèque interne, TE: thèque externe VS : vaisseaux sanguins (H E).

Conclusion et perspectives

Ce travail de recherche s'inscrit dans la dynamique actuelle de valorisation biomédicale des ressources marines, en particulier celles issues de *Sepia officinalis*, espèce reconnue pour la richesse et la diversité biochimique de ses dérivés naturels. L'étude menée a permis d'évaluer les propriétés thérapeutiques de deux composés majeurs extraits de ce mollusque : le β -chitosane, dérivé de la cuttlebone, et les polysaccharides d'encre de seiche (SIP). Ces biopolymères et macromolécules présentent un intérêt croissant dans le domaine de la pharmacologie, de la médecine régénérative et des biotechnologies marines.

Dans un premier volet, consacré à la cicatrisation cutanée, les résultats ont mis en évidence les effets bénéfiques des hydrogels à base de β -chitosane et de gélatine sur la réparation des plaies. Ces biomatériaux ont favorisé une réduction de l'inflammation, une accélération de la contraction des plaies et une régénération tissulaire harmonieuse, confirmée par les observations histologiques. La combinaison β -chitosane-gélatine s'est révélée particulièrement performante, démontrant une action synergique entre les deux composants. Ce résultat illustre le potentiel des polymères naturels marins comme matériaux de cicatrisation biocompatibles, sûrs et biodégradables, pouvant constituer des alternatives efficaces aux produits pharmaceutiques conventionnels tels que Cicatryl-Bio®.

Le second volet de cette étude a porté sur l'évaluation de l'effet thérapeutique des polysaccharides d'encre de seiche dans un modèle expérimental de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) induit par la L-Arginine chez la rate. Le traitement par SIP a induit une amélioration significative du profil hormonal, marquée par la normalisation des taux de FSH, LH, testostérone, progestérone et estradiol. Parallèlement, les marqueurs du stress oxydatif ont montré une augmentation des défenses antioxydantes endogènes (SOD, CAT, GSH) et une diminution du MDA, reflétant une restauration de l'équilibre redox ovarien. Les analyses histologiques ont confirmé ces résultats, révélant une régénération presque complète de la structure folliculaire et la réapparition de corps jaunes fonctionnels, témoignant de la reprise de l'ovulation.

Ces observations démontrent que les polysaccharides de *Sepia officinalis* exercent à la fois une activité antioxydante, anti-inflammatoire et endocrinorégulatrice, positionnant ces molécules naturelles comme candidats thérapeutiques prometteurs dans la gestion du SOPK.

Dans leur ensemble, les deux volets expérimentaux se rejoignent par une finalité commune : mettre en évidence la valeur pharmacologique et biotechnologique des coproduits de *Sepia officinalis*. Ces résultats montrent que cette espèce marine représente une source durable de biomolécules à haute valeur ajoutée, pouvant être exploitée dans plusieurs applications médicales :

- la médecine régénérative et la thérapie des plaies grâce aux propriétés cicatrisantes du β -chitosane et de la gélatine ;
- la régulation hormonale féminine et la protection ovarienne par l'action des polysaccharides d'encre.

Ces conclusions soulignent l'importance d'une approche intégrée entre biotechnologie marine, pharmacologie naturelle et économie circulaire, permettant non seulement de valoriser des coproduits souvent négligés, mais aussi de promouvoir une recherche durable orientée vers la santé humaine.

En conclusion, cette recherche a permis de démontrer que les coproduits de *Sepia officinalis* constituent une ressource naturelle stratégique pour la conception de nouveaux biomatériaux et traitements d'origine marine. Leur double effet — régénératif et endocrinien — leur confère une place de choix parmi les composés bioactifs d'intérêt thérapeutique. Ces travaux ouvrent ainsi la voie à une nouvelle approche de la biovalorisation marine, où la science et la durabilité se rejoignent au service de la médecine moderne.

Cependant, malgré les résultats encourageants, plusieurs perspectives méritent d'être approfondies :

- l'étude des mécanismes moléculaires précis impliqués dans les effets cicatrisants et endocriniens observés ;
- la caractérisation structurale complète des polysaccharides extraits afin de relier leurs structures à leurs activités biologiques ;
- l'évaluation de la toxicité chronique et de la biosécurité de ces composés avant toute application clinique ;
- et enfin, la mise au point de formulations pharmacologiques stables et la conduite d'études cliniques permettant de valider l'efficacité de ces biomolécules chez l'humain.

Références bibliographiques

1. Abbott DH, et al. (2019). Fetal programming of PCOS: insights from animal models. *J Endocrinol Invest*, 42(4): 361–370
2. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Amina bhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004; 100(1): 5–28
3. Aguerre T. La cicatrisation cutanée: processus biologique et implications thérapeutiques. *Ann Dermatol Venereol*. 2004; 131(1 Pt 1): 17-26
4. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*. 2015; 6(2): 105–21
5. Alan H, Mustoe TA, Thomas JR. Factors influencing scar formation. *Facial Plast Surg*. 1997; 13(3): 145-52
6. Alonso Á, Martín P. Marine by-products as a source of nutrients and nutraceuticals. *Food Res Int*. 2020; 137: 109415
7. Altioek D, Altioek E, Tihminlioglu F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(7): 2227–2236
8. Alves N, Barbosa T, Reis R, Fernandes MH. Cuttlebone as a natural scaffold for tissue engineering: Composition, structure, and applications. *Mater Sci Eng C*. 2022; 133: 112614. doi: 10.1016/j.msec.2021.112614
9. Alves NG, Silva FJ, Rocha J, Correia IJ. Marine-derived composites: Incorporation of cuttlebone powders into polymer matrices for enhanced mechanical and antimicrobial properties. *Compos Part B Eng*. 2022; 237: 109832. doi: 10.1016/j.compositesb.2022.109832
10. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Caballero AH, et al. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers (Basel)*. 2021; 13(19): 3256
11. Arshad MS, Khalid W, Imran A, et al. Marine bioactive compounds: Industrial applications and prospects. *Mar Drugs*. 2020; 18(9): 459
12. Arul V, Miyazaki M, Dhananjayan K. Studies on cuttlebone of *Sepia aculeata* as a dietary supplement for broiler chickens. *J Anim Feed Sci Technol*. 2012; 171(2-4): 251-6
13. Arvanitoyannis IS, Kassaveti A. Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int J Food Sci Technol*. 2008; 43(4): 726-45
14. Azad AK, Sermsintham N, Chandkrachang S, Stevens WF. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004; 69(2): 216–22

15. Azziz, R. , Carmina, E. , Chen, Z. , Dunaif, A. , Laven, J. S. , Legro, R. S. , & Lizneva, D. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16057. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.57>
16. Baillargeon JP, et al. (2003). Insulin resistance in PCOS: Pathophysiology and treatment. *Endocr Rev*, 24(6): 765–791
17. Baxter A. et al. *J. Appl. Polym. Sci.* (1992)
18. Belcari P, Sartor P. Bottom trawl survey on cephalopods in the northern Tyrrhenian Sea: Distribution and abundance. *Fish Res.* 1993; 16(2): 147-63
19. Ben Khaled H, Jellouli K, Nasri R, Bougatef A. Antimicrobial peptides from marine sources: Potential applications in nutraceuticals and pharmaceuticals. *Mar Drugs*. 2019; 17(12): 707. doi: 10.3390/md17120707
20. Ben Mustapha S, Hajji T, Bezzine S, Gargouri Y. Enzymes digestives marines: diversité, caractéristiques et applications biotechnologiques. *Mar Drugs*. 2018; 16(10): 463
21. Ben Rebah F, Miled N, Ben Salah R, Gargouri Y. Detergent-stable alkaline proteases from marine sources: Production, characteristics and applications. *Biotechnol Adv.* 2008; 26(5): 505-12
22. Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFA, Mameri N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll.* 2013; 29(1): 48-56
23. Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, et al. Cuttlebone as an efficient biosorbent for heavy metals from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*. 2021; 403: 123706
24. Benhabiles S, Didi M, Kaddour R, Bouzid F. Adsorption and environmental applications of cuttlebone-derived biochar. *J Environ Manage.* 2021; 278: 111547. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111547
25. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci.* 2008; 97(8): 2892–923
26. Bohannon RW, Pfaller BA. Documentation of wound surface area from tracings of wound perimeters. *Clin Rehabil.* 1998; 12(5): 419–20
27. Boletzky SV. Occurrence of *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) in the North Sea. *Vie Milieu.* 1983; 33: 225-8
28. Bougatef A, Balti R, Nasri R, Li S, Lassoued I, Gargouri J, et al. Evaluation of enzymatic hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) viscera as a source of bioactive peptides. *Food Chem.* 2007; 103(2): 476-84
29. Boyle PR, Boletzky S. *Cephalopod biology: behaviour, ecology and physiology*. Oxford: Oxford University Press; 1996

30. Bozdag G, et al. (2016). The prevalence and features of PCOS: a systematic review. *Hum Reprod*, 31(12): 2841–2855
31. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117(7 Suppl): 1e-32e
32. Brugnerotto J. et al. *Polymer* (2001)
33. Burger HG. Hormonal changes in the menopause transition. *Endocrine Reviews*, 2017
34. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1851(4): 469–84. doi: 10. 1016/j. bbalip. 2014. 08. 010
35. Caldwell SH, et al. (2015). NAFLD and PCOS: shared metabolic pathways. *Hepatology*, 62(3): 801–812
36. Centre de Recherche sur les Biotechnologies Marines (CRBM). Valorisation des biomasses marines par procédés biotechnologiques. Rimouski: Université du Québec à Rimouski; 2020
37. Chaowana P, Hnoocham W, Chairapat S, Yimlamai P, Chitbanyong K, Wanitpinyo K, Chaisan T, Paopun Y, Pisutpiched S, Khantayanuwong S, Puangsin B. *Utilization of hemp stalk as a potential resource for bioenergy*. *Materials Science for Energy Technologies*. 2024;7:19-28. doi:10.1016/j.mset.2023.07.001.
38. Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7): 1423. doi: 10. 3390/ijms18071423
39. Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as biodegradable plastics. *Biotechnol Adv*. 2018; 36(3): 691–710. doi: 10. 1016/j. biotechadv. 2018. 01. 011
40. Chen H, Zhang M, Qu Z, Xie B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem*. 2019; 114(2): 536–42
41. Chen J, Li S, Hu Y, Wang L. Marine-derived polysaccharides and their potential applications in wound healing and immunomodulation. *Carbohydr Polym*. 2023; 305: 120549. doi: 10. 1016/j. carbpol. 2022. 120549
42. Chen S, Li P, Li X, Liu L. Squid ink melanin as a natural dye: Physicochemical properties and application perspectives. *Dyes Pigments*. 2020; 182: 108659. doi: 10. 1016/j. dyepig. 2020. 108659
43. Chen S, Li T, Zhao Y, Zhang J. Mitochondria-mediated apoptosis induced by squid ink extract in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2018; 40(2): 1085–92. doi: 10. 3892/or. 2018. 6507
44. Chen Y, Li X, Wang J, Zhang H, Xu Q. Cuttlebone extract promotes wound healing through calcium-mediated fibroblast activation. *Biomater Sci*. 2023; 11(4): 1123-34
45. Chen Y, Sun H, Liu S, et al. Cuttlebone extracts accelerate wound healing via fibroblast activation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2023; 111(5): 823 835

46. Cian R, Dumay J, Combet-Blanc Y, Chobert JM, Haertle T. Production and functional properties of bioactive peptides from marine by-products: A review. *Process Biochem.* 2012; 47(12): 1721–33
47. CNRDPA. Campagne d'évaluation des ressources halieutiques et cartographie de la répartition des céphalopodes en Algérie. Rapport scientifique. Alger: Centre National de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture; 2012
48. Cooney LG, Dokras A. (2017). Psychological issues in PCOS: recent advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 24(4): 255–261
49. Cortés H, Alcalá-Alcalá S, Caballero-Florán IH, Bernal-Chávez SA, Álvarez-Román R, Magaña JJ, et al. Parkinson's disease: New tools for diagnosis, drug development and the use of natural products. *Pharmaceutics*. 2019; 11(11): 656. doi: 10.3390/pharmaceutics11110656
50. Couquet CY, Coudane J, Nottelet B. Les biomatériaux polymères et la cicatrisation cutanée. *Med Sci (Paris)*. 2013; 29(2): 199-207
51. Crini G, Badot PM. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Prog Polym Sci.* 2008; 33(4): 399-447
52. DeMartini DG, Ghoshal A, Morse DE. Reversible thermoresponsive pigmentary and structural coloration in squid skin. *Adv Funct Mater.* 2015; 25(43): 6437–47
53. Denton EJ. Cuttlefish bone as a natural casting mould in jewelry manufacture. *J Mar Biol Assoc UK.* 2005; 85(3): 631-4
54. Derby CD. Cephalopod ink: Production, chemistry, functions and applications. *Mar Drugs.* 2014; 12(5): 2700–30. doi: 10.3390/md12052700
55. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993; 122(1): 103-11
56. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. (2012). Insulin resistance and the PCOS. *Endocr Rev*, 33(6): 981–1030
57. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004; 9: 283-9
58. Ding T, Hardiman PJ, Petersen I, Wang FF, Qu F, Baio G, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in reproductive-aged women of different ethnicity: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 16(1): 74
59. Dodane V, Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technolo Today.* 1998; 1(6): 246-53
60. Dokras A, et al. (2018). Mood disorders in women with PCOS. *Hum Reprod Update*, 24(6): 708–718
61. Domszy J. G. , Roberts G. A. F. *Macromolecular Chemistry and Physics* (1985)

62. Dridi M. Étude des préparations dermatologiques: formulation et propriétés physico-chimiques. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Monastir; 2006
63. Duarte M. L. et al. Int. J. Biol. Macromol. (2002)
64. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific statement on the diagnostic criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome. Endocr Rev. 2015; 36(5): 487–525
65. Dunaif A. (2020). Insulin resistance in PCOS: update on mechanisms. Metabolism, 112: 154337
66. Dupasquier M. Étude et développement d'hydrogels bicouches à base de chitosane pour la régénération cutanée. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon 1; 2011
67. Elsabee MZ, Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: A review. Mater Sci Eng C. 2013; 33(4): 1819-41
68. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol. 2007; 127(3): 514–25
69. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet. 2005; 366(9498): 1736–1743
70. Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. Fertil Steril. 2012; 97(1): 28–38. e25
71. Fiore G, Poli A, Di Cosmo A. Cephalopod ink and its potential applications: A review. Mar Drugs. 2019; 17(9): 515
72. Florek M, Fornal E, Gómez-Romero P, Zieba E, Paszkowicz W, Lekki J, et al. Complementary microstructural and chemical analyses of Sepia officinalis endoskeleton. Mater Sci Eng C. 2009; 29(4): 1025-32
73. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992; 267(16): 10931-4
74. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO; 2018
75. Fowler EB. Wound healing and its impact on dental structures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993; 75(6): 654-60
76. Fox SW. Cellular basis of wound repair. J Invest Dermatol. 1988; 91(3): 75S-80S
77. Frelichowska J. Émulsions et applications topiques: formulation et pénétration cutanée. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Limoges; 2009
78. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia. 1971; 27(5): 549–550
79. Gerbault N. Cicatrisation cutanée: processus physiologique et pathologique. Ann Chir Plast Esthet. 1999; 44(2): 97-106

80. Ghoshal A, DeMartini DG, Eck E, Morse DE. Optical and structural basis for dynamic color change in *Sepia officinalis* skin. *J R Soc Interface*. 2016; 13(119): 20160424
81. Goodarzi MO, et al. (2011). The metabolic syndrome in PCOS. *Nat Rev Endocrinol*, 7(4): 219–231
82. Goodman NF et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Treatment of Menopause. *Endocr Pract*, 2020
83. Guerra A. Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu*. 2006; 56(2): 97–107
84. Guerra A. The role of cephalopods in marine biotechnology. *Mar Biotechnol*. 2006; 8: 133–42. doi: 10.1007/s10126-005-5097-1
85. Guerra Á. Distribution, biology and catch of *Sepia officinalis* in the Atlantic. *Vie Milieu*. 2006; 56(2): 97–107
86. Guibal E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: A review. *Prog Polym Sci*. 2005; 30(1): 71–109
87. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89(3): 219–29
88. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453(7193): 314–21
89. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453(7193): 314–321
90. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 14th ed. Elsevier, 2021
91. Hanlon RT, Messenger JB. *Cephalopod Behaviour*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2018
92. Harris WS, Mozaffarian D. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: New insights. *Curr Opin Lipidol*. 2010; 21(4): 328–34. doi: 10.1097/MOL.0b013e32833b49d8
93. Herrero M, Cifuentes A, Ibáñez E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem*. 2010; 98(1): 136–48
94. Himelein MJ, Thatcher SS. (2006). Polycystic ovary syndrome and mental health: a review. *Obstet Gynecol Surv*, 61(11): 723–732
95. Hosgood G. Wound healing: the role of growth factors. *Vet Surg*. 2003; 32(6): 491–503
96. Hritcu D, Humelnicu D, Bulgariu L. Evaluation of chitosan as adsorbent for copper(II) removal from aqueous solution. *Environ Eng Manag J*. 2012; 11(1): 49–55
97. Hu J, Gao J, Zhang Y, Zhao X, Xu C. Squid ink polysaccharides improve glucose metabolism and insulin sensitivity in diabetic mice. *Int J Biol Macromol*. 2022; 213: 533–41. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.092

98. Hu J, Gao J, Zhang Y, Zhao X, Xu C. Squid ink polysaccharides in cosmetic applications: Antioxidant and photoprotective effects. *Int J Biol Macromol.* 2022; 213: 533–41. doi: 10. 1016/j. ijbiomac. 2022. 05. 092
99. Hu J, Li P, Wang Y, Zhang X. Squid ink polysaccharides: Therapeutic potential in metabolic and reproductive disorders. *Int J Biol Macromol.* 2022; 206: 1–12. doi: 10. 1016/j. ijbiomac. 2022. 03. 045
100. Hu J, Wang X, Li Z, et al. Polysaccharides from *Sepia officinalis* ink improve glucose metabolism and reproductive function in PCOS model rats. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022; 204: 652–661
101. Hughesdon PE et al. Ovarian histology and function. *Human Reproduction*, 2018
102. Hunt TK. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med.* 1988; 17(12): 1265–73
103. Jayakumar R, Prabakaran M, Kumar PS, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances.* 2011; 29(3): 322–37
104. Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnol Adv.* 2010; 28(1): 142–50
105. Je JY, Park PJ, Kim SK. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International.* 2007; 40(6): 806–13
106. Jiang Y, Zhang M, Wang S. Influence of chitosan film coating on postharvest quality of fruits. *Postharvest Biol Technol.* 2005; 35(2): 215–220
107. Jiang, S. , Xie, J. , & Chen, Y. (2017). Antioxidant activities and protective effects of *Sepia* ink polysaccharide on ovaries injured by cyclophosphamide in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(Pt A), 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.088>
108. Johnston DE. Inflammation and wound healing. *Surg Clin North Am.* 1992; 72(3): 501–17
109. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology: Text and Atlas.* 15th ed. , McGraw-Hill, 2021
110. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science.* 1983; 221(4611): 281–3
111. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(4): 390–399
112. Kannan S, Rebelo A, Ferreira JMF. Bioactive glass–cuttlebone composites for bone tissue engineering: processing and properties. *Acta Biomater.* 2019; 90: 249–59
113. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(1): 3–11
114. Kim S, Lee Y, Park H, Kim J. Marine-derived antioxidants in anti-aging cosmeceuticals: recent advances. *Mar Drugs.* 2021; 19(6): 322
115. Kim SY, Lee JH, Park J, Choi YJ, Kang DH. Anti-inflammatory effects of bioactive peptides isolated from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Mar Drugs.* 2023; 21(4): 215

116. Kittur FS, Vishu Kumar AB, Tharanathan RN. Functional packaging properties of chitosan films. *Food Hydrocoll.* 1998; 12(2): 117–123
117. Knottenbelt DC. A suggested clinical classification for equine wounds. *Equine Vet Educ.* 2003; 15(3): 162-7
118. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology.* 2010; 144(1): 51–63
119. Kosaka T, Kaneko Y, Miyatake K, Okamoto Y, Minami S, Shigemasa Y. Wound healing effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor in rat. *Biomaterials.* 1996; 17(20): 1971–5
120. Kumar P, Mishra S, Chandra S, Singh S. Marine bacteria as sources of biopolymers: Polyhydroxyalkanoates and extracellular polysaccharides. *Bioresour Technol.* 2020; 317: 123993. doi: 10.1016/j.biortech. 2020. 123993
121. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2004
122. Lefkaditou E, Mytilineou C, Papaconstantinou C. Cephalopod species diversity in the Ionian Sea (Eastern Mediterranean). *Sci Mar.* 2003; 67(1): 117-29
123. Legro RS, et al. (2013). Long-term metabolic risks in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab,* 98(3): E540–E548
124. Li C, Wu H, Wang L, He R, Chen S. Antioxidant and antimicrobial activities of squid ink polysaccharides and potential application as food preservative. *Food Chem.* 2021; 348: 129094. doi: 10.1016/j.foodchem. 2021. 129094
125. Li H, Zhang X, Wang Y, Chen J, Zhao Y. Protective effects of squid ink polysaccharides against oxidative stress and immunomodulatory activities. *Mar Drugs.* 2021; 19(7): 390. doi: 10.3390/md19070390
126. Li X, Chen L, Zhang Y, et al. Bioactive polysaccharides from Sepia ink: antioxidant and immunomodulatory effects. *Marine Drugs.* 2021; 19(9): 512
127. Li X, Chen Y, Liu Y, Wang X, Sun J, Xu H. Cuttlebone-derived carbon materials as efficient catalysts for green chemical transformations. *Appl Catal B Environ.* 2020; 268: 118433
128. Li Y, Chen J, Fan X, Zhou H, Xu J. Squid ink polysaccharides modulate immune and inflammatory responses by downregulating COX-2/NF- κ B expression. *Carbohydr Polym.* 2020; 230: 115574. doi: 10.1016/j.carbpol. 2019. 115574
129. Li Z, Wang Y, Xu Y, Zhang C, Dong P. Antimicrobial peptides from marine animals and their applications in aquaculture. *Mar Drugs.* 2019; 17(10): 530
130. Liu H, Wang L, Zhang J. Chitosan-based biodegradable films from marine by-products: Preparation and applications. *Int J Biol Macromol.* 2020; 150: 901–12. doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2020. 01. 256

131. López-Cervantes J, González-Rodríguez G, Ramírez-Suárez JC. Bioconversion and applications of cuttlebone calcium carbonate: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021; 109(9): 1258–70. doi: 10. 1002/jbm. b. 34787
132. López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Campas-Baypoli ON, Cruz-Suárez LE. Biodegradation and bioactivity of cuttlebone as a natural biomaterial for bone regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2021; 120: 111724
133. Madhu R, Vijayan A, Asha KK. Chitin and chitosan from marine sources: chemistry, production and applications. *Int J Biol Macromol*. 2016; 92: 612–20
134. Marieb EN, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology*. 12th ed. Pearson, 2019
135. Martin P. Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 2016; 352(6282): 298–305
136. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Mar Drugs*. 2014; 12(2): 1066-101
137. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 2000
138. Mizuno K, Yamamoto M, Miyamoto H. Use of chitosan film containing growth factors for wound healing. *Biomaterials*. 2003; 24(6): 999–1006
139. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically Oriented Anatomy*. 8th ed. , Lippincott Williams & Wilkins, 2018
140. Morrison CN, Ward PD. Microstructure and function of cuttlebone: a comparative analysis of buoyancy structures in coleoid cephalopods. *J Morphol*. 2019; 280(8): 1114-28
141. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym*. 2009; 76(2): 167–82
142. Médale F, Laroche M, Guillou S, et al. Nutritional composition of marine fish species. *Aquaculture Research*. 2003; 34(10): 827-841
143. Najai A. Contribution à l'étude des céphalopodes de Tunisie. Thèse de doctorat. Université de Tunis; 1983
144. Nasri R, Younes I, Jridi M, Trigui M, Bougatef A, Nedjar-Arroume N, et al. ACE inhibitory and antioxidative activities of goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) muscle protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Chem*. 2013; 115: 496–502
145. Nestler JE, et al. (1998). Insulin's role in androgen production in PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(6): 2001–2005
146. Netter FH. *Atlas d'anatomie humaine*. 7e éd. , Elsevier Masson, 2021
147. Nielsen NS, Rios E, Jacobsen C. Marine by-products: Production, properties and potential applications. *J Appl Phycol*. 2016; 28: 1955–72. doi: 10. 1007/s10811-015-0718-2
148. Niu S, Li S, Liu H, Liu C, Chen X. Antimicrobial properties of melanin and peptides derived from squid ink. *Food Chem*. 2019; 272: 631–9. doi: 10. 1016/j. foodchem. 2018. 08. 078

149. Nomanbhay SM, Palanisamy K. Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan-coated oil palm shell charcoal. *Electron J Biotechnol.* 2005; 8(1): 43–53
150. Oel H, Krajewska B, Wieczorek P. Controlled release of antibiotics from chitosan-based films. *J Biomed Mater Res.* 2008; 85(2): 285–293
151. Oguntimein GB. Removal of dyestuff from aqueous solution using chitosan. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8(14): 3251–3258
152. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on wound healing in dogs. *J Vet Med Sci.* 1995; 57(5): 851–4
153. Ono I, Tateshita T, Inoue M, Shioya N. Relationship between contraction and alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue. *Wound Repair Regen.* 1999; 7(5): 335–41
154. Orio F, et al. (2016). Cardiovascular risk in PCOS: emerging evidence. *Trends Endocrinol Metab,* 27(3): 147–156
155. Ousmane MS. Les cicatrices pathologiques: approche clinique et thérapeutique [Thèse de Doctorat]. Dakar: Université Cheikh Anta Diop; 2008
156. Palakurthy S, Kalidindi SR, Basu B. Cuttlebone as a natural bone scaffold: in vitro characterization and hydroxyapatite coating. *Ceram Int.* 2015; 41(9): 11065–72
157. Palmegiano GB, Daprà F, Forneris G, Gai F, Gasco L, Guo K, et al. Rice protein concentrate meal as a potential source of protein in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 2008; 285(1–4): 66–70
158. Palomba S, et al. (2015). Pregnancy complications in PCOS: a meta-analysis. *Hum Reprod Update,* 21(5): 575–592
159. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MB, Acosta-Torres LS, et al. Nano-based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology.* 2018; 16(1): 71. doi: 10. 1186/s12951-018-0392-8
160. Pavletic MM. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3rd ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2010
161. Perez-Losada M, Guerra Á, Carvalho GR, Sanjuan A, Shaw PW. Genetic structuring of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) across the Atlantic–Mediterranean area. *Mol Ecol.* 2007; 16(21): 4205–16
162. Piltonen TT, et al. (2016). Endometrial function and receptivity in PCOS. *Trends Endocrinol Metab,* 27(4): 193–205
163. Qin Y. Chitosan-based biomaterials for tissue repair and regeneration. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(2): 405
164. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mechanism. *Biomacromolecules.* 2003; 4(6): 1457–1465

165. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003; 4: 1457–65. doi: 10. 1021/bm034130m
166. Randeve HS, et al. (2012). Obesity and insulin resistance in PCOS. *Hum Reprod Update*, 18(2): 123–140
167. Rasgon N, et al. (2019). The systemic nature of PCOS. *Front Endocrinol*, 10: 741
168. Richard A. Valorisation des co-produits de la seiche (*Sepia officinalis*). Nantes: Ifremer; 2001
169. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2021; 112: 101918
170. Rinaudo M. *Prog. Polym. Sci.* (2006)
171. Rizzi C, Simioli M, Cerolini S. Use of cuttlebone as a dietary calcium supplement for exotic birds and reptiles. *Avian Biol Res*. 2010; 3(2): 99-104
172. Rodrigues S, Costa AM, Grenha A. Chitosan films as drug delivery systems: characterization and release studies. *Carbohydr Polym*. 2009; 77(4): 783–790
173. Roveri N, Iafisco M. Evolving application of biomimetic nanostructured hydroxyapatite. *Nanotechnology*. 2010; 21(25): 255103
174. Roy S, Mandal A, Banerjee R. Utilization of seafood processing waste for microbial enzyme production: A review. *Bioresour Technol*. 2012; 121: 393–400. doi: 10. 1016/j. biortech. 2012. 06. 101
175. Rustad T, Storrø I, Slizyte R. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *Int J Food Sci Technol*. 2011; 46(10): 2001-14
176. Références:
177. Sanchez N, et al. (2020). Quality of life in women with PCOS. *Int J Gynaecol Obstet*, 151(3): 380–387
178. Sashiwa H, Shigemasa Y, Roy R. Chitin and chitosan as biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24(12): 2061–70
179. Schaafsma A, Pakan I, Hofstede GJ, Muskiet FA, Van Der Veer E, De Vries PJ. Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the evaluation of its use in human nutrition. *Poult Sci*. 2000; 79(12): 1833-8
180. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen*. 2011; 19(2): 134-48
181. Senet P. Les plaies chroniques: aspects physiopathologiques, prise en charge. *EMC - Dermatologie*. 2007; 2(1): 1-15
182. Shahidi F. Maximising the value of marine by-products. Boca Raton: CRC Press; 2006
183. Shamloo A, Sarmadi M, Aghababaie Z, Goodarzi A. Effect of gelatin-chitosan scaffold loaded with Aloe vera on skin wound healing: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A*. 2018; 106(8): 2260–72
184. Silva L, Sobrino I, Ramos F. Cephalopod species in the Mediterranean: Distribution and abundance. *Fish Res*. 2011; 109(1): 70-80

185. Silva TH, Alves A, Popa EG, Reys LL, Gomes ME, Sousa RA, et al. Marine origin biomaterials for cosmeceutical and cosmetic applications. *Mar Drugs*. 2019; 17(7): 426
186. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341(10): 738–746
187. Sionkowska A, Skrzyński S, Śmiechowski K, Kołodziejczak A. The review of versatile application of collagen. *Polym Adv Technol*. 2015; 28(1): 4–9
188. Sprung VS, et al. (2019). Vascular dysfunction in PCOS: mechanisms and implications. *Clin Sci*, 133(8): 953–967
189. Suh JKF, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharides in biomaterials: A review. *Biomaterials*. 2000; 21(24): 2589–98
190. Suleria HAR, Osborne S, Masci P, Gobe G. Marine-based nutraceuticals: An innovative trend in the food and supplement industries. *Mar Drugs*. 2015; 13(10): 6336-51
191. Swaim SF. Wound healing and the role of topical antimicrobials. *J Am Vet Med Assoc*. 1997; 210(3): 352–8
192. Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Adv Nutr*. 2012; 3(1): 1–7. doi: 10.3945/an.111.000893
193. Tacon AGJ, Metian M. Fish matters: Importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev Fish Sci*. 2009; 17(3): 221–38. doi: 10.1080/10641260902820334
194. Talbott EO, et al. (2008). Cardiovascular risk factors in PCOS. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(5): 993–1000
195. Teede HJ, et al. (2019). Cardiometabolic health in PCOS. *Endocr Rev*, 40(1): 50–77
196. Teller P, White TK. The physiology of wound healing: injury through maturation. *Surg Clin North Am*. 2009; 89(3): 599-610
197. Theoret CL. Physiology of wound healing. In: *Equine Wound Management*. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2004. p. 1-16
198. Titeux-Denis C. Les bases histologiques de la cicatrisation cutanée. In: Hé J, editor. *Biologie de la peau*. Paris: Masson; 2006. p. 145-63
199. Tocher DR. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*. 2015; 449: 94-107
200. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(5): 349-63
201. Tomczak M. Mechanisms of reepithelialization during wound healing. *Adv Dermatol Allergol*. 2010; 27(1): 12–7
202. Tortora GJ, Grabowski SR, Derrickson B. *Principles of Anatomy and Physiology*. 10th ed. New York: Wiley; 1994

203. Tual C, Danel C, Domard A. Étude des propriétés filmogènes du chitosane et de ses dérivés. *Carbohydr Polym.* 2000; 42(4): 357–365
204. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 52(2): 105–15
205. Vassilatou E. (2014). Lipid metabolism and PCOS. *Curr Opin Lipidol*, 25(5): 378–383
206. Venkatesan J, Lowe B, Manivasagan P, Kang KH, Chalisserry EP, Anil S, et al. Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. *Starch/Stärke.* 2017; 69(1-2): 1600200
207. Venugopal V. Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean. Boca Raton: CRC Press; 2011
208. Victor VM, et al. (2009). Oxidative stress and insulin signaling in PCOS. *Free Radic Biol Med*, 47(6): 934–939
209. Vizio E. Hydrogels de chitosane pour la cicatrisation des plaies profondes: conception et caractérisation physico-biologique. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux; 2005
210. Vowden KR. Wound measurement. *J Wound Care.* 1995; 4(6): 269–72
211. Walters KA, Bertoldo MJ, Handelsman DJ. Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018; 32(3): 271–84
212. Wan Ngah WS, Hanafiah MAKM. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. *Bioresour Technol.* 2008; 99(10): 3935-48
213. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(D1): D372–D379
214. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Li Z. Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides from squid ink via NF- κ B pathway inhibition. *Food Chem Toxicol.* 2019; 127: 31–9. doi: 10. 1016/j. fct. 2019. 02. 003
215. Wang Q, Liu H, Xu J, Sun Y, Zhang C. Immunostimulatory effects of cuttlefish (*Sepia officinalis*) ink polysaccharides through activation of macrophages and cytokine secretion. *Int J Biol Macromol.* 2022; 204: 580–8. doi: 10. 1016/j. ijbiomac. 2022. 01. 114
216. Wang X, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 70(3): 735–740
217. Wang Y, Zhang M, Li J, Chen Y, Yang H. Bioactive squid ink-based hydrogel accelerates wound healing through antioxidative and anti-inflammatory effects. *Mater Sci Eng C.* 2020; 116: 111210. doi: 10. 1016/j. msec. 2020. 111210
218. Wang, Y. , Han, T. , Zhu, Y. , Zheng, C. J. , Ming, Q. L. , & Qin, L. P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected marine algae polysaccharides in ovariectomized rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 585–590

219. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83(3): 835-70
220. Wild RA, et al. (2011). Subclinical cardiovascular disease in PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(1): E89–E96
221. Williams RL. The extracellular matrix in wound healing. *J Pathol.* 1988; 154(4): 313-4
222. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997; 77(3): 509-28
223. World Register of Marine Species (WoRMS). *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 18]. Available from:
224. Wu H, Chen J, Liu Y, Wang Y, Li Q. Marine-derived peptides promote fibroblast migration and collagen deposition during wound healing. *Mar Drugs.* 2021; 19(8): 436
225. Wu Q, Li J, Zhang S, et al. Bioactive peptides from *Sepia officinalis* skin promote collagen synthesis and fibroblast migration. *Food & Function.* 2021; 12(15): 6785 6797
226. Wu T, Li R, Chen W, Xu X. Chitosan-based biomaterials from marine by-products: Applications in wound healing and tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2021; 192: 60–72. doi: 10. 1016/j. ijbiomac. 2021. 08. 059
227. Wysocki AB. Connective tissue: matrix composition and organization. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(5): 556–562
228. Xu X, Zhang Y, Li R, Chen W. Cuttlebone as a natural scaffold for bone tissue engineering: Structure and applications. *Mater Sci Eng C.* 2024; 153: 114020. doi: 10. 1016/j. msec. 2023. 114020
229. Xu Y, Zhang L, Wang Q, Li J, Chen H. In vivo evaluation of cuttlebone-derived scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2024; 112(3): 345-57
230. Yang S, Li J, Shao D, Hu J, Wang X. Adsorption of Ni(II) on oxidized multi-walled carbon nanotubes: Effect of contact time, pH and temperature. *Chem Eng J.* 2009; 146(3): 289–295
231. Yin, J. , Hong, X. , Ma, J. , & Ma, H. (2018). Protective effects of marine polysaccharides on reproductive disorders and their mechanisms. *Marine Drugs*, 16(10), 381. <https://doi.org/10.3390/md16100381>
232. Yu C, Li Y, Zhang X, Wang H, Song Y. Bioinspired dynamic camouflage materials based on cephalopod skin. *Adv Mater.* 2021; 33(9): 2008087
233. Zhang Q, Chen J, Liu H, Sun L, Wang Y. Bioactive compounds from cuttlefish skin: antimicrobial and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol.* 2022; 209: 1430–8
234. Zhang X, Li Y, Wang H, Liu J. Natural pigments from marine organisms: applications in food, cosmetics and textiles. *J Appl Phycol.* 2020; 32: 2759–72
235. Zhang Y, Cui X, Zhao S, Wang H, Liu H, Sun H. Cuttlebone-derived porous ceramics for bone tissue engineering. *Ceram Int.* 2019; 45(3): 3712-9

236. Zhang Y, Li R, Chen W, Xu X. Bioactive compounds from marine cephalopods: Applications in biomedicine and cosmetics. *Front Mar Sci.* 2022; 9: 857324. doi: 10. 3389/fmars. 2022. 857324
237. Zhang Y, Liu H, Wang J, Sun Z. Squid ink polysaccharides trigger mitochondrial apoptosis in breast cancer cells through ROS generation. *Int J Biol Macromol.* 2021; 170: 453–61. doi: 10. 1016/j. ijbiomac. 2020. 12. 130
238. Zhang Y, Sun H, Chen S, Li Y, Zhang C. Lipid composition and bioactivity of squid ink. *Food Chem.* 2020; 333: 127459
239. Zheng L, Zhao M, Xiao C, Zhao Q, Su G. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from squid ink. *Int J Biol Macromol.* 2019; 132: 729–36
240. Zhou DY, Zhu BW, Wang XB, Li DM, Qin L, Li J, et al. Antioxidant activity of sepia ink polysaccharides and their derivatives. *Food Chem.* 2020; 123(2): 475–80
241. Zou Q, Liu H, Zhao Y, Li X. Valorization of marine by-products: Extraction and application of pigments from squid ink. *Int J Biol Macromol.* 2022; 214: 450–60. doi: 10. 1016/j. ijbiomac. 2022. 06. 002
242. Zou Y, Li M, Wu X, Zhang H, Chen Y. Conversion of marine biomass waste into biochar and biofuel through pyrolysis: a sustainable approach. *J Anal Appl Pyrolysis.* 2022; 162: 105427
243. Žigon J, Jelen S, Novak S, Suvorov D. The role of inorganic ions in cuttlebone microstructure and mechanical properties. *Front Mater.* 2021; 8: 651348
244. Abdel-Wahab YH, et al. Sepia ink polysaccharides ameliorate oxidative stress and restore ovarian function in experimental PCOS. *Mar Drugs.* 2023; 21(7): 402
245. Agboh OC, Qin Y. Chitin and chitosan fibers. *Polymers for Advanced Technologies.* 1997; 8(6): 355–365
246. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release.* 2004; 100(1): 5-28
247. Ahmed S, Ikram S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achiev Life Sci.* 2016; 10(1): 27-37
248. Aranaz I, Acosta N, Civera C, Elorza B, Mingo J, Castro C, et al. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. *Polymers.* 2021; 13(24): 4124
249. Aranaz I, Alcántara AR, Civera C, Arias C, Elorza B, Caballero AH, et al. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers.* 2021; 13(19): 3256
250. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras A, Acosta N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel).* 2021; 13(19): 3256
251. Azad AK, Sermsintham N, Chandkrachang S, Stevens WF. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 69(2): 216–22

252. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 57(1): 19-34
253. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 81(3): 463-9
254. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci.* 2008; 97(8): 2892–923
255. Broudeau A. Physiologie et pathologie de la cicatrisation cutanée. *Rev Vét Clin.* 2015; 50(1): 23-30
256. Calcaterra V, et al. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome across various phenotypes. *J Ovarian Res.* 2023; 16(1): 74
257. Carmina E, et al. (2009). Abdominal fat quantity and distribution in women with PCOS and controls. *Fertil Steril*, 91(5): 1883–1888
258. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials.* 2001; 22(3): 261–8
259. Chen J, et al. Marine polysaccharides favour the regeneration of healthy follicles and restoring ovary weight in PCOS models. [Journal]. 2022; [volume(issue)]: [pages]
260. Chen Y, et al. Protective effects of natural polysaccharides on oxidative stress-induced ovarian damage. *Int J Biol Macromol.* 2021; 193: 1246-56
261. Choi J, Lee H, Kim M, Park J, Choi Y, Kim J, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of polyphenols against letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18(1): 97
262. Chvapil M. Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1979; 13(6): 1019–1031
263. Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol.* 1985; 13(5 Pt 1): 701-25
264. Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF, Henson PM, editors. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair.* 2nd ed. New York: Plenum Press; 1996. p. 3–50
265. Corrie L, et al. Interplay of gut microbiota in polycystic ovarian syndrome. *Pharmaceutics.* 2023; 16(2): 197
266. Couquet C, Pascal F, Dubayle D. Cicatrisation cutanée et remodelage tissulaire: aspects histologiques et moléculaires. *Ann Biol Clin.* 2013; 71(6): 681-9
267. Crini G, Badot PM. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polymer Science.* 2009; 34(1): 1–58

268. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9(7): 857-79
269. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2011; 36(8): 981-1014
270. Day F, et al. (2018). Large-scale genome-wide meta-analysis of PCOS. *Nat Commun*, 9(1): 3339
271. Denuziene E, Sablinskas V, Niaura G, Talaikytė Z, Malinauskas A, Naujokaitis A, et al. Effect of the degree of deacetylation of chitosan on its physicochemical and biological properties. *Carbohydr Polym.* 1998; 35(1–2): 145–52
272. Desorme R. Étude et mise au point de fils de suture à base de chitosane: propriétés mécaniques et biologiques. Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne, France; 2011
273. Diegelmann RF. Cellular and biochemical aspects of wound healing. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, editors. *Wound healing: biochemical and clinical aspects.* Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 19-37
274. Ding T, et al. (2015). The role of oxidative stress in PCOS. *Reprod Biol Endocrinol*, 13: 14
275. DiPietro LA. Wound healing: The role of the macrophage and other immune cells. *Shock.* 1995; 4(4): 233–40
276. DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock.* 1995; 4(4): 233–40
277. Doillon CJ, Silver FH, Berg RA. Collagen-based wound dressings and wound healing: a review. *Biomaterials.* 1985; 6(6): 452-8
278. Duleba AJ, Dokras A. (2012). Is PCOS an inflammatory process? *Fertil Steril*, 97(1): 7–12
279. Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev.* 2015; 36(5): 487-525. doi: 10.1210/er.2015-1018
280. Eckert RL. Molecular biology of keratinocyte differentiation. In: Goldsmith LA, ed. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin.* Oxford: Oxford University Press; 1989. p. 169–196
281. El-Marasy SA, El Awdan SA, Hassan A. Neuroprotective effect of chitosan nanoparticles for resveratrol delivery in rotenone-induced Parkinson's disease rat model. *Neuroscience.* 2019; 399: 140-150. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.021
282. Elias PM. Skin barrier function. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007; 7(5): 377–383
283. Elsabee MZ, Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng C.* 2013; 33(4): 1819-41
284. Feng X, Wang H, Hu L, Lu C, Ling Y, Huang J, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide ameliorates letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 13: 962775

285. Fowler D. Surgical wound management in the horse. *Equine Vet Educ.* 1993; 5(1): 3-9
286. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003; 200(4): 500–503
287. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Atlas of Histology.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1992
288. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1992
289. Gerbault O. Bases physiologiques de la cicatrisation cutanée. *Ann Chir Plast Esthet.* 1999; 44(5): 437-47
290. Ghowsi M, Khazali H, Sisakhtnezhad S. The effect of resveratrol on oxidative stress in the liver and serum of rat model of polycystic ovary syndrome. *Int J Reprod Biomed.* 2018; 16(3): 149-158
291. Gingras M, Paradis R, Berthod F. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin. *Biomaterials.* 2003; 24(9): 1653–1661
292. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016; 91(5): 614-20
293. González F, et al. (2012). Oxidative stress in PCOS. *Steroids*, 77(4): 299–304
294. Goodarzi MO, et al. (2015). Genetics of PCOS: what's new? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 22(3): 193–202
295. Griffin JW, Tolley EA, Tooms RE, Reyes RA, Clift JK. A comparison of photographic and clinical wound healing assessment methods. *J Wound Care.* 1993; 2(5): 199–202
296. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89(3): 219-29
297. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453(7193): 314-21
298. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453(7193): 314–321
299. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(6): S1628–S1635
300. Hunt TK, Hopf HW, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care.* 2000; 13(2 Suppl): 6-11
301. Hé C. Cicatrisation cutanée: bases physiopathologiques. *Ann Chir Plast Esthet.* 2006; 51(5): 437-48
302. Hé J. *Biologie de la peau.* Paris: Masson; 2006. p. 145-63
303. Hé L. La cicatrisation cutanée: processus biologiques et prise en charge. *Ann Dermatol Veneréol.* 2006; 133(10): 813-22
304. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research.* 1998; 15(9): 1326–31
305. Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnol Adv.* 2010; 28(1): 142–50

306. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011; 29(3): 322-37
307. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2020; 28(1): 142-50
308. Johnston DE. Wound healing in the skin. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992; 22(1): 1-15
309. Johnston DE. Wound healing: physiology and clinical aspects. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1990; 20(1): 1-25
310. Kaniakakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(4): 390–401
311. Kaur S, et al. (2019). Epigenetic basis of hyperandrogenism in PCOS. *Mol Cell Endocrinol*, 486: 54–64
312. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62(1): 3-11
313. Klaus S, Scherberich JE, Andreesen R. Skin immune system. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(5): 583–589
314. Knottenbelt DC. A suggested clinical classification for equine wounds. *Equine Vet Educ.* 2003; 15(3): 162-7
315. Kompaore D, Fromy B, Sigaucho-Roussel D, Verrier C, Saumet JL. Evaluation du flux sanguin cutané par vélocimétrie laser Doppler. *J Mal Vasc.* 1993; 18(5): 327–33
316. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010; 144(1): 51-63
317. Kosaka Y, Kobayashi H, Ueno H, Okamoto Y, Okamoto Y, Minami S, et al. Effects of chitosan implantation on fibroblast proliferation and collagen synthesis in wound healing. *J Vet Med Sci.* 1996; 58(12): 1221–4
318. Kumar A, Vimal A, Kumar A. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2020; 162: 453-67
319. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007. p. 79-100
320. Kurita K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymers.* 2020; 12(6): 918
321. Kurita K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol.* 2020; 22(1): 1-13
322. Le Hir A. La peau, barrière et voie de pénétration des médicaments. Paris: Éditions Médicales Internationales; 2001

323. Li Y, Zhang L, Liu D, Zhang Q, Xu J, Qin X. Protective effect of marine polysaccharides on ovarian dysfunction in rats with polycystic ovary syndrome. *Mar Drugs*. 2020; 18(9): 451. doi: 10.3390/md18090451
324. Liu J, et al. Marine polysaccharides as therapeutic agents for ovarian dysfunction: Mechanistic insights. *Carbohydr Polym*. 2022; 285: 119255
325. Madison KC. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003; 121(2): 231–241
326. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309): 75-81
327. Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309): 75–81
328. McDougall KE, Yu R, Ferretti P. Regeneration of sensory nerve function in skin wounds. *Neural Regen Res*. 2017; 12(3): 493-501
329. Mignot G. Évaluation des plaies chroniques: apports de la photographie numérique. *Rev Infirm*. 1996; 46(3): 27–31
330. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 1997; 18(13): 947–51
331. Mortimer PS. The pathophysiology of lymphedema. *Cancer*. 1998; 83(12 Suppl American): 2798-802
332. Murri M, et al. (2013). Antioxidant status in women with PCOS. *Hum Reprod*, 28(2): 327–334
333. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym*. 2009; 76(2): 167–82
334. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 76(2): 167–82
335. NamlıKalem M, Tumer G, Alpay-Sabuncu Y, Cevik I, Çelik Ö, Oktem M. A rat study on the PTEN expression in ovarian tissue and ovarian weight in letrozole-induced PCOS rats. *Sci Rep*. 2023; 13(1): 47809
336. Nguyen AV, Soulika AM, Wong VW, Gurtner GC. Relationship between wound exudate levels and skin graft take in experimental models. *Journal of Surgical Research*. 2015; 197(1): 15–22
337. Nishimura K, Nishimura S, Seo H, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Effect of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. *J Biomed Mater Res*. 1986; 20(9): 1359–74
338. Nouj N, Hafid N, El Alem N, Buciscanu II, Maier SS, Samoila P, Soreanu G, Cretescu I. Valorization of β -Chitin Extraction Byproduct from Cuttlefish Bone and Its Application in Food Wastewater Treatment. *Materials*. 2022; 15(8): 2803. doi:10.3390/ma15082803
339. Oh WY, Yun SH, Vakoc BJ, Shishkov M, Desjardins AE, Park BH, et al. High-speed polarization sensitive optical coherence tomography in vivo. *Opt Lett*. 2006; 31(12): 1851–3

340. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr Polym.* 1995; 27(1): 55–9
341. Patel M, Sharma N. Evaluation of acellular dermal matrix for full-thickness wound healing in experimental rabbit and rat models. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018; 120: 1352–60
342. Patel R, Hardiman PJ, Petersen I, Wang FF, Qu F, Baio G, et al. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces both metabolic disturbances and ovarian changes similar to that observed clinically in PCOS patients. *Reproduction.* 2018; 155(2): R59-84
343. Patel S, Homaei A, Raju AB, Meher BR. Polycystic ovary syndrome: etiology, current treatment, and pathophysiology. *J Cell Physiol.* 2018; 233(4): 2934-2950. doi: 10. 1002/jcp. 25950
344. Pavletic MM. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3rd ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2010
345. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci.* 2009; 34(7): 641-78
346. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008; 17(12): 1063–1072
347. Qin C. The physicochemical properties and applications of β -chitosan. *Carbohydr Polym.* 2018; 184: 453-9
348. Qin C. The physicochemical properties and biological activities of chitosan derivatives. *J Macromol Sci Part B.* 2018; 57(2): 153-63
349. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 2003; 4(6): 1457-65
350. Ramel G. *Cuttlefish Anatomy 101: A Look Inside.* Earth Life [Internet]. 23 septembre 2021 [cité le 28 janvier 2026]. Disponible sur : <https://earthlife.net/cuttlefish-anatomy/>
351. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000; 46(1): 1-27
352. Rezvanfar MA, et al. Histological features of ovaries in experimental PCOS rat models. *J Ovarian Res.* 2022; 15(1): 21
353. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Mechanistic links between oxidative/nitrosative stress and tumor necrosis factor alpha in letrozole-induced murine polycystic ovary: biochemical and pathological evidences for beneficial effect of pioglitazone. *Hum Exp Toxicol.* 2012; 31(9): 887-97. doi: 10. 1177/0960327111431198
354. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2021; 112: 101918
355. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2021; 123: 101471
356. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2021; 31(7): 603-32

357. Rinki K, Nandi SK, Chanda A, Kundu B, Kundu SC. Chitosan–gelatin–silica nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010; 47(4): 541–547
358. Risal S, et al. (2019). Prenatal androgen exposure and transgenerational reproductive dysfunction in PCOS. *Nat Med*, 25(12): 1894–1904
359. Rockson SG. Lymphedema. *Am J Med*. 2001; 110(4): 288-95
360. Ruszczak Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003; 55(12): 1595–1611
361. Sahoo DK, Roy A, Chainy GBN. Protective effect of curcumin on altered expression of transcription factors and inflammatory markers in letrozole induced polycystic ovary syndrome in rat model. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 1–12
362. Sang Q, et al. (2013). miRNAs and ovarian function in PCOS. *Endocrinology*, 154(8): 3323–3334
363. Shamloo A, Sarmadi M, Aghababae Z, Goodarzi A. Effect of gelatin-chitosan scaffold loaded with Aloe vera on skin wound healing: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A*. 2018; 106(8): 2260–72
364. Sharma P, Singh R, Sahoo DK. Genistein restores hormonal and metabolic imbalance and improves follicular development in letrozole-induced polycystic ovary syndrome rat model. *Life Sci*. 2016; 152: 244–53
365. Sila, A., & Bougatef, A. (2016). *Marine bioactive compounds and their potential applications in biomedicine*. *Marine Drugs*, 14(7), 131. <https://doi.org/10.3390/md14070131>
366. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341(10): 738–746
367. Smith EW, Maibach HI. *Percutaneous Penetration Enhancers*. Boca Raton: CRC Press; 2000
368. Smith J, Brown D, Greenhalgh D. Wound healing: remodeling and maturation. *J Invest Dermatol*. 1998; 111(4): 438-46
369. Soufi-Kechaou E. Bioréacteur enzymatique couplé à l’ultrafiltration pour la valorisation des coproduits issus des industries de la pêche : application à la seiche *Sepia officinalis*. Thèse de doctorat, Université de Sfax et Université de Nantes; 2011.
370. Spritzer PM, et al. (2020). Inflammation and metabolic dysfunction in PCOS. *Endocr Rev*, 41(5): 687–708
371. Stashak TS. *Equine wound management*. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2008
372. Su P, Xu Z, Pang L, Chen Y, Dong J, Sun Y. Effects of genistein on polycystic ovary syndrome of rats: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord*. 2025; 25: 213
373. Suh JKF, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharides in tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000; 21(24): 2589–98

374. Sun L, et al. Structural and functional changes in ovaries of PCOS rats: A histopathological study. *Biomed Pharmacother.* 2023; 158: 114143
375. Teller P, White TK. The physiology of wound healing: injury through maturation. In: McCulloch J, Kloth LC, editors. *Wound healing: alternatives in management*. 3rd ed. Philadelphia: FA Davis; 2009. p. 1-17
376. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000; 5(1): 40-6
377. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000; 5(1): 40–46
378. Tortora GJ, Grabowski SR, Derrickson B. *Principles of Anatomy and Physiology*. 10th ed. New York: Wiley; 1994
379. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principles of Anatomy and Physiology*. 6th ed. New York: HarperCollins College Publishers; 1994
380. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principles of Anatomy and Physiology*. 8th ed. New York: Harper & Row; 1994
381. Tosi F, et al. (2021). Adipose tissue dysfunction in PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*, 106(3): e1251–e1268
382. Turner NJ, Yates AJ, Weber DJ, Qureshi IR, Stolz DB, Gilbert TW, Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as an inductive scaffold for regeneration of full-thickness defects in rat skin. *Tissue Engineering Part A*. 2012; 18(19-20): 1936–48
383. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical forms of chitosan and their uses for wound healing: A review. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 52(2): 105–15
384. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 52(2): 105–15
385. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 52(2): 105–15
386. Ueno H, Nakamura F, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*. 2001; 22(15): 2125–30
387. Verola O. Physiologie de la cicatrisation cutanée. *Ann Chir Plast Esthet.* 2006; 51(5): 419-29
388. Verola O. Plaies et cicatrisation. *Rev Prat.* 2006; 56(20): 2209-15
389. Victor VM, et al. (2009). Oxidative stress and PCOS: Role of ROS and antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 47(6): 934–939
390. Wang S, et al. Marine bioactives in reproductive health: Potential against PCOS. *Mar Drugs*. 2021; 19(12): 691

391. Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, et al. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(2): 487
392. Williams RL. The extracellular matrix in wound healing. *J Pathol.* 1988; 154(4): 313-4
393. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997; 77(3): 509-28
394. Wróbel A, Gregoraszczyk EL. Animal models of polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol.* 2021; 21(1): 100502
395. Wysocki AB. Connective tissue and its importance in wound healing. *J Wound Care.* 1999; 8(6): 330–334
396. Wysocki AB. Connective tissue: matrix composition and organization. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(5): 556–562
397. Xu N, et al. (2020). Epigenetic regulation in PCOS: mechanisms and therapeutic potential. *Reprod Biol Endocrinol*, 18: 52
398. Xu X, Bi D-C, Li C, Fang W-S, Zhou R, Li S-M, et al. Morphological and proteomic analyses reveal that marine polysaccharides improve ovarian morphology in PCOS rats. *Marine Polysaccharides.* 2020; [volume(issue)]:
399. Yearsley GK, Onley AC, Brown FK, *Australian seafood users manual*. Brisbane : Queensland Department of Primary Industries & Fisheries Research and Development Corporation; 2000.
400. Yildiz B, et al. [Titre de l'article sur l'augmentation de la taille et du poids ovarien dans un modèle SOPK induit chez le rat]. [Revue]. 2021; [volume(issue)]: [pages]
401. Yilmaz M, et al. (2016). Leptin and adiponectin levels in women with PCOS. *Endocrine*, 54(2): 372–382
402. Yong Z, et al. Mangiferin ameliorates polycystic ovary syndrome in rats ... *Sci Rep.* 2024; 14: 11456450
403. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs.* 2015; 13(3): 1133-74
404. Zahouani H, Varchon D, Cenizo V. A new method for measuring wound healing. *J Biomech.* 1992; 25(10): 1223–9
405. Zhang H, et al. Antioxidant and anti-apoptotic effects of cephalopod-derived polysaccharides in reproductive disorders. *Front Endocrinol.* 2022; 13: 883211
406. Zhang W, et al. The therapeutic effects of curcumin on polycystic ovary syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024; 15: 1494852
407. Zhang Y, Wang X, Wang H, Zhao Y, Li W, Luo L, et al. Mangiferin ameliorates letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats by regulating oxidative stress and steroidogenesis. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 1–10

408. Zilhadia Z, Harahap Y, Jaswir I, Anwar E. *Evaluation and Characterization of Hard-Shell Capsules Formulated by Using Goatskin Gelatin*. Polymers. 2022;14(20):4416. doi:10.3390/polym14204416.

Preparation, Characterization and Wound Healing Effect of β Chitosan and Gelatin Hydrogels from *Sepia Officinalis*: In Vivo Study

Amina DOUBBI BOUNOUA¹, Mokhtaria Yasmina BOUFADI^{1,2,3*}, Karima BOUGUEROUA¹, Soumia KEDDARI¹

**Amina DOUBBI BOUNOUA¹,
Mokhtaria Yasmina
BOUFADI^{1,2,3*}, Karima
BOUGUEROUA¹, Soumia
KEDDARI¹**

¹Laboratory of Bioeconomics, Food Safety and Health, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000, ALGERIA.

²Faculty of biology, University of Houari Boumediene USTHB Algiers 16000, ALGERIA.

³Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Libre university of Brussels, 1050 Brussels, BELGIUM.

Correspondence

Mokhtaria Yasmina BOUFADI

Laboratory of Bioeconomics, Food Safety and Health, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000, ALGERIA; faculty of biology, University of Houari Boumediene USTHB Algiers 16000, ALGERIA; Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Libre university of Brussels, 1050 Brussels, BELGIUM.

E-mail: yboufadi@usthb.dz ; yasmina.boufadi@univ-mosta.dz

History

- Submission Date: 11-01-2025;
- Review completed: 22-03-2025;
- Accepted Date: 25-04-2025.

DOI : 10.5530/pj.2025.17.31

Article Available online

<http://www.phcogj.com/v17/i2>

Copyright

© 2025 Phcogj.Com. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

ABSTRACT

Wound healing is a fundamental process through which the body repairs itself following damage to the skin's integrity. This process is intricate and involves multiple biological mechanisms. The objective of this study is to assess the wound healing properties of β -chitosan and gelatin hydrogels. Twenty-five rats were divided into five groups to facilitate the evaluation of wound closure rates and histopathological changes. Upon analyzing the results, we noted a decrease in the initial surface area of all wounds examined. The extent of contraction varied depending on the type of hydrogel used. By day 14, the contraction was most significant in the hydrogel (ch + gel) group (97.30%), followed closely by β -chitosan (96.72%) and gelatin (96.63%), as well as the cicatryl-bio treatment (92.76%).

Key Words: β Chitosan, Gelatin, Hydrogel, Wound Healing, *Sepia Officinalis*, Os, Skin.

INTRODUCTION

Wound healing is a dynamic and intricate process that encompasses inflammation, re-epithelialization, granulation tissue formation, neovascularization, wound contraction, and remodeling of the extracellular matrix, ultimately restoring tissue integrity and homeostasis¹. This process is highly regulated and consists of four distinct phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation or remodeling. Successful repair requires the coordinated action of various cells, growth factors, and cytokines.

Hydrogels possess ideal properties for tissue engineering, such as facilitating moist wound healing, effective fluid absorption, and exceptional water retention². Their porous structure can absorb wound exudate, minimize infection risk, and create an environment conducive to accelerating wound healing. Additionally, the use of natural-synthetic polymer composites in hydrogel production enables the creation of porous structures that exhibit favorable biocompatibility due to the presence of natural polymers.

Chitin is a promising biopolymer that is abundantly available in nature and has been extensively studied for its biocompatibility. Most research on chitin focuses on readily accessible forms, characterized by an antiparallel arrangement of the main chain and strong intermolecular hydrogen bonding. However, β -chitin, as noted by Kurita et al.³, demonstrates significantly higher reactivity and versatility compared to standard chitin due to its parallel main chain arrangement and weaker intermolecular hydrogen bonding. This makes it a suitable candidate for novel biomedical applications. Despite this, β -chitin faces solubility challenges, as it requires strong acidic solvents—such as formic acid—that can irritate human tissues. In contrast, chitosan, which is derived from

the deacetylation of chitin, can be dissolved in water with a small amount of acetic acid, allowing for hydrogel preparation under milder conditions. This positions chitosan as a strong candidate for hydrogel applications in the biomedical field. Furthermore, chitosan can be hydrolyzed by lysozyme, an enzyme found abundantly in animal tissues⁴.

Beta-chitosan (CS), obtained from the deacetylation of chitin predominantly found in squid pens, has gained attention due to the increasing production of squid. It offers unique advantages, including simpler preparation, a higher affinity for solvents, and enhanced biological activity compared to CS derived from crab and shrimp shells^{5,6}.

Gelatin is a protein-rich compound that is commercially sourced from the skins and bones of cattle and pigs. It has a wide range of applications in the food, pharmaceutical, and photographic industries⁷.

As a bio-based polypeptide polymer derived from collagen, gelatin exhibits a less ordered structure due to the absence of triple helices. It is known for its biodegradability and biocompatibility, as well as its excellent solubility in water and capacity to form strong hydrogen bonds. However, its main limitations for medical use include low mechanical strength and rapid degradation. Consequently, it is often used in combination with other materials in mixed formulations⁸.

In light of this, the present study aims to evaluate the healing potential of β -chitosan-gelatin hydrogel for full-thickness skin wounds in Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cuttlebone (*sepia officinalis*)

Cuttlebone (*Sepia officinalis*) was collected from Mostaganem, Algeria, in April 2021. The cuttlebone

Cite this article: DOUBBI BOUNOUA A, BOUFADI MY, BOUGUEROUA K, KEDDARI S. Preparation, Characterization and Wound Healing Effect of β Chitosan and Gelatin Hydrogels from *Sepia Officinalis*: In Vivo Study. Pharmacogn J. 2025;17(2): 244-251.

was thoroughly washed several times with deionized water to eliminate impurities and salts. After washing, it was dried in an oven at 60 °C for 48 hours. The dried cuttlebone was then ground, and the resulting particles were sorted using sieves.

Extraction of β chitin and conversion into β chitosan

β Chitin was isolated from the cuttlebone of *S. officinalis* through a series of processes including demineralization, deproteinization, and decolorization, as outlined by Takiguchi ⁹. Initially, 100 grams of cuttlebone powder was submerged in 1000 ml of a 10% (w/w) hydrochloric acid solution at ambient temperature (25 °C) for 24 hours. After this period, the mixture was filtered, and the remaining solid was thoroughly washed with distilled water until neutral. Next, the residue was treated with 1000 ml of a 10% (w/w) sodium hydroxide solution at 60 °C for another 24 hours to remove proteins. The filtrate was discarded, and the residue was again washed with distilled water to achieve neutrality. This procedure was repeated two additional times. To eliminate ethanol-soluble compounds from the crude β chitin and to dehydrate it, the residue was sequentially treated with 250 ml of 95% and absolute ethanol. Finally, the β chitin (200 g) was dried in an air oven at 50 °C overnight. The isolated β chitin was then converted to β chitosan through deacetylation using a 40% aqueous sodium hydroxide solution and a microwave technique, as described by Sahu et al. ¹⁰.

Preparation of β chitosan

To prepare crude chitosan, 10 grams of β chitin was placed in a ceramic mortar and treated with 100 ml of 50% sodium hydroxide solution at 100 °C for 120 minutes. The ceramic mortar was then positioned in the center of a microwave oven, where it was irradiated for 15 minutes at a power setting of 1000 W. After irradiation, the mixture was filtered, and the remaining solids were washed with distilled water until neutral. The residues were subsequently dried in a hot air oven at 40 °C until they reached a constant weight, and then stored for further analysis. The crude β chitosan was obtained by drying 5 grams of the material in an air oven at 50 °C overnight.

Gelatin extraction

Preparation of cuttlefish skin

Sepia officinalis were sourced from the marine processing industry in Mostaganem City, Mostaganem. The samples were packed in polyethylene bags and placed on ice with a sample-to-ice ratio of approximately 1:3 (w/w) for transport to the research laboratory, which took about 30 minutes. Upon arrival, the samples were washed twice with water to remove the dark ink, composed of melanin granules suspended in a viscous, colorless medium. The cuttlefish by-products were then sorted, and only the outer skin was collected. This skin was stored in sealed plastic bags at 20 °C until it was needed for gelatin extraction and analysis.

Extraction of gelatin from cuttlefish skin using the fish protease-aided process

Gelatin was extracted from cuttlefish skin following the methods described ^{11,12}. The skin was immersed in a 0.05 M sodium hydroxide solution at a skin-to-solution ratio of 1:10 (w/v), with gentle stirring at room temperature. The solution was replaced every hour over a total duration of 6 hours to eliminate non-collagenous proteins. After alkali treatment, the skin was rinsed with distilled water until the wash water reached a neutral pH.

The prepared skin was then bleached using a 5% hydrogen peroxide solution, with a sample-to-solution ratio of 1:10 (w/v) for 48 hours at 4 °C. Following the bleaching process, the skin was washed three times with ten volumes of water.

To extract gelatin, the bleached skin was treated with distilled water at 60 °C for 12 hours, using a sample-to-water ratio of 1:2 (w/v). The mixture was stirred continuously during extraction. Afterward, the extract was centrifuged at 8000 g for 30 minutes at room temperature in a refrigerated centrifuge to separate insoluble materials. The supernatant was collected and freeze-dried, resulting in a product referred to as 'gelatin powder,' which was then subjected to hydrolysis.

A. Preparation of B-chitosan hydrogel

One gram of β -chitosan was dissolved in 7 ml of 1% (v/v) acetic acid. To sterilize the gel and preserve its structure, 0.5 ml of 25% (w/v) glutaraldehyde (GA) was added. The mixture was stirred mechanically for 24 hours. However, some fine particles remained after thorough stirring, so the solution was filtered before use.

B. Preparation of gelatin hydrogel

Gelatin was mixed with acetone in equal proportions (1:1) to precipitate the gel. Following this, 25% (w/v) glutaraldehyde (GA) was added to help maintain the protein structure.

C. Preparation of B-chitosan and gelatin hydrogel

Chitosan hydrogel and gelatin were mixed and shaken for 12 hours at 37 °C to create a chitosan-gelatin mixture. All hydrogels were then poured into polystyrene tissue culture plates (Falcon), which had been pre-frozen at -20 °C for 12 hours. The samples were subsequently lyophilized at -81 °C.

In vivo wound healing activity

Animal model

For this experiment, 25 male Wistar albino rats, each weighing between 100 and 120 g, were obtained from the Pasteur Institute in Algiers, Algeria. The rats were housed in steel cages at room temperature, maintained on a 12-hour light/dark cycle. The cages were cleaned biweekly, and the rats had unrestricted access to water and a standard laboratory diet. Following a two-week acclimatization period, the animals were grouped into five test batches.

Wound creation

Experiment protocol

The dorsal region of each rat was shaved while under anesthesia (50 mg/kg body weight of ketamine) and subsequently disinfected with alcohol. A circular wound with a diameter of 2 cm was then created on the nape of the rats using a round punch, following the method outlined by Morton et al. ¹³.

Grouping of animals

The animals were allocated into five groups, each consisting of five rats: Group 1 received a topical application of β chitosan hydrogel; Group 2 was treated with gelatin hydrogel; Group 3 received a topical application of β chitosan-gelatin hydrogel; Group 4 served as the untreated negative control; and Group 5 was treated topically with Cicatryl-Bio as the positive control.

Evaluation of the Wound Healing Activity

The wound-healing process was assessed by monitoring the progression of each wound excision in both treated and untreated animals every three days.

Evaluation of Wound contraction

The percentage of wound contraction and the epithelialization period were assessed on a daily basis, while histopathological analysis of the

granulation tissue was conducted at the conclusion of the experimental phase. Wound contraction percentage was determined by measuring the wound area.

$$\% \text{ of wound closure} = \frac{\text{Wound area on day 0} - \text{wound area on day n}}{\text{Wound area on day 0}} \times 100$$

n: number of days (4th and 8th)

Histological study

At the end of the experiment, all rats were anesthetized with ketamine at a dose of 150 mg/kg body weight. Wound tissue samples were fixed in 10% formalin solution for more than 6 hours, dehydrated with acetone, cleared with xylene, and embedded in paraffin. A 5 μ m section was stained with hematoxylin and eosin. Histopathological changes were examined using an optical microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Wound healing activity

Macroscopic examination of the rats throughout the experimental period showed the formation of a scar covering the wound, with healing occurring beneath it. Epithelialization started from the wound edges, gradually leading to the detachment of the scar's margins, while the center remained firmly attached to the wound until the epithelialization progressed. In the treated groups, scars softened rapidly following the topical application of treatments. These natural, oily products helped maintain moisture in the excision area, accelerating the separation of necrotic tissue, which was then easily removed.

Body weight evolution

Rats were weighed on the day of skin excision (D0), with subsequent weights recorded every three days throughout the experiment. No significant differences in body weight were observed in the treated groups. Moreover, normal weight gain was noted over time, indicating that the tested formulations did not interfere with the rats' growth.

Wound contraction

The initial wound size was similar across all groups, but different rates of wound size reduction were recorded. Rats in the treated groups showed better wound progression compared to the control group. Notably, wounds treated with β -chitosan and gelatin hydrogel healed faster than those treated with Cicatryl-bio®. It is well-known that free radicals can prolong wound formation, and thus, antioxidant compounds can aid the wound healing process. The antioxidant and free radical-scavenging abilities of β -chitosan and gelatin are attributed to the presence of phenolic acids and flavonoids, which are also known for their antimicrobial and anti-inflammatory properties. Additionally, polyphenols such as tannins and proanthocyanidins, due to their astringent properties, may enhance wound contraction and facilitate the re-epithelialization process. We observed a reduction in the surface area of all wounds studied, though the rate of contraction varied depending on the hydrogel used. By day 14, the contraction was nearly complete for β -chitosan + gelatin hydrogel (97.30%), β -chitosan (96.72%), gelatin (96.63%), and Cicatryl-bio® (92.76%).

Histopathological study

The histological evaluation of excision wounds is summarized in table 2. In this study, the initial increase in wound surface during the first few days of healing is histologically linked to the inflammatory phase.

Three days post- surgery

Microscopic examination of control wounds revealed minimal epithelial tissue regeneration. Infiltration of inflammatory cells and superficial necrotic regions were observed within the first three days of healing. Additionally, the cut edges of the epidermis were thickened, and a demarcation line, formed by polymorphonuclear leukocytes (PMNL), separated the vital tissue from necrotic areas. In wounds treated with chitosan hydrogel, inflammatory cell infiltration was also noted, but granulation tissue formed more quickly compared to the control group.

Table 1: Macroscopic observation of rats.

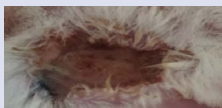
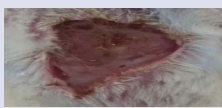
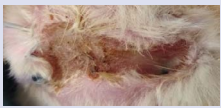
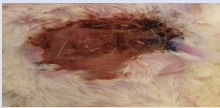
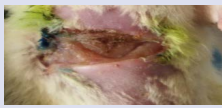
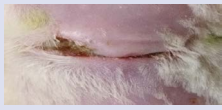
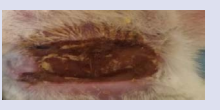
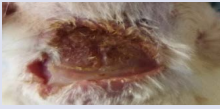
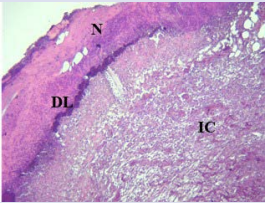
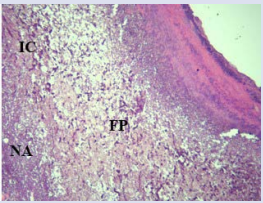
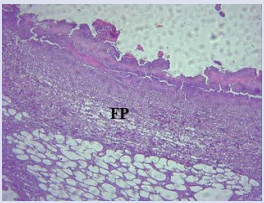
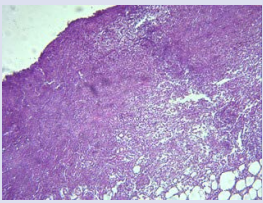
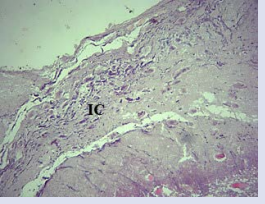
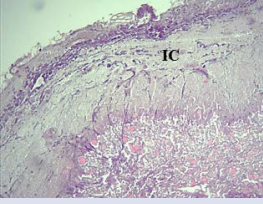
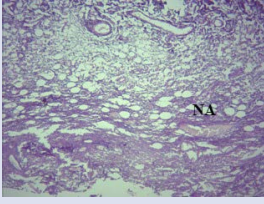
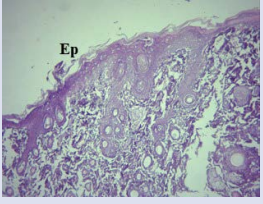
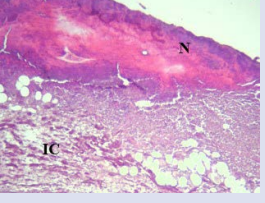
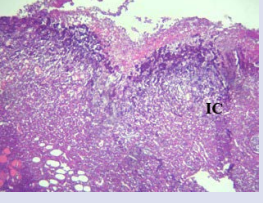
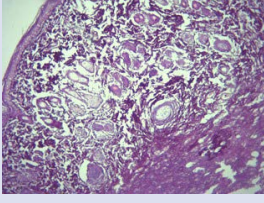
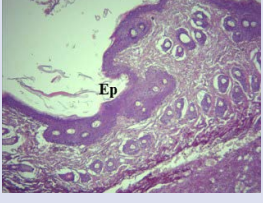
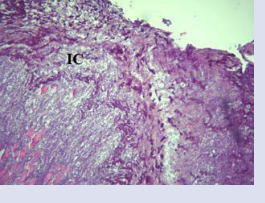
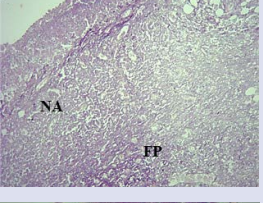
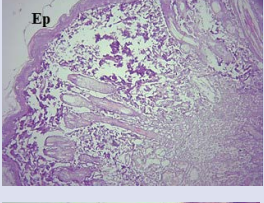
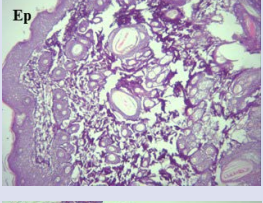
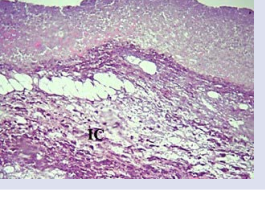
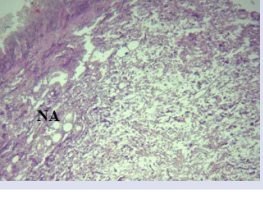
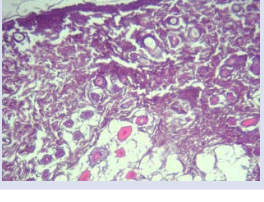
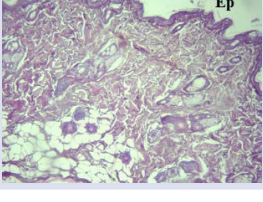
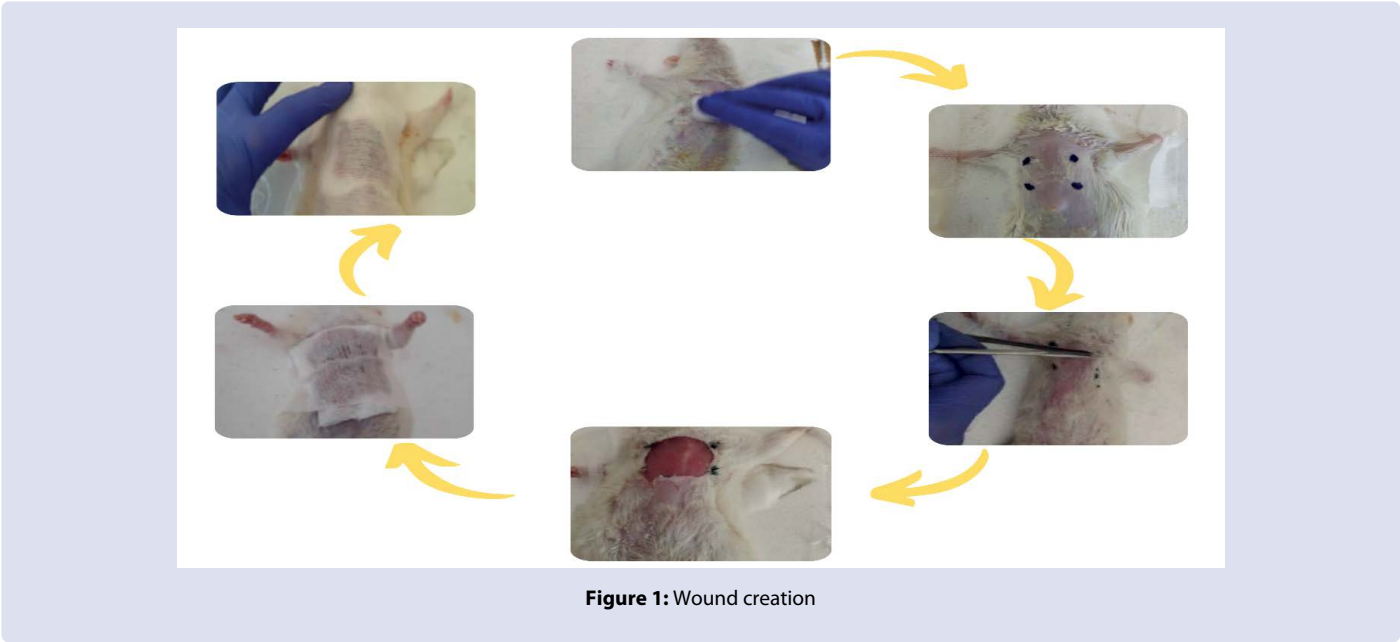
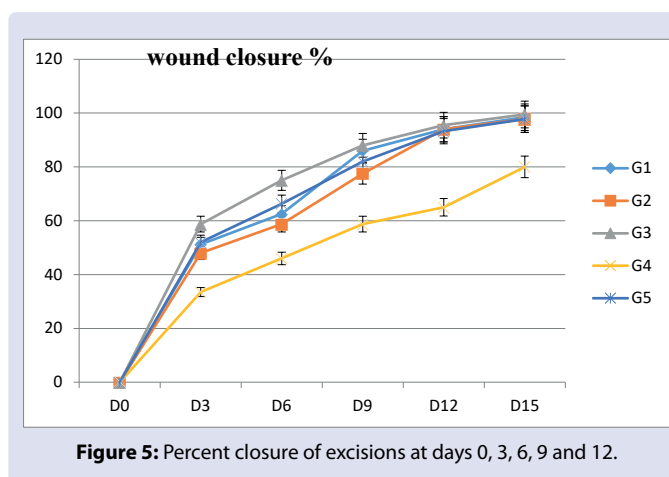
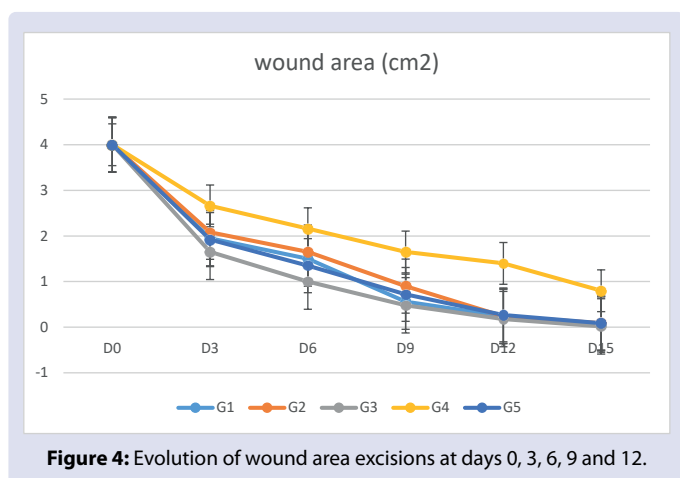
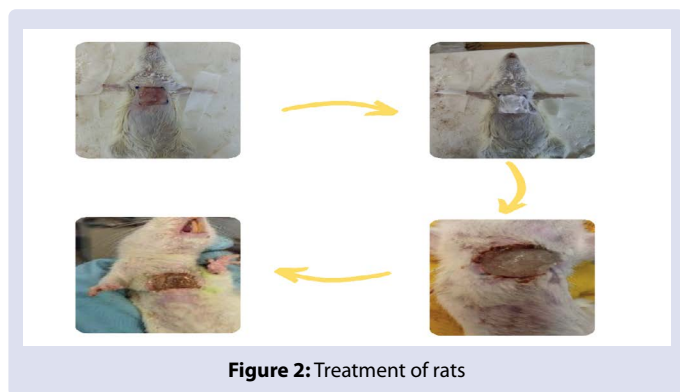
	chitosan	gelatin	Chitosan + gelatin	negative control	Cicatryl-bio
J0					
J3					
J6					
J9					
J12					

Table 2: Histology section of skin tissue (stained with H&E, X100) HE). A: control group, B: Chitosan hydrogel-treated group, C: gelatin hydrogel-treated group, D: chitosan and gelatin hydrogel-treated group, E: cicatryl-bio treated group, DL: demarcation line, Ep: epithelization, FP: fibroblasts proliferation, IC: inflammatory cells, N: necrosis, NA: Neo-angiogenesis.

	Day 03	Day 06	Day 09	Day 12
A				
B				
C				
D				
E				





Similar to the control group, the gelatin hydrogel-treated wounds showed some necrosis at the epidermal edges, with granulation tissue containing inflammatory cells and congested blood vessels. In the group treated with chitosan and gelatin hydrogel, only a few inflammatory cells occupied the granulation tissue, while signs of neo-angiogenesis and fibroblast proliferation were visible in the epidermis.

In the Cicatryl-bio® group, the wound area was covered by regenerated epidermis, with granulation tissue infiltrated by inflammatory cells and congested blood vessels. In all groups, the granulation tissue was insufficient, and the wound areas remained concave.

Six days post- surgery

Moderate dermal inflammation persisted in the control wounds, though fibroblast proliferation and early signs of neo-angiogenesis were evident. Both the chitosan and gelatin hydrogel groups showed regenerated epidermis covering the wound area, with granulation tissue forming through fibroblast migration and proliferation. The group treated with chitosan and gelatin hydrogel exhibited the fastest wound healing, with nearly complete epidermal regeneration six days after surgery. Inflammation had subsided compared to the first three days, and granulation tissue had regenerated. In the Cicatryl-bio® group, a few inflammatory cells remained in the granulation tissue, and new blood vessels were forming in the epidermal layer.

Nine to twelve days post-surgery

In the untreated group, wound healing progressed more slowly, with wound closure taking more than 12 days. The wound area showed reduced size and was covered by epithelial tissue with initial keratin formation, though inflammatory cells were still present in the granulation tissue.

By day 11 post-surgery, wounds in the chitosan and gelatin hydrogel groups had healed faster than the control group and showed healing similar to the Cicatryl-bio® group. Most necrotic tissue in the gelatin-treated group had been replaced by new granulation tissue, and inflammatory cells were absent in the regenerated epidermis. In the group treated with chitosan and gelatin, granulation tissue without inflammatory cell infiltration was observed as early as day 9, with the wound area healing almost perfectly and granulation tissue showing a predominance of collagen fibers. Cicatryl-bio® treatment accelerated the healing process, achieving wound closure in 12 days, compared to the control group. No diffuse inflammatory cells were present in the granulation tissue.

DISCUSSION

Wound healing is a complex and dynamic process that is still not fully understood. It involves a series of biosynthetic and degradative reactions that occur in a coordinated and organized cascade of molecular and cellular events. This process includes inflammation, which plays a crucial role in preventing infection and initiating the proliferation phase necessary for tissue repair¹⁴. Inflammation, characterized by the rapid migration of neutrophils and macrophages to the wound site, must happen quickly to support the following stages: granulation tissue formation, fibrogenesis, neovascularization, wound contraction, and, in the later stages, epithelial resurfacing to close the wound^{15,16}.

Wound healing is an injury response focused on restoring damaged tissue. This process requires the precise coordination of connective tissue repair, re-epithelialization, and angiogenesis to form new tissue and close the wound. It also involves increased fibroblast proliferation and the production of various extracellular matrix proteins and growth factors^{17,18}.

Healing of full-thickness skin wounds occurs through the formation of granulation tissue, wound contraction, and epithelialization¹⁹.

Epithelialization is achieved as undamaged epidermal cells from the wound edges migrate across the granulation tissue²⁰. Supplementing with exogenous collagen has been shown to accelerate the migration of cells involved in skin wound healing. Due to its molecular nature, exogenous collagen integrates seamlessly with wound tissue, supporting endogenous collagen in vivo and promoting cell attachment, migration, and proliferation at the wound site^{21,22}.

Wound contraction serves as an indicator for monitoring the healing process, with wound area gradually decreasing as healing advances. The fibroblast, a key cell in this process, reaches its peak around day 7 post-injury and plays a crucial role in initiating angiogenesis, epithelialization, and collagen formation. In the control group, complete healing occurred within 28 days, resulting in a significant scar due to extensive contraction. In contrast, the β -chitosan and gelatin group achieved full healing within 14 days, showing minimal contraction and leaving a smaller scar compared to the control. Wound contraction refers to the inward movement of wound edges, facilitating closure after injury.

This process is driven by myofibroblasts, which contain α -actin derived from smooth muscle and are responsible for generating contractile forces within the granulation tissue at the wound site²³. The wound healing rate is measured by the overall epithelialization of the wound bed, while wound contraction is evaluated based on the percentage of the original wound area that remains²⁴.

Moderate exudation was observed at the wound site up to day 6 in both chitosan-treated and control wounds, likely due to the inflammatory response triggered by surgical trauma.²⁵ reported a notable reduction in exudation in full-thickness wounds treated with small intestinal submucosa compared to untreated wounds in a rat model. Additionally,²⁶ found an inverse correlation between the survival area of skin grafts and the level of exudation in the graft bed. Other studies have also documented decreased exudate levels in full-thickness wounds treated with acellular matrices in rabbit and rat models as healing progressed²⁷.

The formation of healthy granulation tissue, closely linked to angiogenesis, plays a crucial role in wound healing²⁸. Moderate levels of granulation tissue with new blood vessels were observed at the site of contact with the chitin sponge on days 7 and 14 following subcutaneous implantation of a sponge-like chitin in dogs²⁹. Similar findings were also noted in group 3 of this study.

Chitosan is biocompatible, biodegradable, hemostatic, and anti-infective, and, most importantly, it accelerates wound healing³⁰. Porous chitosan scaffolds offer a promising approach for tissue engineering applications³¹. In experimental animal models, chitosan has been shown to affect all stages of wound repair³². Its hemostatic properties are particularly evident during the inflammatory phase.

It also plays a role in modulating the migration of neutrophils and macrophages, contributing to repair processes such as fibroplasia and epithelialization^{30, 31}. Derivatives of chitin and chitosan are well-tolerated and serve as effective adjuncts, showing significant potential for clinical applications³³. These findings support our own observations that medical-grade, sterilized chitosan powder is a valuable biomaterial that accelerates wound healing. Histological analysis was performed to assess the biological response factors³⁴.

The wound healing process is influenced by several factors, including inflammation, angiogenesis, epithelialization, contraction, collagen synthesis, and remodeling. Numerous clinical and experimental studies have demonstrated the effectiveness of chitosan in promoting wound healing. In comparison to a previous histological study, our results show that beta chitosan hydrogel derived from *Sepia officinalis* accelerates wound healing. This has also been reported for alpha chitosan by various authors. Additionally, studies have indicated that the topical use of gelatin hydrogel can enhance the wound healing process. Our study further demonstrated that combining beta chitosan with gelatin

hydrogel significantly accelerates wound healing, consistent with findings from Shamloo et al.³⁵.

Hydrogels contribute to wound healing by creating an optimal environment, reducing the risk of infection, and facilitating the absorption of exudate².

Furthermore, the rheological properties of hydrogels are crucial in determining their adhesive qualities and their effectiveness in skin regeneration³⁶.

ETHICAL NOTE

All experiments were conducted in accordance with Algerian law (Law No. 95-322/1995) on the protection of animals used for scientific and experimental purposes, following the guidelines of the Algerian Association of Experimental Animal Sciences (AASEA, authorization number 45/DGLPAG/DVA/SDA/14) for the ethical treatment of animals in research.

DECLARATIONS

Credit Authorship Contribution Statement

Amina DOUBBI BOUNOUA: Investigation, Methodology, Formal analysis, Validation, Writing -original draft; **Mokhtaria Yasmina BOUFADI and Soumia KEDDARI:** Conceptualization, Investigation; **Karima BOUGUEROUA:** participated in Animal experiments.

Funding

No funding was available for the current study.

Ethics approval

All rat experiments, were approved by the local animal care, Ethics committee (Abdelhamid ibn Badis University, Mostaganem, Algeria).

Declaration of competing interest

All the authors confirms that there is no financial or other conflicts of interest in this study.

Conflicts of Interest

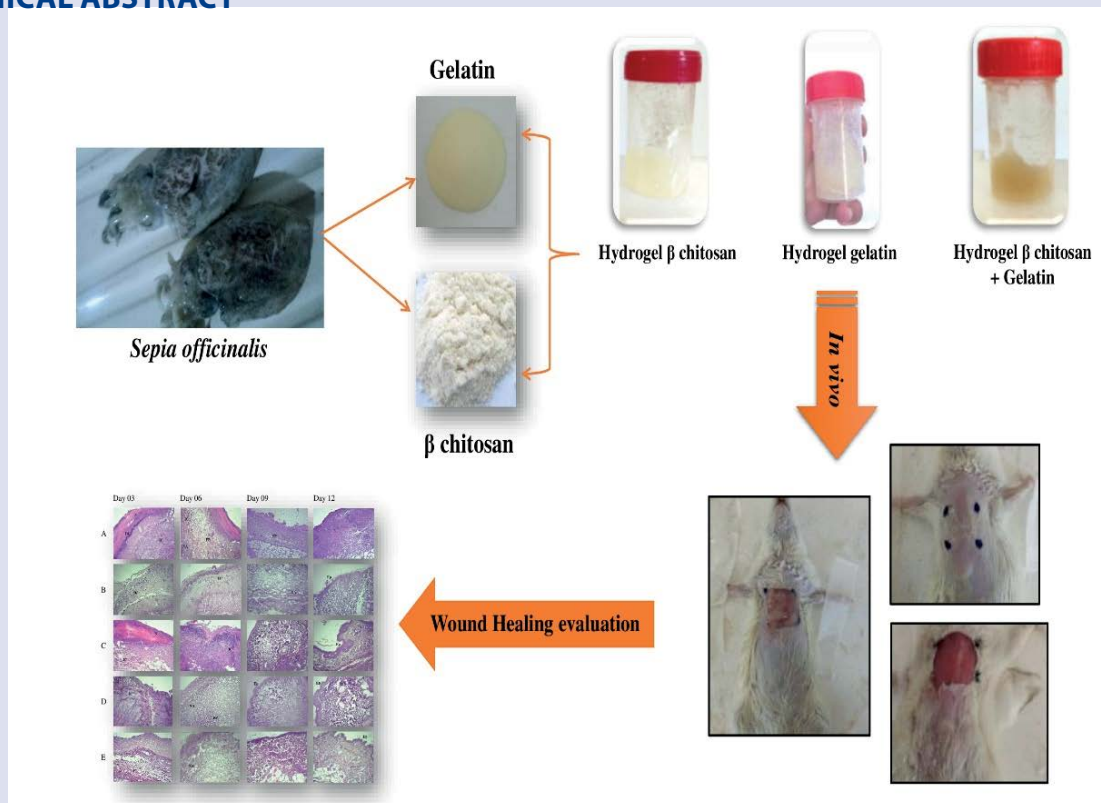
The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- MEGUELLATI, H., OUAFI, S., SAAD, S., et al. Evaluation of acute, subacute oral toxicity and wound healing activity of mother plant and callus of *Teucrium polium* L. subsp. *geyrii* Maire from Algeria. *South African Journal of Botany*, 2019, vol. 127, p. 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.023>
- AHMED, Shakeel et IKRAM, Saiqa. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the life sciences*, 2016, vol. 10, no 1, p. 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>
- KURITA, K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 117-120. doi:10.1016/s0141-3910(97)00160-2 PRIOLA, Aldo, GOZZELINO, Giuseppe, FERRERO, Franco, et al. Properties of polymeric films obtained from uv cured poly (ethylene glycol) diacrylates. *Polymer*, 1993, vol. 34, no 17, p. 3653-3657. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90050-K](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90050-K)
- JUNG, Jooyeoun et ZHAO, Yanyun. Characteristics of deacetylation and depolymerization of β -chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Carbohydrate research*, 2011, vol. 346, no 13, p. 1876-1884. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.05.021>
- SUBHAPRADHA, Namasivayam, RAMASAMY, Pasiyappazham, SHANMUGAM, Vairamani, et al. Physicochemical characterisation of β -chitosan from *Sepioteuthis lessoniana gladius*. *Food chemistry*, 2013, vol. 141, no 2, p. 907-913. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.098>

6. BIGI, Adriana, PANZAVOLTA, Silvia, et RUBINI, Katia. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no 25, p. 5675-5680. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.033>
7. BHATTARAI, Narayan, EDMONDSON, Dennis, VEISEH, Omid, et al. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no 31, p. 6176-6184. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.027>
8. TAKIGUCHI, Y. Preparation of chitosan and partially deacetylated chitin. *chitin, chitosan Jikken manual*, 1991, p. 9-17.
9. SAHU, Abhishek, GOSWAMI, Pranab, et BORA, Utpal. Microwave mediated rapid synthesis of chitosan. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, vol. 20, p. 171-175. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3549-4>
10. GÓMEZ-GUILLÉN, M^a C., TURNAY, J., FERNÁNDEZ-DÍAZ, M. D., et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 2002, vol. 16, no 1, p. 25-34. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00035-2)
11. AEWSIRI, Tanong, BENJAKUL, Soottawat, et VISESSANGUAN, Wonnop. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no 1, p. 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.012>
12. MORTON, J. J. Evaluation of vulnerary activity by open wound procedure in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1972, vol. 196, p. 117-120.
13. BELDON, Pauline. Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 2010, vol. 28, no 9, p. 409-412. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.05.007>
14. WYSOCKI, Annette B. Surgical wound healing: A review for perioperative nurses. *AORN journal*, 1989, vol. 49, no 2, p. 502-524. [https://doi.org/10.1016/S0001-2092\(07\)66673-3](https://doi.org/10.1016/S0001-2092(07)66673-3)
15. WILD, T., Rahbarnia, A., Kellner, M., Sobotka, L., & Eberlein, T. (2010). Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*, 26(9), 862-866. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.05.008>
16. SINGER, Adam J. et CLARK, Richard AF. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 1999, vol. 341, no 10, p. 738-746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>
17. JETTANACHEAWCHANKIT, Suwimon, SASITHANASATE, Siriruk, SANGVANICH, Polkit, et al. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *Journal of pharmacological sciences*, 2009, vol. 109, no 4, p. 525-531. <https://doi.org/10.1254/jphs.08204FP>
18. SCHREML, S., Szeimies, R.-M., Prantl, L., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(5), 866-881. doi:10.1016/j.jaad.2009.10.048
19. SWAIM, Steven F., HENDERSON, Ralph A., et PIDGEON, Rhoda S. *Small animal wound management*. 1990.
20. NITHYA, Mariappan, SUGUNA, Lonchin, et ROSE, Chellan. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2003, vol. 1620, no 1-3, p. 25-31. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00501-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00501-9)
21. JUDITH, R., NITHYA, M., ROSE, C., et al. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. *Life sciences*, 2010, vol. 87, no 1-2, p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.05.003>
22. NEAGOS, DANIELA, MITRAN, VALENTINA, CHIRACU, GEORGETA, et al. Skin wound healing in a free floating fibroblast populated collagen lattice model. *Romanian Journal of Biophysics*, 2006, vol. 16, p. 157-168.
23. SCHALLBERGER, Sandra P., STANLEY, Bryden J., HAUPTMAN, Joe G., et al. Effect of porcine small intestinal submucosa on acute full-thickness wounds in dogs. *Veterinary Surgery*, 2008, vol. 37, no 6, p. 515-524. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2008.00398.x>
24. KIM, Moon Suk, HONG, Keum Duck, SHIN, Hye Won, et al. Preparation of porcine small intestinal submucosa sponge and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat. *International journal of biological macromolecules*, 2005, vol. 36, no 1-2, p. 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.03.013>
25. WANG, Yan, CHEN, Xi, ARMSTRONG, Marilyn Ann, et al. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *Journal of orthopaedic research*, 2007, vol. 25, no 7, p. 926-932. <https://doi.org/10.1002/jor.20385>
26. KAARTHICK, D. T. *Repair of cutaneous wounds using acellular diaphragm and pericardium of buffalo origin seeded with in-vitro cultured mouse embryonic fibroblast cells in rat model*. 2011. Thèse de doctorat. IVRI, Izzat Nagar.
27. CLARK, Richard AF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *Journal of the American academy of Dermatology*, 1985, vol. 13, no 5, p. 701-725. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(85\)70213-7](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(85)70213-7)
28. OKAMOTO, Yoshiharu. The fate of N-acetyl-D-glucosamine (chitin) in canine subcutaneous tissues. *Jpn. J. Biomaterials*, 1995, vol. 13, p. 112-116.
29. ISHIHARA, Masayuki, NAKANISHI, Kuniaki, ONO, Katsuaki, et al. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no 3, p. 833-840. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00189-2)
30. LIN, Hong-Ru, CHEN, Ko-Shao, CHEN, Su-Chen, et al. Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by Na5P3O10. *Materials Science and Engineering: C*, 2007, vol. 27, no 2, p. 280-284. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.03.014>
31. HOWLING, Graeme I., DETTMAR, Peter W., GODDARD, Paul A., et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 2001, vol. 22, no 22, p. 2959-2966. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00042-4)
32. ZAHAROFF, D. A., Rogers, C. J., Hance, K. W., Schlom, J., & Greiner, J. W. (2007). Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*, 25(11), 2085-2094. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.034>
33. JAGANATHAN, Kishore, OYMAK, Samet, et HASSIBI, Babak. Phase retrieval for sparse signals using rank minimization. In : *2012 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP)*. IEEE, 2012. p. 3449-3452. <https://doi.org/10.1109/ICASSP.2012.6288658>
34. SHAMLOO, Amir, AGHABABAIE, Zahra, AFJOUL, Homa, et al. Fabrication and evaluation of chitosan/gelatin/PVA hydrogel incorporating honey for wound healing applications: An in vitro, in vivo study. *International journal of pharmaceuticals*, 2021, vol. 592, p. 120068. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120068>
35. SHAMLOO, A., Sarmadi, M., Aghababaie, Z., & Vossoughi, M. (2018). Accelerated full-thickness wound healing via sustained bFGF delivery based on a PVA/chitosan/gelatin hydrogel incorporating PCL microspheres. *International journal of pharmaceuticals*, 537(1-2), 278-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.045>

GRAPHICAL ABSTRACT



Cite this article: DOUBBI BOUNOUA A, BOUFADI MY, BOUGUEROUA K, KEDDARI S. Preparation, Characterization and Wound Healing Effect of β Chitosan and Gelatin Hydrogels from *Sepia Officinalis*: *In Vivo* Study. *Pharmacogn J.* 2025;17(2): 244-251.