



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRY OF HIGHER EDUCATION AND SCIENTIFIC RESEARCH

جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي

ECHAHID HAMMA LAKHDAR UNIVERSITY OF EL-OUED

كلية العلوم الطبيعية والحياة

FACULTY OF NATURAL LIFE AND SCIENCES

قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Department of Cellular and Molecular Biology

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

En vue de l'obtention du Master académique en sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

### Thème

# Effets Synergiques d'un Hydrogel à Base de Chitosane et de la Thérapie par *Hirudo medicinalis* (*Hirudo orientalis*) dans la Cicatrisation des Plaies Diabétiques : Etude Mécanistique *In* *Vitro et In Vivo*

Présenté par :

Miss: BEN AOUN Nour el Houda

Miss: HASSAN Aya

Miss: KHELLOUT Nour el Yakin

Miss: LABADI Badra

Membres du jury:

|                                     |     |                    |
|-------------------------------------|-----|--------------------|
| Président : Dr. LAICH Ammar touhami | MCA | Université El-Oued |
| Examineur : Dr. BOURAS Yassine      | MCA | Université El-Oued |
| Superviseur : Dr. LAIB Ibtissam     | MCB | Université El-Oued |

Année universitaire : 2025/2026

# بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إهداء

"وَأَخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ"

عظم المراد فهان الطريق

فجاءت لذة الوصول... لتمدحي مشقة السنين

الحمد لله الذي ماتيقنت به خيرا وأملا

إلا وأغرقني سرورا

هذه اللحظة ليست ميراثاً ولا تُشتري بثمن، إنها حصيلة عمري وشبابي، سهر ليلي وخوفي، دموع شوقي وألمي. إنها لهفة الوصول ودمعة الحزن التي تلاشت، لتشرق فرحة العمر. هذه هي النهاية السعيدة التي تستحق كل بداية عظيمة، حيث أصبح حلمي حقيقة

أهدي ثمرة جهدي هذه إلى أجمل ما منحتني الحياة، إلى النور الذي أضاء طريقي، والسند الذي لم يَمِلْ يوماً، إلى القلبين اللذين كانا لي وطنًا وأمانًا، إلى من كان دعاؤهما يسبق خطاي، إلى من بذلو جهد السنين من أجلي "أبي" و"أمي"

أهدي ثمرة جهدي إلى إخوتي، إلى من وقفوا بجانبني في السراء والضراء، ولكل روح عانقتني بالحب والدعوات. شكراً لكل من كان في طريقي، استندت عليه أو مر عابراً، شكراً لكل من علمني كلمة أو مهارة.

وإلى أستاذتي "العايب ابتسام" لعلمها الغزير وتوجيهها السديد، فجزاها الله خيرا

نور الهدى..

## إهداء

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات، وبفضله تُنجز الغايات، الحمد لله حمداً يليق بجلال وجهه وعظيم سلطانه، على التوفيق والتمام والإنجاز.

إلى من كان لي النور حين أظلمت الطرق، والسند حين اشتدّ التعب، إلى من حمل همّي قبل أن أحمله، وبذل الغالي والنفيس لأجل راحتي ونجاحي، إلى أبي الغالي، مصدر الفخر والقوة، أطل الله في عمره وألبسه ثوب الصحة والعافية.

وإلى من لا تُقاس كلماتها بمداد، ولا يُوقى فضلها بعبارات، إلى القلب الذي ينبض حباً وحناناً، إلى من كانت دعواتها تحقني في كل خطوة، وابتسامتها تمنحني الأمل مهما اشتدت الظروف، إلى أمي الحبيبة، نبض الحياة وسر الطمأنينة، حفظها الله وأدامها نوراً في حياتي.

وإلى إخوتي الذين كانوا لي جناحاً أستند إليه، وسنداً أواجه به صعوبات الطريق، فكانوا لي العون بعد الله، ورفقاء الدرب في كل المواقف.

وإلى أستاذتي الفاضلة "العايب ابتسام"، التي أنارت لي طريق البحث بعلمها وتوجيهها، وكانت مثلاً للعطاء والصبر، فجزاها الله عني خير الجزاء وبارك في علمها وعمرها

وإلى صديقتي وكل من كان لي قريباً ودعماً، إلى من زرعوا في أيامي الأمل بكلمة، والدعم بدعاء، والتشجيع بلطف حضورهم، فكانوا لي أثراً لا يُنسى.

وإلى كل من آمن بي، ووقف معي ولو بكلمة طيبة، أو دعوة صادقة، أو ابتسامة دعم، لهم مني امتنان لا يُكتب، ووفاء لا ينتهي.

وفي الختام، هذا العمل ثمرة جهدٍ وسعي، أضعه بين يدي الله ، راجية القبول والتوفيق، وأن يكون علماً نافعاً وخيراً ممتداً بإذن الله.

آية..

## إهداء

بكل مشاعر الامتنان والتقدير، أهدي هذا العمل المتواضع

إلى والديّ العزيزين،

منبع الحب والعطاء، شكرًا لكما على دعمكما الدائم، وتشجيعكما المستمر، وثقتكما الكبيرة بي. لقد كنتما دائمًا مصدر قوتي وأعظم سند في حياتي

إلى عائلتي وإخوتي،

شكرًا لمحبتكم، وصبركم، ودعمكم المعنوي طوال هذا المشوار. أسأل الله أن يرزقكم النجاح والتوفيق، وأن يبلغكم ما بلغني

إلى أساتذتي ومؤطرتي،

تقديرًا لمساعدتهم ونصائحهم القيّمة التي ساهمت في إثراء مساري العلمي

إلى كل من ساندني من قريب أو بعيد، ولو بكلمة طيبة أو دعوة صادقة

وأخيرًا، إلى نفسي،

على الصبر والمثابرة والإصرار الذي مكّني من تجاوز الصعوبات وبلوغ هذا الإنجاز

فلتكن هذه المذكرة ثمرة جهدٍ ومسارٍ تميّز بالأمل والعمل.

بدرة..

## إهداء

اللهم صل وسلم وبارك على سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين ،

أما بعد

الحمد لله حمدا كثيرا طيبا مباركا فيه ، الذي بنعمته تتم الصالحات ، وبفضله و  
توفيقه اكتمل هذا العمل وبلغ غايته ، فما كان لهذا الإنجاز أن يرى النور لولا فضل  
الله عز وجل أولا وآخرا ، أهدي تخرجي هذا إلى سندي في الحياة ، ونبع الحنان و  
العطاء ، أُمي الغالية ، التي كانت لي القوة والدعاء والدعم في كل خطوة ، فلولا  
مساندتها وصبرها لما وصلت إلى ما أنا عليه اليوم ، أسأل الله أن يحفظها ويديمها  
تاجا فوق رأسي

كما أهديه إلى روح والدي وجدي الغاليين ، رحمهما الله رحمة واسعة ، راجية من الله  
أن يكونا فخورين بي ، وأن يجعل هذا النجاح نورا يصل إليهما في عليين  
ولا أنسى أقاربي وأحبائي وكل من كان لي عوناً وسندا في الأوقات الصعبة ، فكان  
لكلماتهم ودعمهم أثر كبير في مواصلة الطريق بثبات وأمل  
وأحمد الله تعالى على أن وفقني للوصول إلى هذا المستوى ، وأسأله أن يجعل هذا  
العمل سببا في إدخال الشفاء والسرور إلى قلوب مرضى السكري ، وأن ينفع به  
الناس و يجعله خالصا لوجهه الكريم .

كما أتقدم بخالص الشكر والامتنان إلى كل أستاذ علمني حرفا ، وكان له فضل في  
مسيرتي الجامعية والعلمية ، فلهم مني كل التقدير والاحترام .

نور اليقين..

## Résumé

Cette étude avait pour objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique synergique d'un hydrogel bioactif associant le chitosane et un extrait de sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis*) dans l'amélioration de la cicatrisation des plaies diabétiques expérimentales. Cette approche innovante repose sur l'exploitation combinée des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticoagulantes, antibactériennes et régénératives des deux biomatériaux naturels afin de cibler simultanément les principaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans le retard de cicatrisation diabétique.

Le chitosane a été extrait à partir des carapaces de *Parapenaeus longirostris* selon un procédé comprenant la déminéralisation, la déprotéinisation, la décoloration et la désacétylation, tandis que les substances biologiquement actives (BAS) ont été obtenues à partir des sangsues par lyophilisation suivie d'une extraction saline. Le rendement d'extraction du chitosane était de 5,67 %. La caractérisation physicochimique réalisée par UV-Visible, FTIR, diffraction des rayons X (XRD) et microscopie électronique à balayage (MEB/SEM) a confirmé la qualité structurale du chitosane, avec une teneur en cendres de 0,8 % et un degré de désacétylation de 62,67 %, révélant une structure poreuse favorable aux applications biomédicales.

Les analyses biologiques *in vitro* ont montré que l'extrait de sangsue possède une activité anti-inflammatoire remarquable ( $IC_{50} = 486,67 \mu\text{g/mL}$ ) ainsi qu'une forte inhibition de la peroxydation lipidique ( $IC_{50} = 70,12 \mu\text{g/mL}$ ), tandis que le chitosane a présenté une activité antibactérienne significative contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'étude *in vivo* réalisée chez des rats Wistar diabétiques induits par l'alloxane a révélé que l'hydrogel synergique induisait une contraction quasi complète des plaies dès le 11<sup>e</sup> jour, associée à une amélioration histologique marquée caractérisée par une réépithélialisation avancée, une synthèse dense de collagène, une néoangiogenèse fonctionnelle et une restauration des annexes cutanées.

Ces résultats démontrent que l'hydrogel chitosane-*Hirudo medicinalis* constitue une alternative thérapeutique naturelle, multifonctionnelle et prometteuse pour la prise en charge des plaies diabétiques chroniques.

**Mots-clés :** *Hirudo medicinalis* ; chitosane ; plaies diabétiques ; hydrogel bioactif ; cicatrisation ; activité antioxydante ; activité antibactérienne ; activité anti-inflammatoire ; rats Wistar.

## Abstract

This study aimed to evaluate the synergistic therapeutic potential of a bioactive hydrogel combining chitosan and medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) extract in enhancing the healing of experimental diabetic wounds. This innovative approach was based on the combined exploitation of the antioxidant, anti-inflammatory, anticoagulant, antibacterial, and regenerative properties of these two natural biomaterials in order to simultaneously target the major pathophysiological mechanisms involved in delayed diabetic wound healing.

Chitosan was extracted from the shells of *Parapenaeus longirostris* through a multistep process including demineralization, deproteinization, decolorization, and deacetylation, whereas biologically active substances (BAS) were obtained from medicinal leeches by lyophilization followed by saline extraction. The extraction yield of chitosan reached 5.67%. Physicochemical characterization using UV–Visible spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM) confirmed the structural quality of the extracted chitosan, showing an ash content of 0.8% and a degree of deacetylation of 62.67%, with a porous morphology favorable for biomedical applications.

*In vitro* biological assays demonstrated that the leech extract exhibited remarkable anti-inflammatory activity ( $IC_{50} = 486.67 \mu\text{g/mL}$ ) and strong inhibition of lipid peroxidation ( $IC_{50} = 70.12 \mu\text{g/mL}$ ), whereas chitosan displayed significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The *in vivo* study conducted on alloxan-induced diabetic Wistar rats revealed that the synergistic hydrogel induced nearly complete wound contraction by the 11th day, accompanied by marked histological improvement characterized by advanced re-epithelialization, dense collagen deposition, functional neoangiogenesis, and restoration of skin appendages.

These findings demonstrate that the chitosan–*Hirudo medicinalis* hydrogel represents a promising natural and multifunctional therapeutic alternative for the management of chronic diabetic wounds.

**Keywords:** *Hirudo medicinalis*; chitosan; diabetic wounds; bioactive hydrogel; wound healing; antioxidant activity; antibacterial activity; anti-inflammatory activity; Wistar rats.

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم الإمكانيات العلاجية التأزرية لهيدروجيل حيوي يجمع بين الكيتوزان ومستخلص العلقـة الطبية (*Hirudo medicinalis*) في تحسين التئام الجروح السكرية التجريبية. وتعتمد هذه المقاربة المبتكرة على الاستفادة المشتركة من الخصائص المضادة للأكسدة، والمضادة للالتهاب، والمضادة للتخثر، والمضادة للبكتيريا، إضافةً إلى الخصائص التجديدية لهاتين المادتين الحيويتين الطبيعتين، بهدف استهداف الآليات الفيزيولوجية المرضية الرئيسية المسؤولة عن تأخر التئام الجروح لدى مرضى السكري.

تم استخلاص الكيتوزان من قشور الروبيان *Parapenaeus longirostris* عبر عدة مراحل شملت إزالة المعادن، وإزالة البروتينات، وإزالة الأصباغ، ثم نزع الأسيتيل، في حين تم الحصول على المواد الحيوية الفعالة من العلقـة الطبي بواسطة التجفيف بالتجميد متبوعاً بالاستخلاص الملحي. وقد بلغ مردود استخلاص الكيتوزان 5.67%. كما أكدت التحاليل الفيزيائية والكيميائية باستخدام مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، ومطيافية الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه (FTIR)، وحيود الأشعة السينية (XRD)، والمجهر الإلكتروني الماسح (SEM)، الجودة البنيوية للكيتوزان المستخلص، حيث أظهر محتوى رماد بلغ 0.8% ودرجة نزع أسيتيل قدرها 62.67%، مع بنية مسامية ملائمة للتطبيقات الطبية الحيوية.

أظهرت الاختبارات البيولوجية المخبرية أن مستخلص العلقـة يمتلك نشاطاً قوياً مضاداً للالتهاب ( $IC_{50} = 486.67$   $\mu\text{g/mL}$ ) وقدرة عالية على تثبيط بيروكسدة الدهون ( $IC_{50} = 70.12$   $\mu\text{g/mL}$ )، بينما أظهر الكيتوزان نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*. كما كشفت الدراسة الحيوانية المنجزة على فئران ويستار المصابة بالسكري المستحث بالألوكسان أن الهيدروجيل التأزري أدى إلى انكماش شبه كامل للجروح بحلول اليوم الحادي عشر، مترافقاً مع تحسن نسيجي ملحوظ تميز بإعادة تكوين الظهارة، وترسب كثيف للكولاجين، وتكوّن أوعية دموية جديدة وظيفية، إضافة إلى استعادة ملحقات الجلد.

تؤكد هذه النتائج أن هيدروجيل الكيتوزان-العلقـة الطبية يمثل بديلاً علاجياً طبيعياً ومتعدد الوظائف واعدًا لعلاج الجروح السكرية المزمنة.

**الكلمات المفتاحية:** العلقـة الطبية؛ الكيتوزان؛ الجروح السكرية؛ الهيدروجيل الحيوي؛ التئام الجروح؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ النشاط المضاد للبكتيريا؛ النشاط المضاد للالتهاب؛ فئران ويستار.

## Liste des Figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig. 1.</b> Mécanisme du diabète – déficit en insuline et accumulation de glucose dans le sang ( <i>Vijayaraghavan &amp; Crabtree, n.d</i> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 7  |
| <b>Fig. 2.</b> Les processus physiologiques des plaies normales et des plaies diabétiques ( <i>Han et al., 2025</i> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 13 |
| <b>Fig. 3.</b> Ordre séquentiel des phases de la cicatrisation adaptée d’après ( <i>Spitalnik, n.d.</i> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 17 |
| <b>Fig. 4.</b> Illustration des quatre phases du processus de cicatrisation. (1) Hémostase : L’agrégation plaquettaire et la formation d’un caillot de fibrine scellent la plaie. (2) Inflammation : Les neutrophiles et les macrophages éliminent les débris et initient la la signalisation immunitaire. (3) Prolifération : La migration des kératinocytes, l’activation des fibroblastes, le dépôt de matrice extracellulaire et l’angiogenèse restaurent la structure tissulaire. (4) Remodelage : La cicatrisation se poursuit par la réorganisation des fibres de collagène et la maturation de la cicatrice ( <i>Heo, 2025</i> ). ....                               | 18 |
| <b>Fig. 5 .</b> <i>Hirudo orientalis</i> ( <i>Habeeb &amp; Al-Warid, 2025</i> ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 20 |
| <b>Fig. 6.</b> <i>Hirudo orientalis</i> , vue dorsale et ventrale ; cavité buccale (cv) ( <i>Bilal &amp; Ahmed, 2023</i> ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 22 |
| <b>Fig. 7.</b> Structures chimiques des principaux peptides dérivés des sangsues qui inhibent l'anticoagulation et les protéases. (a) Hirudine, un puissant inhibiteur de la thrombine et un anticoagulant bien connu, (b) Églotine C, une petite protéine qui inhibe l'élastase des neutrophiles et les enzymes de type chymotrypsine, et (c) Antistatine, qui cible le facteur Xa et joue un rôle dans la prévention de la progression de la cascade de coagulation. Ces composés démontrent la diversité structurale des molécules bioactives salivaires des sangsues responsables des effets anticoagulants et anti-inflammatoires ( <i>Raghavi et al., 2026</i> ). .... | 26 |
| <b>Fig. 8.</b> Traitement d'un hématome par les sangsues médicinales. (A) Hématome de la cuisse latérale droite avant le traitement, (B) Application des sangsues médicinales sur l'hématome, (C) Résolution complète de l'hématome après le traitement ( <i>Marquez-Gil et al., 2023</i> ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 27 |
| <b>Fig. 9.</b> Structure chimique de la chitine et du chitosane ( <i>Alemu &amp; Mondal, 2023</i> ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 28 |
| <b>Fig. 10.</b> Diverses sources pour l'extraction de la chitine et sa conversion ultérieure en chitosane ( <i>Karimlar et al., 2026</i> ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 29 |
| <b>Fig. 11.</b> Mécanismes antimicrobiens du chitosane [44] ( <i>Alemu &amp; Mondal, 2023</i> ) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 33 |
| <b>Fig. 12.</b> Le processus de cicatrisation de la peau lésée : le chitosane inhibe la croissance bactérienne et accélère le processus de cicatrisation grâce à des facteurs de cicatrisation tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ( <i>Mawazi et al., 2024</i> ). ....                                                                                                                                                                                                                                                     | 34 |
| <b>Fig. 13.</b> Illustration d'une porte logique ET permettant la libération d'un médicament à partir d'un hydrogel. Le médicament est libéré uniquement si les polymères 1 et 2 sont activés simultanément par les facteurs de stimulation 1 et 2 ( <i>Dinh et al., 2025</i> ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 35 |
| <b>Fig. 14.</b> Sangsues médicinales (Image originale) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 40 |
| <b>Fig. 15.</b> Carapaces des crevettes (Image originale) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 41 |
| <b>Fig. 16.</b> Extraction de la substance biologique active (BAS) à partir des sangsues .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 43 |
| <b>Fig. 17.</b> Extraction du chitosane.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>Fig. 18.</b> Poudre de chitosane (Image originale). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 45 |
| <b>Fig. 19.</b> Induction expérimentale du diabète chez les rates .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 52 |
| <b>Fig. 20.</b> Schéma illustrant le protocole expérimental et l’induction de la plaie dorsale chez le rat.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 53 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig. 21.</b> Spectres UV-Vis du chitosane. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 60 |
| <b>Fig. 22.</b> Spectres FTIR du chitosane. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 61 |
| <b>Fig. 23.</b> Diagramme de diffraction XRD du chitosane. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 62 |
| <b>Fig. 24.</b> Images MEB du chitosane .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 63 |
| <b>Fig. 25.</b> Représentation schématique de la formation de l'hydrogel à base de chitosane ( <i>Maiz-Fernández et al., 2022</i> ) .....                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| <b>Fig. 26.</b> Formulation d'un hydrogel a base chitosan (Image originale). ....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 72 |
| <b>Fig. 27.</b> Croissance bactérienne représentative sur des milieux de culture sélectifs et différentiels après inoculation d'échantillons de plaies prélevés sur des souris expérimentaux (Image originale). ....                                                                                                                                   | 83 |
| <b>Fig. 28.</b> Effet de différents traitements sur la contraction de la plaie (%) au fil du temps chez les rats diabétiques. ....                                                                                                                                                                                                                     | 86 |
| <b>Fig. 29.</b> Photographies représentatives de l'évolution de la cicatrisation des plaies chez des rats diabétiques selon les groupes de traitement : (A) Contrôle des plaies diabétiques non traité, (B) traité aux sangsues, (C) traité au chitosane, (D) traité aux sa sangsues + chitosane, et (E) traité à la pommade de référence (Zeta). .... | 87 |
| <b>Fig. 30.</b> Photomicrographies représentatives des coupes histologiques montrant la structure tissulaire des plaies chez les rats diabétiques selon les groupes : (A) témoin non traité, (B) traité aux sangsues, (C) traité au chitosane, (D) traité aux sangsues + chitosane, et (E) traité à la pommade de référence ( Zeta). ....              | 90 |

## Liste des Tableaus

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1:</b> des types et causes du diabète ( <i>Bozkir, 2022</i> ).....                                                                                | 8  |
| <b>Tableau 2:</b> Phases de la cicatrisation des plaies ( <i>Orsted et al., 2011</i> ). ....                                                                 | 18 |
| <b>Tableau 3:</b> Classification taxonomique de <i>Hirudo orientalis</i> ( <i>Bilal &amp; Ahmed, 2023</i> ) .....                                            | 21 |
| <b>Tableau 4:</b> Tableau récapitulatif des diverses molécules identifiées dans la salive de sangsue et leur rôle chez l'Homme ( <i>Le Reun, 2023</i> )..... | 23 |
| <b>Tableau 5 :</b> Caractéristiques de l'extrait de chitosane. ....                                                                                          | 59 |
| <b>Tableau 6:</b> Niveaux IC50 d'Activité antioxydante des deux extraits (Sangsues et Chitosane) .....                                                       | 64 |
| <b>Tableau 7:</b> Niveaux IC50 d'Activité anti inflammatoire des deux extraits (Sangsues et Chitosane).....                                                  | 65 |
| <b>Tableau 8:</b> Activité anticoagulante de l'extrait de Sangsues .....                                                                                     | 66 |
| <b>Tableau 9:</b> Niveaux IC50 pour L'inhibition de la peroxydation lipidique (MDA) des extraits (Sangsues et Chitosane) .....                               | 68 |
| <b>Tableau 10 :</b> Résultats des tests antimicrobiens de l'extrait de la sangsue.... <b>Error! Bookmark not defined.</b>                                    |    |
| <b>Tableau 11 :</b> Résultats des tests antimicrobiens du chitosane.....                                                                                     | 69 |
| <b>Tableau 12:</b> Caractérisation physicochimique de l'hydrogel formulé .....                                                                               | 71 |
| <b>Tableau 13:</b> Impact de différents traitements sur les indices hématologiques chez les animaux d'expérience.....                                        | 75 |
| <b>Tableau 14:</b> Impact de différents traitements sur la variation de la glycémie .....                                                                    | 79 |
| <b>Tableau 15:</b> Évaluation des marqueurs inflammatoires et infectieux (CRB et ASLO).....                                                                  | 80 |
| <b>Tableau 16:</b> Isolement et abondance relative des bactéries identifiées dans cinq échantillons de prélèvements de plaies.....                           | 81 |

## Sommaire

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Remerciements .....     |  |
| Résumé.....             |  |
| Liste des Figures.....  |  |
| Liste des Tableaux..... |  |
| Sommaire .....          |  |

## Partie I théorique

### Chapitre I: Diabète et retard de cicatrisation

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Abstract.....                                                             |    |
| Introduction .....                                                        | 1  |
| 1. Définition du diabète.....                                             | 7  |
| 2. Types et causes du diabète.....                                        | 7  |
| 3. Physiopathologie du diabète.....                                       | 8  |
| 3.1 Diabète de type 1.....                                                | 8  |
| 3.2 Diabète de type 2.....                                                | 9  |
| 3.3 Diabète gestationnel.....                                             | 10 |
| 4. Diabète et stress oxydatif .....                                       | 10 |
| 4.1 La production de radicaux libres au cours du diabète .....            | 10 |
| 4.2 Altération des défenses antioxydantes au cours du diabète.....        | 11 |
| 4.3 Augmentation des marqueurs de stress oxydant au cours du diabète..... | 11 |
| 5. Les complications du diabète .....                                     | 11 |
| 6. Retard de cicatrisation des plaies diabétiques.....                    | 12 |
| 6.1 Hyperglycémie.....                                                    | 12 |
| 6.2 Microangiopathie.....                                                 | 12 |
| 6.3 Immunodéficiência.....                                                | 12 |
| 6.4 Neuropathie.....                                                      | 13 |
| 6.5 Infection.....                                                        | 13 |
| 6.6 Autres complications :.....                                           | 13 |

## Chapitre II:

### Bases biologiques de la cicatrisation

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 1. Cicatrisation des plaies .....                          | 15 |
| 2. Étapes de la cicatrisation des plaies.....              | 15 |
| a) Phase hémostatique et inflammatoire (0 à 3 jours) ..... | 15 |
| b) Phase de prolifération : 3 à 24 jours .....             | 16 |
| c) Phase de maturation : 24 jours – 1 an.....              | 16 |

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| d) Facteurs de croissance et leur influence sur la cicatrisation ..... | 17 |
|------------------------------------------------------------------------|----|

### Chapitre III:

#### La sangsue medicinalis & Le chitosane & L'hydrogel

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. La sangsue medicinalis (Hirudo medicinalis).....</b>              | <b>20</b> |
| 1.1 Définition.....                                                     | 20        |
| 1.2 Histoire de l'hirudothérapie .....                                  | 20        |
| 1.3 Classification taxonomique de Hirudo orientalis .....               | 21        |
| 1.4 Caractéristiques morphologiques de Hirudo orientalis.....           | 21        |
| 1.5 Composants et propriétés des sangsues medicinalis.....              | 23        |
| 1.6 Sangsues medicinalis et cicatrisation des plaies.....               | 26        |
| <b>2. Le chitosan .....</b>                                             | <b>27</b> |
| 2.1 Aperçu historique .....                                             | 27        |
| 2.2 Définition de la chitine.....                                       | 27        |
| 2.3 Définition du chitosane .....                                       | 28        |
| 2.4 Sources naturelles de chitosane .....                               | 28        |
| 2.5 Propriétés physicochimiques du chitosane. ....                      | 29        |
| 2.5.1 Solubilité .....                                                  | 30        |
| 2.5.2 Masse moléculaire.....                                            | 30        |
| 2.5.3 Degré de désacétylation .....                                     | 30        |
| 2.5.4 Viscosité .....                                                   | 31        |
| 2.6 Propriétés biologiques .....                                        | 31        |
| 2.6.1 Activité anti-inflammatoire et antimicrobienne du chitosane. .... | 32        |
| 2.6.2 Mécanisme d'action antibactérien du chitosane .....               | 32        |
| 2.7 Rôle dans la cicatrisation.....                                     | 33        |
| <b>3. Hydrogels .....</b>                                               | <b>35</b> |
| 3.1 Définition.....                                                     | 35        |
| 3.2 Classification des hydrogels.....                                   | 35        |
| 3.2.1 Hydrogels naturels.....                                           | 36        |
| 3.2.2 Hydrogels synthétiques .....                                      | 36        |
| 3.2.3 Hydrogels composites .....                                        | 36        |
| 3.3 Applications des hydrogels dans la cicatrisation des plaies : ..... | 36        |
| 3.4 Hydrogels à base de chitosane pour le traitement des plaies .....   | 37        |

### Partie II pratique

#### Chapitre I: Matériel & méthodes

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| <b>1. Matériel .....</b>       | <b>40</b> |
| 1.1 Matériel biologique .....  | 40        |
| 1.1.1 Sangsue médicinale ..... | 40        |
| 1.1.2 Les crevettes .....      | 40        |
| 1.2 Matériel animal .....      | 41        |
| 1.3 Souches bactériennes ..... | 41        |

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.4 Produits chimiques et réactifs .....                                                                   | 41        |
| <b>2. Méthodes .....</b>                                                                                   | <b>42</b> |
| 2.1 Étude <i>in vitro</i> .....                                                                            | 42        |
| 2.1.1 Extraction de la Substance Biologique Active (BAS) .....                                             | 42        |
| 2.1.2 Extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes .....                                    | 43        |
| 2.1.2.1 Préparation de la matière première .....                                                           | 43        |
| 2.1.2.2 Extraction du chitosane .....                                                                      | 43        |
| a. Déminéralisation .....                                                                                  | 43        |
| b. Déprotéinisation .....                                                                                  | 44        |
| c. Décoloration .....                                                                                      | 44        |
| d. Désacétylation .....                                                                                    | 44        |
| 2.1.2.3 Rendement d'extraction .....                                                                       | 45        |
| 2.1.2.4 Détermination des propriétés physicochimiques du chitosane préparé .....                           | 46        |
| a. Détermination de la teneur en cendres (Ash Content, AC) .....                                           | 46        |
| b. Mesure de la teneur en humidité (MC) .....                                                              | 46        |
| 2.1.2.5 Techniques de caractérisation utilisées .....                                                      | 46        |
| a. Spectroscopie UV–Visible .....                                                                          | 46        |
| b. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....                                          | 47        |
| c. Diffraction des rayons X (XRD) .....                                                                    | 47        |
| d. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....                                                         | 47        |
| 2.1.3 Activités biologiques <i>in vitro</i> de l'extrait d' <i>Hirudo medicinalis</i> et du chitosane ...  | 48        |
| 2.1.3.1 Activité de piégeage du radical libre (DPPH) .....                                                 | 48        |
| 2.1.3.2 Activité de Peroxydation Lipidique (TBARS) .....                                                   | 48        |
| 2.1.3.3 Activité anti-inflammatoire .....                                                                  | 49        |
| 2.1.3.4 Activité anticoagulante .....                                                                      | 49        |
| 2.1.3.5 Dosage des protéines par Bradford .....                                                            | 50        |
| 2.1.3.6 Activité antibactérienne .....                                                                     | 50        |
| 2.1.3.7 Formulation d'un hydrogel .....                                                                    | 51        |
| 2.2 Étude <i>in vivo</i> .....                                                                             | 51        |
| 2.2.1 Diabète induit par l'alloxane chez les rats .....                                                    | 51        |
| 2.2.2 Induction des plaies expérimentales .....                                                            | 52        |
| 2.2.3 Plan expérimental et traitement .....                                                                | 53        |
| 2.2.4 Paramètres utilisés pour l'évaluation et le suivi de la cicatrisation des plaies<br>d'excision ..... | 54        |
| 2.2.4.1 Évaluation morphologique .....                                                                     | 54        |
| 2.2.4.2 Mesure de la surface de la plaie .....                                                             | 54        |
| 2.2.5 Préparation des échantillons .....                                                                   | 54        |
| 2.2.5.1 Euthanasie et collecte du sang .....                                                               | 54        |
| 2.2.5.2 Paramètres hématologiques .....                                                                    | 55        |
| 2.2.5.3 Analyse des paramètres biochimiques .....                                                          | 55        |
| 2.2.5.4 Évaluation histopathologique .....                                                                 | 55        |
| 2.2.5.5 Analyse bactériologique .....                                                                      | 56        |
| 2.2.5.6 Analyse statistique .....                                                                          | 56        |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Caractérisation physicochimique et structurale du chitosane extrait.....</b>                               | <b>59</b> |
| 1.1 Rendement d'extraction du chitosane .....                                                                    | 59        |
| 1.2 Teneur en cendres et humidité .....                                                                          | 59        |
| 1.3 Analyse spectroscopique UV-Vis .....                                                                         | 60        |
| 1.4 Analyse spectroscopique FTIR.....                                                                            | 60        |
| 1.5 Diffraction des rayons X (XRD).....                                                                          | 61        |
| 1.6 Morphologie de surface (SEM) .....                                                                           | 62        |
| <b>2. Activités biologiques <i>in vitro</i> de l'extrait de sangsue <i>medicinalis</i> et du chitosane .....</b> | <b>63</b> |
| 2.1 Activité antioxydante évaluée par le test de piégeage des radicaux DPPH .....                                | 63        |
| 2.2 Activité anti-inflammatoire .....                                                                            | 64        |
| 2.3 Activité anticoagulante.....                                                                                 | 66        |
| 2.4 Inhibition de la peroxydation lipidique (TBARS).....                                                         | 67        |
| 2.5 Activité antibactérienne.....                                                                                | 68        |
| <b>3. Activité de cicatrisation des plaies <i>in vivo</i> chez les rats diabétiques .....</b>                    | <b>70</b> |
| 3.1 Caractérisation physique et mécanisme de gélification d'un hydrogel de chitosane ....                        | 70        |
| 3.2 Paramètres hématologiques.....                                                                               | 72        |
| 3.3 Régulation de la glycémie .....                                                                              | 75        |
| 3.4 Évaluation des biomarqueurs inflammatoires et infectieux (CRP et ASLO) .....                                 | 79        |
| 3.5 Activité antibactérienne et décontamination des plaies.....                                                  | 80        |
| 3.6 Analyse de l'efficacité de la cicatrisation et de la contraction de la plaie.....                            | 83        |
| 3.7 Évaluation histologique de la cicatrisation .....                                                            | 87        |
| <b>4. Mécanisme proposé de l'activité synergique de cicatrisation.....</b>                                       | <b>89</b> |
| <b>Conclusion.....</b>                                                                                           | <b>93</b> |

## ***Liste des abréviations***

**Abs** : Absorbance

**AC** : Ash contents

**ASLO** : Antistreptolysine O

**ATCC**: American Type Culture Collection

**BAS** : Substance Biologique Active

**BSA** : Bovine Serum Albumin (Albumine Sérique Bovine)

**CHROMagar** : Chromogenic Agar

**CRP** : Protéine C-Réactive

**DD** : Degré de Désacétylation

**DPPH** : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

**EDTA** : Acide Éthylènediaminetétraacétique

**FTIR** : Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier)

**H&E** : Hématoxyline-Éosine

**IC50** : Concentration inhibitrice à 50 %

**INR** : International Normalized Ratio

**MC** : Teneur en Humidité (Moisture Content)

**MEB** : Microscopie Électronique à Balayage

***E. coli*** : Escherichia coli

***P. aeruginosa*** : Pseudomonas aeruginosa

***S. aureus*** : Staphylococcus aureus

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**SPSS**: Statistical Package for the Social Sciences

**TBARS** : Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique

**TCK** : Temps de Céphaline Activée

**TP** : Taux de Prothrombine

**UV-Vis** : Ultraviolet-Visible Spectroscopy

**XRD** : X-Ray Diffraction (Diffraction des rayons X)

---

# *Introduction*

---

### Introduction

Le diabète sucré représente aujourd'hui l'une des maladies métaboliques les plus préoccupantes à l'échelle mondiale en raison de son incidence croissante, de sa nature chronique et des complications sévères qui en découlent, affectant profondément la qualité de vie des patients ainsi que les systèmes de santé (*Saeedi et al., 2019*). Malgré les progrès remarquables réalisés dans les domaines de la médecine et de la pharmacothérapie, cette pathologie demeure encore incurable. Les traitements actuellement disponibles visent principalement à contrôler l'hyperglycémie et à limiter l'apparition des complications, sans toutefois permettre une restauration complète des fonctions physiologiques normales, imposant ainsi aux patients une prise en charge thérapeutique continue et à long terme (*Tegegne et al., 2024*).

Parmi les complications les plus graves et les plus difficiles à gérer figurent les plaies diabétiques chroniques et le retard de cicatrisation, qui constituent un véritable défi thérapeutique et une cause majeure d'hospitalisation et d'amputation chez les patients diabétiques (*Armstrong et al., 2023*). En effet, même des lésions mineures peuvent évoluer rapidement vers des ulcérations sévères en raison des altérations profondes des mécanismes physiologiques de réparation tissulaire induites par l'hyperglycémie chronique. Cette dernière provoque une diminution de la réponse immunitaire, une perturbation de la prolifération cellulaire ainsi qu'un dysfonctionnement de la régénération tissulaire, favorisant ainsi les infections persistantes et l'évolution chronique des plaies (*Rodríguez-Rodríguez et al., 2021*).

La physiopathologie des plaies diabétiques est particulièrement complexe et multifactorielle. L'état inflammatoire chronique observé dans ces lésions entraîne une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), générant un stress oxydatif intense lorsque les systèmes antioxydants cellulaires deviennent incapables de neutraliser ces radicaux libres. Ce déséquilibre oxydatif provoque des dommages importants aux protéines, aux lipides membranaires et à l'ADN cellulaire, perturbant ainsi la néoangiogenèse, la prolifération fibroblastique et la régénération des tissus lésés (*Liu et al., 2026*). Par ailleurs, l'hyperglycémie persistante active plusieurs voies de signalisation inflammatoires, notamment la voie NF- $\kappa$ B, induisant une surexpression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Cette réponse inflammatoire exacerbée inhibe la voie TGF- $\beta$ 1/Smad, essentielle au remodelage tissulaire et au processus normal de cicatrisation (*Gong et al., 2022*). En outre, les plaies diabétiques présentent une vascularisation anormale caractérisée

par une augmentation de la perméabilité vasculaire, une instabilité capillaire et un défaut de stabilisation par les péricytes, limitant ainsi l'apport en oxygène et en nutriments nécessaires à la réparation tissulaire (Okonkwo *et al.*, 2020).

À ces perturbations physiopathologiques s'ajoutent les infections bactériennes et la formation de biofilms microbiens favorisées par l'environnement hyperglycémique. Ces biofilms augmentent considérablement la résistance bactérienne aux défenses immunitaires ainsi qu'aux antibiotiques conventionnels, aggravant davantage l'inflammation locale et retardant significativement la cicatrisation (Afonso *et al.*, 2021). De plus, l'émergence croissante de bactéries multi résistantes représente aujourd'hui un obstacle thérapeutique majeur, réduisant l'efficacité des traitements antimicrobiens classiques et compliquant considérablement la prise en charge clinique des plaies diabétiques infectées.

Face à cette problématique sanitaire mondiale, les recherches scientifiques se sont intensifiées afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques capables d'améliorer la réparation tissulaire, de limiter l'inflammation chronique et de prévenir les infections associées aux plaies diabétiques. Bien que plusieurs stratégies thérapeutiques modernes aient été proposées, incluant les biomatériaux, les pansements avancés et les formulations pharmaceutiques innovantes, leurs résultats demeurent encore limités dans de nombreux cas cliniques (Yue *et al.*, 2025). Ainsi, l'exploration de nouvelles alternatives thérapeutiques naturelles, biocompatibles et multifonctionnelles apparaît aujourd'hui comme une nécessité scientifique et médicale incontournable.

Dans ce contexte, la sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis*) suscite un intérêt croissant dans le domaine de la médecine régénérative grâce à la richesse exceptionnelle de sa salive en composés bioactifs. Ces molécules comprennent notamment l'hirudine, ainsi que divers peptides biologiquement actifs possédant des propriétés anticoagulantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et vasodilatatrices remarquables. Ces substances contribuent à améliorer la microcirculation sanguine, à réduire la congestion tissulaire et à stimuler les mécanismes naturels de réparation cutanée (Na, 2003 ; Le Reun, 2023).

Parallèlement, le chitosane, polysaccharide naturel dérivé de la chitine, représente l'un des biomatériaux les plus prometteurs dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la cicatrisation des plaies. Grâce à sa biocompatibilité élevée, sa biodégradabilité, son activité antimicrobienne et ses propriétés hémostatiques, le chitosane favorise efficacement la prolifération cellulaire, la migration des fibroblastes, la synthèse du collagène et la

régénération des tissus lésés (Wu *et al.*, 2024). De plus, sa capacité à former des hydrogels en fait un excellent support thérapeutique permettant de maintenir un environnement humide favorable à la cicatrisation et à la réparation tissulaire.

Malgré les nombreuses études consacrées séparément à la sangsue médicinale et au chitosane, une importante lacune scientifique persiste concernant leur utilisation combinée dans une approche thérapeutique intégrée destinée au traitement des plaies diabétiques. À ce jour, très peu d'études ont exploré le potentiel synergique pouvant résulter de l'association des propriétés biologiques de *Hirudo medicinalis* avec les capacités régénératrices et antimicrobiennes du chitosane au sein d'un même système thérapeutique. De plus, les mécanismes biologiques impliqués dans cette éventuelle synergie restent encore largement méconnus. Cette absence de données scientifiques constitue ainsi une véritable problématique de recherche et justifie pleinement l'intérêt de la présente étude (Bielska & Miłowska, 2025; Kandile *et al.*, 2024; Malhotra & Gautam, 2024).

Dans cette perspective, nous avons émis l'hypothèse que l'association synergique du chitosane et de l'extrait de sangsue médicinale sous forme d'un hydrogel bioactif pourrait exercer un effet thérapeutique supérieur aux traitements individuels. Cette combinaison pourrait agir simultanément à travers plusieurs mécanismes complémentaires, notamment des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticoagulantes et pro-angiogéniques, favorisant ainsi une accélération de la contraction des plaies, une amélioration de la régénération tissulaire et une restauration plus efficace de l'intégrité cutanée chez les rats diabétiques. Ainsi, l'objectif principal de cette recherche consiste à développer et à évaluer un hydrogel thérapeutique innovant à base de chitosane et d'extrait de *Hirudo medicinalis*, ainsi qu'à étudier son efficacité dans le traitement des plaies diabétiques induites expérimentalement chez le rat. Cette étude vise également à explorer les mécanismes biologiques potentiellement impliqués dans les effets cicatrisants observés.

Afin d'atteindre cet objectif, ce travail a été structuré en deux parties principales :

### **1) Première partie: Étude *in vitro***

Cette partie a porté sur l'extraction de l'extrait biologique de sangsue ainsi que du chitosane à partir des carapaces de crevettes, suivie de la caractérisation physicochimique et structurale du chitosane préparé. Les activités biologiques ont ensuite été évaluées à travers plusieurs essais, notamment l'activité antioxydante (DPPH), l'inhibition de la peroxydation

lipidique (TBARS), l'activité anti-inflammatoire, l'activité anticoagulante ainsi que d'autres propriétés biologiques associées au processus de cicatrisation.

### **2) Deuxième partie : Étude *in vivo***

Cette partie expérimentale a été consacrée à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'un hydrogel synergique à base de chitosane et d'extrait de sangsue dans le traitement des plaies diabétiques induites par l'alloxane chez des rats Wistar. Différents paramètres biologiques, bactériologiques et histopathologiques ont été étudiés, incluant l'évolution macroscopique des plaies, le taux de contraction de la plaie, les paramètres hématologiques et biochimiques, l'activité antibactérienne et la décontamination des plaies, ainsi que l'évaluation histologique de la régénération et de la réparation tissulaire.

# *Partie théorique*

---

*Chapitre I*  
*Diabète et retard de*  
*cicatrisation*

---

## 1. Définition du diabète

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit plus d'insuline ou lorsque l'organisme ne parvient pas à utiliser correctement l'insuline qu'il produit. L'insuline est une hormone produite par le pancréas qui agit comme une clé permettant au glucose provenant des aliments de passer du sang aux cellules de l'organisme pour produire de l'énergie. Tous les glucides sont décomposés en glucose dans le sang. L'insuline facilite l'entrée du glucose dans les cellules. L'incapacité à produire de l'insuline ou à l'utiliser efficacement entraîne une augmentation du taux de glucose dans le sang (appelée hyperglycémie). À long terme, une hyperglycémie est associée à des lésions de l'organisme et à une défaillance de divers organes et tissus (**Fig. 1**) (Mayilvaganan *et al.*, 2016).

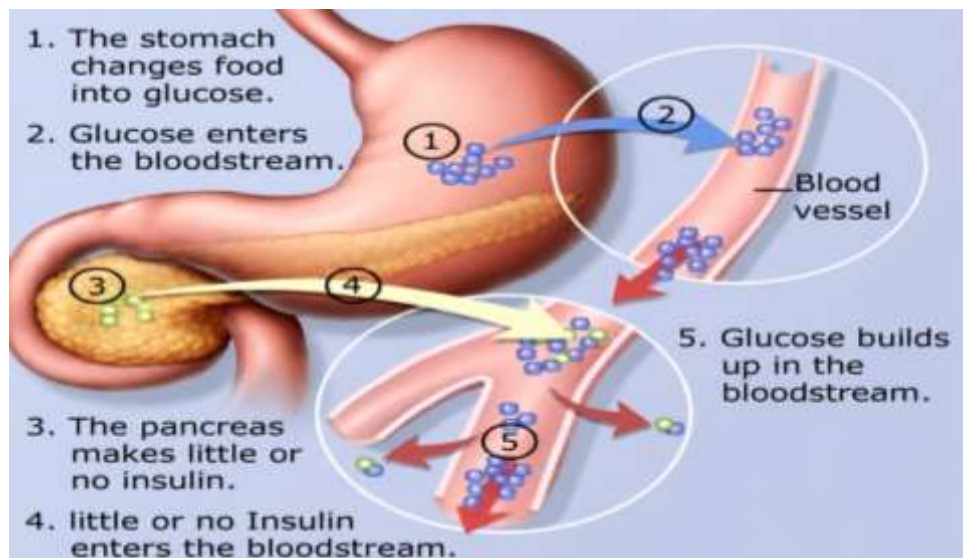


**Fig. 1.** Mécanisme du diabète – déficit en insuline et accumulation de glucose dans le sang  
(Vijayaraghavan & Crabtree, n.d)

## 2. Types et causes du diabète

Il existe trois principaux types de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel (Bozkir, 2022).

**Tableau 1:** des types et causes du diabète (Bozkir, 2022).

| Types                       | Définition                                                                                                                                                                                                                                            | Causes principales                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Diabète de type 1</b>    | C'est une Maladie auto-immune : le système immunitaire attaque et détruit les cellules du pancréas productrices d'insuline.<br>Se développe généralement pendant l'enfance ou au début de l'âge adulte et nécessite un traitement à l'insuline à vie. | Combinaison de facteurs génétiques et environnementaux, bien que la cause exacte ne soit pas encore totalement comprise.                                                                 |
| <b>Diabète de type 2</b>    | Forme la plus courante. L'organisme est incapable d'utiliser correctement l'insuline ou n'en produit pas suffisamment pour réguler la glycémie.                                                                                                       | Combinaison de facteurs génétiques et liés au mode de vie : surpoids/obésité, antécédents familiaux de diabète, sédentarité et mauvaise alimentation.                                    |
| <b>Diabète gestationnel</b> | Survient pendant la grossesse et disparaît généralement après l'accouchement.<br>Les femmes concernées présentent un risque accru de développer un diabète de type 2 plus tard.                                                                       | Changements hormonaux pendant la grossesse rendant difficile l'utilisation correcte de l'insuline.<br>Risque accru si surpoids, antécédents familiaux ou diabète gestationnel antérieur. |

### 3. Physiopathologie du diabète

#### 3.1 Diabète de type 1

La physiopathologie du diabète de type 1 (IDDM) commence par la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  pancréatiques, entraînant un déficit de sécrétion d'insuline. Ce déficit insulinaire est responsable des principaux troubles métaboliques associés à la maladie. De plus, la fonction des cellules  $\alpha$  pancréatiques devient anormale, ce qui provoque une sécrétion excessive de glucagon. Contrairement aux individus sains chez qui l'hyperglycémie supprime la sécrétion de glucagon, cette suppression ne se produit pas chez les patients atteints d'IDDM. Les taux élevés et inappropriés de glucagon aggravent encore les anomalies métaboliques causées par le déficit en insuline. Une conséquence majeure de ce déséquilibre hormonal combiné est le développement rapide d'une acidocétose diabétique en l'absence d'administration d'insuline (Ozougwu et al., 2013).

Outre le défaut de sécrétion d'insuline, il existe également une altération de la réponse des tissus à l'insuline, due à de multiples mécanismes biochimiques. Le déficit en insuline entraîne une lipolyse non contrôlée et une élévation des acides gras libres dans le plasma, ce

qui supprime le métabolisme du glucose dans les tissus périphériques comme le muscle squelettique. En outre, le déficit en insuline diminue l'expression de plusieurs gènes nécessaires à une réponse normale des tissus cibles à l'insuline, notamment la glucokinase dans le foie et les transporteurs de glucose GLUT4 dans le tissu adipeux. Dans l'ensemble, les principales conséquences métaboliques du déficit en insuline dans l'IDDM impliquent une perturbation du métabolisme du glucose, des lipides et des protéines (Ozougwu *et al.*, 2013).

### 3.2 Diabète de type 2

La physiopathologie du diabète de type 2 (NIDDM) se caractérise par des taux détectables d'insuline circulante, contrairement aux patients atteints de diabète de type 1. Sur la base de l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale, les éléments essentiels du NIDDM peuvent être divisés en quatre groupes distincts (Ozougwu *et al.*, 2013):

- ✚ **Personnes présentant une tolérance au glucose normal.**
- ✚ **Diabète chimique (également appelé intolérance au glucose).**
- ✚ **Diabète avec hyperglycémie à jeun minimale (glycémie à jeun inférieure à 140 mg/dl).**
- ✚ **Diabète sucré associé à une hyperglycémie à jeun manifeste (glycémie à jeun supérieure à 140 mg/dl).**

Les personnes présentant une intolérance au glucose ont une hyperglycémie malgré des taux d'insuline plasmatique très élevés, ce qui indique une résistance à l'action de l'insuline.

Dans la progression de l'intolérance au glucose au diabète sucré, le taux d'insuline diminue, indiquant que les patients atteints de diabète de type 2 présentent une diminution de la sécrétion d'insuline. L'insulinorésistance et le déficit en insuline sont fréquents chez les patients atteints de diabète de type 2 (Ozougwu *et al.*, 2013).

L'insulinorésistance est la principale cause du diabète de type 2, cependant, certains chercheurs affirment que le déficit en insuline en est la principale cause, car un degré modéré d'insulinorésistance n'est pas suffisant pour provoquer un diabète de type 2 (Ozougwu *et al.*, 2013). La plupart des patients atteints de la forme courante de diabète de type 2 présentent les deux anomalies. Des travaux antérieurs ont mis en évidence le rôle d'un membre de la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires dans l'étiologie du diabète de type 2 (Ozougwu *et al.*, 2013).

### 3.3 Diabète gestationnel

La grossesse est un état diabétogène caractérisé par une diminution de la sensibilité à l'insuline, particulièrement marquée au cours du deuxième trimestre, sous l'effet des hormones placentaires telles que l'hormone lactogène placentaire humaine (hPL), la progestérone, le cortisol, l'hormone de croissance et la prolactine. Ces hormones entraînent une inhibition de la phosphorylation du substrat du récepteur de l'insuline (IRS), provoquant ainsi une insulino-résistance importante, à laquelle s'ajoute le rôle de certaines cytokines comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) (Siddiqui et al., 2013).

Sur le plan physiologique, le pancréas devrait normalement compenser cette situation par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Cependant, dans le diabète gestationnel (GDM), on observe une détérioration de la fonction de la cellule bêta, en particulier de la première phase de sécrétion de l'insuline. Une étude menée chez des femmes d'origine latino-américaine atteintes de diabète gestationnel a montré une réduction de 67 % de la fonction des cellules bêta par rapport aux femmes enceintes non atteintes, tandis que la seconde phase de sécrétion demeurerait similaire à celle observée chez les individus ayant une tolérance normale au glucose (Siddiqui et al., 2013).

Les anomalies des cellules  $\beta$  sont attribuées soit à un processus auto-immun (particulièrement chez les femmes minces d'origine caucasienne ne présentant pas les facteurs de risque typiques), soit à un déficit enzymatique, tel qu'un déficit en glucokinase. Ainsi, la combinaison d'une résistance à l'insuline et d'un défaut de sécrétion insulinoque au cours de la grossesse conduit à l'apparition d'un diabète gestationnel (Siddiqui et al., 2013).

## 4. Diabète et stress oxydatif

Dans le cas du diabète, une augmentation de la production des radicaux libres et des marqueurs du stress oxydant a été observée avec à la fois une diminution des défenses antioxydantes (Carreras, 2004, cité par Boukertouta & Hadeef, 2014).

### 4.1 La production de radicaux libres au cours du diabète

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la production accrue des radicaux libres induite par l'hyperglycémie. L'activation de la voie des polyols entraîne une augmentation de NADH cofacteur d'enzymes catalysant des réactions génératrices des radicaux libres telle que la PGH synthèse. La fragmentation oxydative des produits d'Amadori et la liaison des AGE sur leurs récepteurs RAGE produisent des radicaux oxygénés.

Le glucose peut subir une auto-oxydation en présence de métaux de transition. Cette réaction conduit à la formation d'un radical oxydé en dicarbonyl et d'un anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  (Carreras, 2004, cité par Boukertouta & Hadeif, 2014).

#### 4.2 Altération des défenses antioxydantes au cours du diabète

L'effet de la production accrue de ROS est potentialisé par la réduction des défenses antioxydantes. Une diminution des défenses antioxydantes enzymatiques (GPx, catalase, SOD) ou non enzymatiques comme le GSH ou la vitamine E peut conduire à l'apparition d'un stress oxydant dans les tissus. Une telle altération a été rapportée au cours du diabète et dans plusieurs études, in vitro, en présence de glucose (Januel, 2003, cité par Boukertouta & Hadeif, 2014).

#### 4.3 Augmentation des marqueurs de stress oxydant au cours du diabète

La production des radicaux libres dans les systèmes biologiques est difficilement mesurable. L'augmentation du stress oxydant au cours du diabète a donc été principalement démontrée par une augmentation des dommages causés par les radicaux libres sur les protéines et les lipides. Le principal marqueur de l'augmentation des radicaux libres est l'augmentation de la peroxydation lipidique. Plusieurs études ont mis en évidence l'augmentation du taux des produits de peroxydation lipidique (diènes conjugués, hydroperoxydes d'acides gras et MDA) dans le plasma des diabétiques (Januel, 2003, cité par Boukertouta & Hadeif, 2014).

### 5. Les complications du diabète

En l'absence de traitement, le diabète peut entraîner diverses complications de santé. Un taux de glycémie élevé peut endommager les vaisseaux sanguins et les nerfs, ce qui peut provoquer (Bozkir, 2022) :

- ✚ **Maladies cardiaques et AVC**
- ✚ **Maladies rénales**
- ✚ **Maladies oculaires et perte de vision**
- ✚ **Lésions nerveuses et engourdissements des mains et des pieds**
- ✚ **Dysfonction érectile**
- ✚ **Problèmes dentaires**
- ✚ **Problèmes de cicatrisation :**

Les plaies diabétiques sont non seulement lentes à cicatriser, mais aussi associées à des complications graves, souvent mortelles. L'infection est la complication la plus fréquente, en raison d'une immunité altérée, pouvant évoluer vers un abcès ou une ostéomyélite, augmentant le risque d'amputation. Le diabète est responsable de près de 80 % des amputations non traumatiques des membres inférieurs. Après une première amputation, le risque d'amputation controlatérale et de mortalité est élevé (Gowtham *et al.*, 2025).

Les conséquences psychologiques et socio-économiques sont majeures : dépression, isolement, et fardeau financier considérable pour les systèmes de santé. La récurrence reste préoccupante : jusqu'à 40 % en un an et plus de 60 % en cinq ans. La mortalité à cinq ans est estimée à seulement 50 %, comparable à celle de nombreux cancers (Gowtham *et al.*, 2025).

Ainsi, les complications des plaies diabétiques dépassent la lésion locale. Ces réalités renforcent la nécessité d'interventions intégratives, incluant les nutraceutiques, en complément des thérapies conventionnelles (Gowtham *et al.*, 2025).

## **6. Retard de cicatrisation des plaies diabétiques**

Les raisons de la cicatrisation difficile des plaies diabétiques incluent les suivantes :

### **6.1 Hyperglycémie**

Une hyperglycémie chronique peut endommager les vaisseaux sanguins, les nerfs et le système immunitaire. Elle peut entraîner une constriction et un durcissement des vaisseaux sanguins, une réduction de la circulation sanguine, une diminution de l'apport d'oxygène et de nutriments à la zone lésée et affecter la cicatrisation (Lang *et al.*, 2024).

### **6.2 Microangiopathie**

Les patients diabétiques sont sujets à la microangiopathie, qui altère la microcirculation autour de la plaie et provoque une irrigation sanguine insuffisante, ralentissant ainsi la cicatrisation (Lang *et al.*, 2024).

### **6.3 Immunodéficiences**

Le diabète affaiblit le système immunitaire, diminuant la résistance du patient et le rendant plus vulnérable aux infections. Une infection peut aggraver la réponse inflammatoire de la plaie et perturber le processus normal de cicatrisation (Lang *et al.*, 2024).

### 6.4 Neuropathie

La neuropathie diabétique affecte les nerfs sensitifs et le système nerveux autonome, réduisant la perception de la douleur et de la température. De ce fait, les patients peuvent ne pas détecter la plaie à temps, retardant ainsi la prise en charge (Lang et al., 2024).

### 6.5 Infection

Les patients diabétiques sont sujets aux infections de plaies. En raison de la diminution de leurs défenses immunitaires et de leur mauvaise circulation sanguine, l'infection aggrave l'inflammation et perturbe le processus de cicatrisation (Lang et al., 2024)

### 6.6 Autres complications :

Les patients diabétiques présentent souvent d'autres complications, telles que l'artériosclérose et l'hypertension, qui affectent davantage la cicatrisation (Lang et al., 2024) .

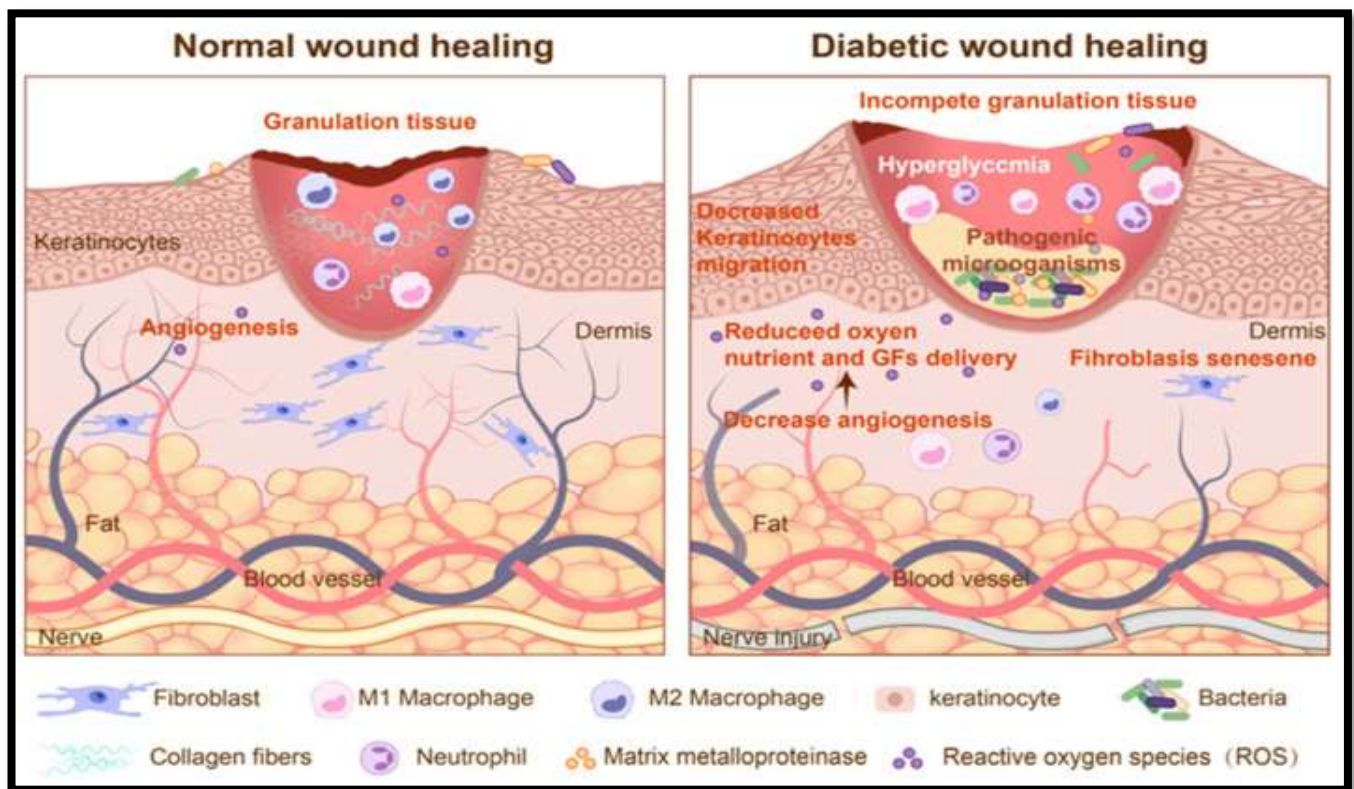


**Fig. 2.** Les processus physiologiques des plaies normales et des plaies diabétiques (Han et al., 2025)

# *Chapitre II*

## *Bases biologiques de la cicatrisation*

---

## 1. Cicatrisation des plaies

Une plaie est définie comme toute lésion ou perturbation compromettant l'intégrité de la structure cutanée, résultant de facteurs externes tels que des incisions, des brûlures et des pressions, ou d'interventions chirurgicales, ou encore de conditions pathologiques comme le diabète. La cicatrisation des plaies est un processus physiologique dynamique et complexe, composé de phases multiples et chevauchantes, visant à réparer les tissus endommagés par des mécanismes biologiques précis. L'objectif fondamental de ce processus est de restaurer l'intégrité anatomique et fonctionnelle de la peau après une lésion. La cicatrisation constitue une réponse vitale destinée à reconstruire la barrière protectrice de l'organisme afin de prévenir les infections, les pertes de fluides et de maintenir l'homéostasie. Elle représente ainsi un système biologique spécialisé garantissant le retour du tissu lésé à son état fonctionnel antérieur (Kolimi et al., 2022).

## 2. Étapes de la cicatrisation des plaies

### a) Phase hémostatique et inflammatoire (0 à 3 jours)

Le corps réagit rapidement à toute rupture de la surface cutanée. En quelques secondes après la blessure, les vaisseaux sanguins se contractent pour contrôler le saignement sur le site. Les plaquettes s'agrègent en quelques minutes pour arrêter le saignement et commencer la formation du caillot.

Les tissus endommagés et les mastocytes sécrètent de l'histamine et d'autres hormones et enzymes locales, provoquant une vasodilatation des capillaires environnants.

Ces capillaires deviennent plus perméables et les globules blancs ainsi que le sérum peuvent passer dans la zone endommagée. La vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité capillaire provoquent les signes de l'inflammation : rougeur, chaleur, gonflement et douleur.

Un afflux de polynucléaires et de macrophages défend contre les bactéries, ingère les débris et commence le processus de réparation. Un certain nombre de facteurs locaux et systémiques peuvent ralentir ou arrêter cet afflux de globules blancs.

De fortes doses de corticostéroïdes tels que la prednisolone peuvent arrêter ou ralentir cette réponse inflammatoire et la cicatrisation ultérieure des plaies.

Les tissus morts et les bactéries sont éliminés au cours de cette phase pour faire place à une nouvelle croissance. Les cellules des tissus sains sont maintenues ensemble par un ciment protéoglycane-fibronectine. Là où les cellules meurent à cause de la blessure, le corps agit

pour dissoudre ce ciment intercellulaire. La liquéfaction des tissus conjonctifs afin d'éliminer la matière nécrotique est appelée auto-débridement. Les macrophages migrent dans la plaie et jouent un rôle vital dans cette phase en engloutissant les bactéries, tous les corps étrangers et les tissus nécrotiques. Avec les neutrophiles, les macrophages attirent les fibroblastes et influencent la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans la plaie par une activité chimiotactique et la libération de facteurs de croissance (*Joint Wound Management Formulary Group, 2016*).

**b) Phase de prolifération : 3 à 24 jours**

Il y a une croissance extensive des cellules épithéliales sous la croûte qui comble la plaie.

Avec le développement de nouveaux vaisseaux sanguins, une multiplication des fibroblastes se produit.

Les fibroblastes commencent à produire du collagène, un processus qui dépend du zinc, de l'oxygène et de l'acide ascorbique.

Ce processus peut être déficient dans certains états pathologiques tels que le diabète.

Les brins de collagène sont déposés de manière désordonnée et forment un réseau fibreux qui soutient les nouvelles anses capillaires. Le tissu formé est appelé tissu de granulation. Il a une apparence rouge, translucide et humide. Les signes d'inflammation disparaissent maintenant et les fibroblastes se contractent, rapprochant les bords de la plaie.

La contraction de la plaie est une partie importante de la cicatrisation car elle signifie que le corps n'a pas besoin de produire autant de tissu de granulation pour remplir la cavité de la plaie.

La résistance à la traction de la plaie est augmentée pendant cette étape du processus de cicatrisation et ce processus se poursuit dans la phase suivante, la phase de maturation (*Joint Wound Management Formulary Group, 2016*).

**c) Phase de maturation : 24 jours – 1 an**

Au cours de cette phase, les fibroblastes quittent la plaie, le collagène est remodelé en une matrice plus organisée, l'apparence passe du tissu de granulation rouge à une épithélialisation précoce rose, puis un tissu blanc relativement a vasculaire se développe, et l'épiderme retrouve son épaisseur normale. La résistance à la traction augmente pendant jusqu'à un an après la blessure. Bien que les plaies cicatrisées ne retrouvent jamais toute la force de la peau non blessée, elles peuvent retrouver jusqu'à 70 % à 80 % de leur force d'origine (*Joint Wound Management Formulary Group, 2016*).

**d) Facteurs de croissance et leur influence sur la cicatrisation**

On pense que les facteurs de croissance produits par différentes cellules impliquées dans la cicatrisation communiquent entre eux pour déterminer la marche à suivre. Exemples de facteurs de croissance :

- Facteur de croissance dérivé des plaquettes
- Facteur de croissance des fibroblastes
- Facteur de croissance favorisant l'angiogenèse
- Facteur de croissance épidermique
- Facteur de croissance transformant alpha et bêta
- Facteur de croissance endothélial vasculaire

Chacun de ces facteurs a un rôle différent ; par exemple, le facteur de croissance épidermique favorise la croissance épithéliale (*Joint Wound Management Formulary Group, 2016*).

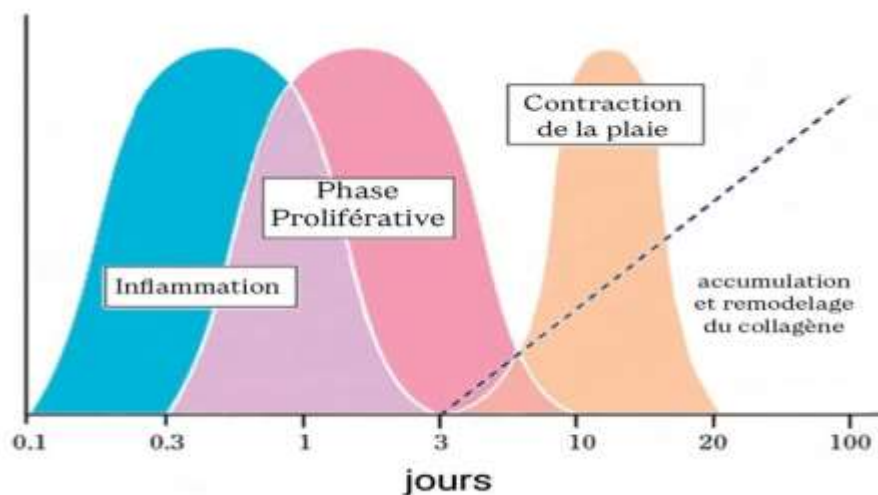


**Fig. 3.** Ordre séquentiel des phases de la cicatrisation adaptée d'après (Spitalnik, n.d.).

Tableau 2: Phases de la cicatrisation des plaies (Orsted et al., 2011).

| Phase de la cicatrisation                         | Temps après blessure | Cellules impliquées dans la phase                                             | Fonction ou activité                                       | Analogie avec la réparation de maison                                                                                      |
|---------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hémostase</b>                                  | Immédiat             | Plaquettes                                                                    | Coagulation                                                | Les ouvriers des services publics bouchonnent les installations cassées                                                    |
| <b>Inflammation</b>                               | Jour 1–4             | Neutrophiles, Macrophages                                                     | Phagocytose                                                | Des ouvriers non qualifiés nettoient le site. Les entrepreneurs dirigent l'activité                                        |
| <b>Prolifération (granulation et contraction)</b> | Jour 4–21            | Macrophages, Lymphocytes, Angiocytes, Neurocytes, Fibroblastes, Kératinocytes | Remplir le défaut, Rétablir la fonction cutanée, Fermeture | Les sous-traitants commencent le travail :<br>• charpentiers<br>• plombiers<br>• électriciens et<br>• couvreurs et pareurs |
| <b>Remodelage (maturation)</b>                    | Jour 21 – 2 ans      | Fibrocytes                                                                    | Développer la force de traction                            | Finition intérieure                                                                                                        |

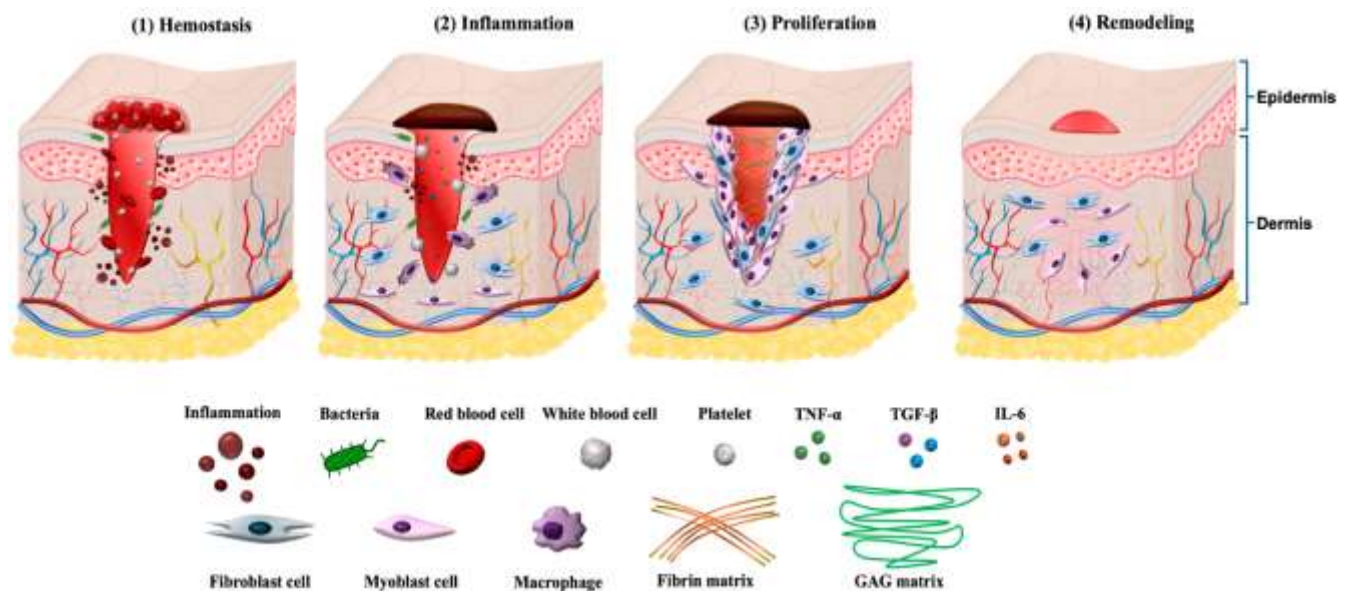


**Fig. 4.** Illustration des quatre phases du processus de cicatrisation. (1) Hémostase : L'agrégation plaquettaire et la formation d'un caillot de fibrine scellent la plaie. (2) Inflammation : Les neutrophiles et les macrophages éliminent les débris et initient la signalisation immunitaire. (3) Prolifération : La migration des kératinocytes, l'activation des fibroblastes, le dépôt de matrice extracellulaire et l'angiogenèse restaurent la structure tissulaire. (4) Remodelage : La cicatrisation se poursuit par la réorganisation des fibres de collagène et la maturation de la cicatrice (Heo, 2025).

# *Chapitre III*

## *La sangsue médicinale & Le chitosane & L'hydrogel*

---

## 1. La sangsue medicinalis (*Hirudo medicinalis*)

### 1.1 Définition

Les sangsues médicinales sont connues depuis l'Antiquité, leur utilisation thérapeutique remonte à près de 2 000 ans d'histoire documentée. Le terme latin *medicinalis*, donné par Linné au XVIII<sup>ème</sup> siècle, reflète leur importance médicale historique. En anglais, le mot sangsue se dit « leech », provenant du terme « leace » désignant un médecin (Le Reun, 2023).

Les sangsues médicinales appartiennent à l'embranchement des Annélides, à la classe des Clitellata, et sont regroupées au sein de l'ordre des Hirudinida. Le genre *Hirudo*, longtemps considéré comme ne comprenant qu'une seule espèce polymorphe (*Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758), a fait l'objet d'une révision taxonomique approfondie grâce aux avancées de la phylogénétique moléculaire. Ces travaux ont démontré que ce qui était autrefois interprété comme de simples variétés de coloration correspond en réalité à des espèces distinctes. Parmi celles-ci figure *Hirudo orientalis*, anciennement désignée sous le nom de type de coloration *orientalis* de *Hirudo medicinalis*, et formellement décrite comme nouvelle espèce à l'issue de ces recherches. Cette espèce se distingue morphologiquement par la coloration vert herbe de son dos, la présence de paires de taches noires quadrangulaires ou arrondies disposées de façon segmentaire sur ses bandes dorsales paramarginales, ainsi que par des marques claires irrégulières sur un ventre majoritairement noir (*Utevsky & Trontelj, 2005*).



**Fig. 5.** *Hirudo orientalis* (Habeb & Al-Warid, 2025)

### 1.2 Histoire de l'hirudothérapie

*Jalinoos (Ier siècle ap. J.-C.)*: Prescrivait la saignée par les sangsues pour de nombreuses maladies, notamment les inflammations, les troubles mentaux et les hémorroïdes.

*Zakariya Razi* (Xe siècle ap. J.-C.): Recommandait l'utilisation des sangsues pour diverses maladies de peau.

*Ibn Sina* (980-1037 ap. J.-C.): Notait dans « Al-Qanoun » que les sangsues pouvaient prélever du sang dans des veines profondes.

Inaccessibles par ventouses humides, il conseillait l'hirudothérapie pour les maladies de peau. L'hirudothérapie était largement pratiquée aux 18 et 19 siècles.

Cette pratique devint si populaire qu'elle déclencha une véritable « frénésie des sangsues » en Europe et en Amérique.

Cette période marque une phase historique importante pour l'utilisation de l'hirudothérapie (*Ayswarya et al.*, 2025).

### 1.3 Classification taxonomique de *Hirudo orientalis*

**Tableau 3:** Classification taxonomique de *Hirudo orientalis* (*Bilal & Ahmed*, 2023)

| Niveau taxonomique | Classification                                    |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| Royaume            | Animalia                                          |
| Embranchement      | Annélides                                         |
| Classe             | Clitellata                                        |
| Ordre              | Arhynchobdellida                                  |
| Famille            | Hirudinidés                                       |
| Genre              | <i>Hirudo</i> Linnaeus, 1758                      |
| Espèce             | <i>Hirudo orientalis</i> Utevsky & Trontelj, 2005 |

### 1.4 Caractéristiques morphologiques de *Hirudo orientalis*

*Hirudo orientalis* présente trois mâchoires situées dans une large chambre préorale occupant la ventouse antérieure. La paroi postérieure de cette chambre est constituée d'un feuillet transversal de tissu appelé velum, au centre duquel s'ouvre une petite bouche de forme triradiée. Les deux mâchoires ventrolatérales symétriques et la mâchoire dorsomédiane unique forment un triangle isocèle ; elles sont de couleur blanc brillant, lisses et rigides. Chaque mâchoire porte en moyenne 80 dents acérées (avec une plage de 70 à 91 dents par mâchoire). Les mâchoires sont trignathes et monostichodontes, recouvertes de cuticule à l'exception des denticules. De rares papilles sont dispersées des deux côtés de chaque mâchoire. Les glandes salivaires de *H. orientalis* apparaissent sous forme de trois glandes séparées ressemblant à des grappes, s'étendant depuis chaque mâchoire et réparties autour des ganglions cérébraux, en

avant du jabot, entre les segments V et XII environ, entourées de muscles et de tissu conjonctif. Au microscope électronique à balayage, les cellules glandulaires unicellulaires sont encapsulées dans du tissu conjonctif et présentent des formes sphériques, ovoïdes ou en forme de poire, avec des tailles cellulaires comprises entre 16 et 78 micromètres. Ces cellules sont interconnectées par de fins canaux formant un réseau complexe aboutissant à un canal principal dirigé vers les mâchoires (Bilal & Ahmed, 2023).

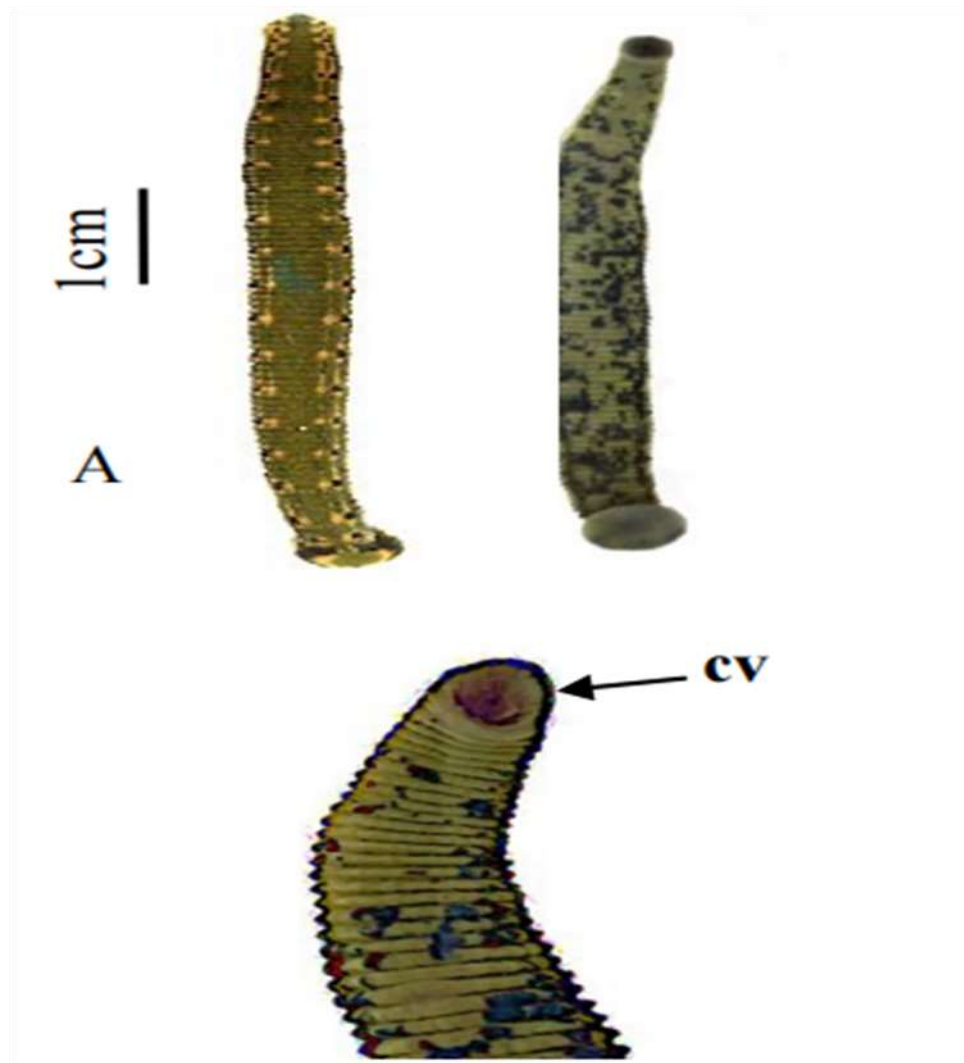


**Fig. 6.** *Hirudo orientalis*, vue dorsale et ventrale ; cavité buccale (cv) (Bilal & Ahmed, 2023)

### 1.5 Composants et propriétés des sangsues medicinalis

La salive de sangsue constitue un mélange complexe de substances chimiques dotées d'une activité pharmacologique et biologique remarquable. Ces substances facilitent la prise alimentaire de la sangsue en anesthésiant la zone de morsure et en dilatant les vaisseaux sanguins afin d'améliorer le flux sanguin, notamment grâce à l'acétylcholine, aux inhibiteurs de la carboxypeptidase A et aux substances histaminiques (Ali & Wunu, 2025).

Sur le plan thérapeutique, les composés bioactifs de la salive de sangsue exercent un large spectre d'effets biologiques, parmi lesquels on distingue des propriétés anticoagulantes (hirudine), vasodilatatrices, thrombolytiques, anti-inflammatoires, analgésiques, anti-adhésives, anti-œdémateuses, antimicrobiennes, ainsi qu'une amélioration de la microcirculation, une restauration de la perméabilité tissulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire (Ali & Wunu, 2025).

La majorité de ces composés bioactifs sont des protéines et des peptides. Les études transcriptomiques, génomiques et protéomiques ont permis d'identifier plus d'une centaine de substances bioactives distinctes, tandis que des techniques analytiques avancées telles que l'électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE, la spectrométrie de masse et la chromatographie ont contribué à la caractérisation des sécrétions des glandes salivaires. Néanmoins, la structure chimique et le mécanisme d'action de nombreuses de ces substances demeurent encore mal élucidés (Ali & Wunu, 2025).

**Tableau 4:** Tableau récapitulatif des diverses molécules identifiées dans la salive de sangsue et leur rôle chez l'Homme (Le Reun, 2023).

| Molécule             | Molécule Activité / rôle                            | Mécanisme d'action                                                                                       | Références bibliographiques |
|----------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Collagénase</b>   | Dégradation MEC,<br><br>Anti-agrégant, plaquettaire | Destruction des fibres de collagène dans les tissus<br><br>Action indirecte par dégradation du collagène | (2,4)                       |
| <b>Hyaluronidase</b> | Dégradation MEC                                     | Hydrolyse de l'acide hyaluronique dans les tissus                                                        | (2, 4,36)                   |

|                       |                                            |                                                                                                     |              |
|-----------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Acétylcholine</b>  | Augmente flux sanguin                      | Neurotransmetteur<br>Relaxation du muscle endothélial<br>et vasodilatation                          | (2, 38,39)   |
| <b>Histamine-like</b> | Augmente flux sanguin                      | Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire                                        | (2,40)       |
| <b>Apyrase</b>        | Antiagrégant plaquettaire                  | Clivage de l'ADP en AMP                                                                             | (2,4)        |
| <b>Saratine</b>       | Antiagrégant plaquettaire                  | Inhibition de la liaison entre le collagène et le facteur von Willebrand                            | (2,4)        |
| <b>Caline</b>         | Antiagrégant plaquettaire                  | Inhibition de la liaison entre le collagène et le facteur Von Willebrand                            | (2,4)        |
| <b>Hirudine</b>       | Anticoagulant                              | Inhibiteur spécifique et naturel de la thrombine                                                    | (2–4, 22,46) |
| <b>Antistasine</b>    | Anticoagulant<br><br>Antiinflammatoire     | Inhibiteur du facteur Xa<br><br>Inhibiteur du facteur Xa et inhibiteur du système kininekallicréine | (2)          |
| <b>Géline</b>         | Anticoagulant                              | Inhibiteur de la thrombine                                                                          | (2)          |
| <b>Destabilase</b>    | Anticoagulant<br><br>Facteur antimicrobien | Activité fibrinolytique<br><br>Activité $\beta$ -glycosidase,                                       | (2,4)        |

|                                                                |                    |                                                                                                             |          |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|                                                                |                    | clivage<br>des liaisons $\beta$ 1-4 du<br>peptidoglycane des<br>parois cellulaires<br>bactériennes.         |          |
| <b>Yagine</b>                                                  | Anticoagulant      | Inhibiteur du facteur Xa                                                                                    | (4)      |
| <b>Hirustasine</b>                                             | Anti inflammatoire | Inhibiteur de la<br>kallicréine, la trypsine,<br>la chymotrypsine et la<br>cathepsine G des<br>neutrophiles | (4)      |
| <b>Bdelline B-3</b>                                            | Antiinflammatoire  | Inhibiteur de la trypsine<br>et de la plasmine                                                              | (2,4)    |
| <b>Egline C</b>                                                | Antiinflammatoire  | Inhibiteur de l'élastase et<br>de la cathepsine G des<br>neutrophiles                                       | (2,4)    |
| <b>Guamérine et<br/>Piguamérine</b>                            | Antiinflammatoire  | Inhibiteur de l'élastase<br>es leucocytes<br><br>Inhibiteur de la<br>kallicréine et de<br><br>la trypsine   | (2)      |
| <b>Inhibiteur de la<br/>Trypstase dérivée<br/>des sangsues</b> | Antiinflammatoire  | Inhibiteur de sérine-<br>protéase, de<br><br>la trypsine et la<br>chymotrypsine                             | (2,4)    |
| <b>Kininase</b>                                                | Antalgique         | Clivage de 1 ou 2 acides<br>aminés au niveau des<br>kinines                                                 | (2,4,55) |
| <b>Inhibiteur de la<br/>sangsue<br/>décarboxypeptidase</b>     | Autres             | Inhibiteur de la<br>carboxypeptidase B                                                                      | (2,4)    |

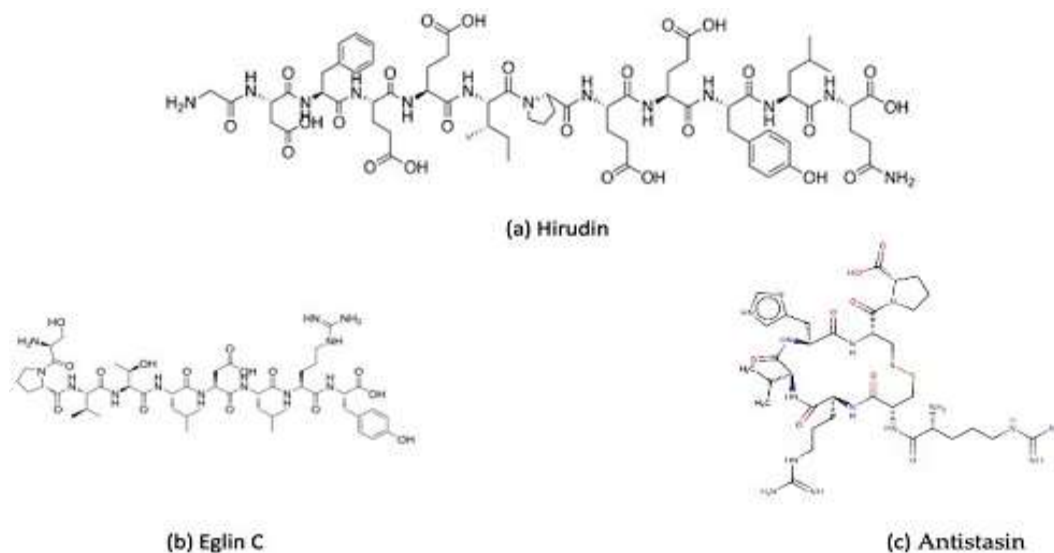


**Fig. 7.** Structures chimiques des principaux peptides dérivés des sangsues qui inhibent l'anticoagulation et les protéases. (a) Hirudine, un puissant inhibiteur de la thrombine et un anticoagulant bien connu, (b) Églotine C, une petite protéine qui inhibe l'élastase des neutrophiles et les enzymes de type chymotrypsine, et (c) Antistatine, qui cible le facteur Xa et joue un rôle dans la prévention de la progression de la cascade de coagulation. Ces composés démontrent la diversité structurale des molécules bioactives salivaires des sangsues responsables des effets anticoagulants et anti-inflammatoires (Raahavi et al., 2026).

### 1.6 Sangsues medicinalis et cicatrisation des plaies

La sangsue *medicinalis* est reconnue pour ses propriétés remarquables dans la cicatrisation des plaies, notamment par son efficacité dans l'élimination de la congestion veineuse et la phlébotomie. Elle est largement utilisée par les microchirurgiens et les chirurgiens plasticiens dans le cadre de la chirurgie reconstructive (Kamath, 2020).

Les composés bioactifs de la salive de sangsue, tels que l'hirudine et la buforudine, exercent des effets comparables à ceux de l'aspirine et de l'héparine, contribuant à la vasodilatation et à la prévention de la thrombose veineuse postopératoire. Ces substances possèdent également des propriétés fibrinolytiques permettant d'améliorer l'apport en oxygène et d'optimiser la microcirculation, élément indispensable au métabolisme cellulaire et à la production d'énergie (Kamath, 2020).

Par ailleurs, la salive de sangsue renferme plusieurs enzymes aux propriétés thérapeutiques complémentaires, notamment la destabilase, les bdellines, l'hyaluronidase et les eglines. L'apyrase, également présente, joue un rôle inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire. L'hyaluronidase, quant à elle, facilite l'infiltration locale des médiateurs antithrombotiques

dans les tissus lésés, contribuant ainsi à la réduction de l'inflammation et de l'ischémie cellulaire, et accélérant par conséquent le processus de cicatrisation des plaies (Kamath, 2020).



**Fig. 8.** Traitement d'un hématome par les sangsues médicinales. (A) Hématome de la cuisse latérale droite avant le traitement, (B) Application des sangsues médicinales sur l'hématome, (C) Résolution complète de l'hématome après le traitement (Marquez-Gil et al., 2023).

## 2. Le chitosan

### 2.1 Aperçu historique

Le scientifique français Henri Braconnot découvrit la chitine en 1811 et la nomma « champignon ». En 1823, Odile découvrit la même substance dans la peau d'insectes et la nomma « chitine », dérivé du grec « kitos », signifiant membrane ou enveloppe. Cette découverte marqua le début d'une nouvelle orientation dans la recherche de biopolymères naturels. En 1859, le professeur Rouget créa un nouveau type de polymère biologique dérivé de la chitine, le « chitosane ». En 1878, la chitine et le chitosane suscitèrent un intérêt considérable. Depuis, la chitine est le deuxième biopolymère naturel le plus abondant au monde après la cellulose, et c'est également le sucre le plus abondant. [3] Elle se présente naturellement et contient des acides aminés et des sucres (Ben Amor, 2024).

### 2.2 Définition de la chitine

La chitine est un biopolymère, un polysaccharide (un type de sucre), composé de deux unités : la D-glucosamine et la N-acétyl-D-glucosamine liées de manière covalente  $\beta$  (1  $\leftarrow$  4). La chitine est le principal composant de l'exosquelette des crustacés et des insectes et est

considérée comme le deuxième polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose (**Fig. 9.**)(Ben Amor, 2024).

### 2.3 Définition du chitosane

Le chitosane est un biopolymère dérivé de la chitine. C'est un polymère non toxique, biocompatible, bioactif et biodégradable [5]. Il s'agit d'un polymère linéaire composé d'unités de D-glucosamine. La N-acétyl-D-glucosamine est liée par des liaisons  $\beta$  (1  $\leftarrow$  4) (**Fig. 9.**) (Ben Amor, 2024).

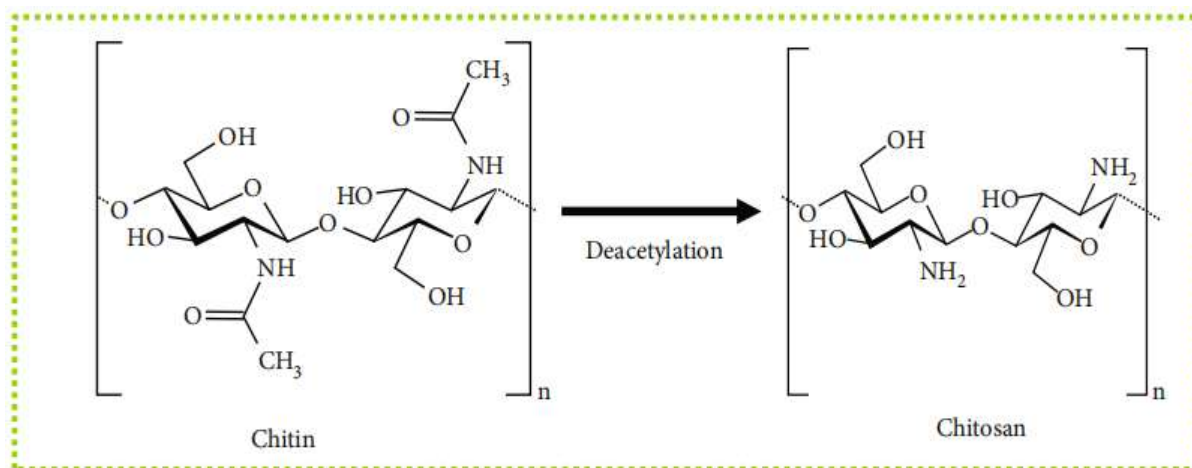


**Fig. 9.** Structure chimique de la chitine et du chitosane (Alemu & Mondal, 2023).

### 2.4 Sources naturelles de chitosane

La chitine et ses dérivés, comme le chitosane, sont extraits de nombreuses cellules vivantes (Figure 10). On l'isole couramment des parois cellulaires des champignons, des algues, des insectes, des céphalopodes (mollusques), des coquillages et des crustacés. Cependant, les principales sources commerciales de chitine sont les carapaces de crabes et de crevettes (**Fig. 10.**) (Ben Amor, 2024).

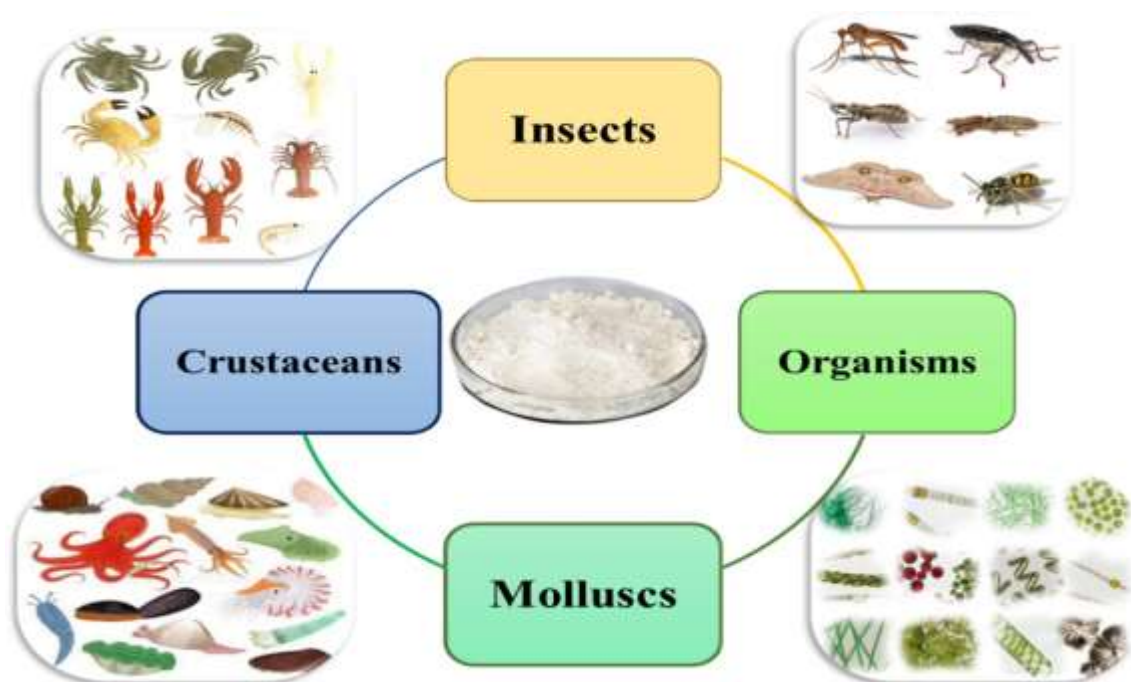


**Fig. 10.** Diverses sources pour l'extraction de la chitine et sa conversion ultérieure en chitosane (Karimlar et al., 2026).

## 2.5 Propriétés physicochimiques du chitosane.

La chitine et le chitosane sont des biopolymères constitués de milliers de résidus de d-glucosamine reliés par des liaisons  $\beta$ -(1–4). Selon le degré de désacétylation de la chitine, le chitosane renferme entre 15 et 50% d'unités N-acétyl-d-glucosamine, avec une teneur en azote variant de 5 à 8%, ce qui leur confère des rôles biologiques distinctifs. Le chitosane est un dérivé N-désacétylé de la chitine, obtenu par conversion des groupements acétamide en groupements amino primaires. Contrairement à la chitine, le chitosane présente une meilleure solubilité dans l'eau et une réactivité chimique supérieure, grâce à la présence de groupements hydroxyle primaires et secondaires sur chaque unité répétitive, ainsi qu'au groupement amine sur chaque unité désacétylée. Ces groupements réactifs sont facilement susceptibles de modifications chimiques, permettant de moduler ses propriétés mécaniques et physiques selon les besoins applicatifs. L'ensemble de ces caractéristiques font du chitosane un matériau particulièrement polyvalent et attractif pour de nombreuses applications industrielles et biomédicales. Ses propriétés globales découlent principalement de ses caractéristiques

physicochimiques, notamment la solubilité, le degré de désacétylation, la viscosité et le poids moléculaire (Alemu & Mondal, 2023).

### 2.5.1 Solubilité

Le chitosane présente une solubilité sélective, étant soluble en milieu acide et insoluble en milieu neutre ou alcalin. Bien que la chitine soit généralement insoluble dans la plupart des solvants, sa désacétylation génère un chitosane soluble dont les groupements amino primaires présentent une valeur de pKa de 6,5. En milieu acide, ces groupements amine se protonent et acquièrent une charge positive, assurant ainsi la solubilité du polymère en solution. Au-delà d'un pH de 6, la perte de cette charge entraîne la précipitation et l'insolubilisation du chitosane. Outre le pH, la solubilité du chitosane est également conditionnée par d'autres paramètres tels que le poids moléculaire, le degré de désacétylation, la température et la cristallinité du polymère (Alemu & Mondal, 2023).

### 2.5.2 Masse moléculaire.

Le poids moléculaire exerce une influence déterminante sur les propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane. Ce paramètre varie considérablement en fonction de la source du matériau de départ ainsi que des conditions de préparation et d'extraction appliquées. Sur cette base, le chitosane peut être classé en trois catégories : faible, moyen et élevé poids moléculaire. L'augmentation du poids moléculaire se traduit par une viscosité accrue et une solubilité réduite, caractéristiques peu favorables à de nombreuses applications industrielles. En revanche, le chitosane de faible poids moléculaire est davantage privilégié dans les applications biologiques et industrielles, en raison de sa meilleure solubilité et de sa stabilité supérieure (Alemu & Mondal, 2023).

### 2.5.3 Degré de désacétylation

Le degré de désacétylation constitue le paramètre le plus fondamental et le plus déterminant du chitosane. De nombreuses investigations scientifiques et diverses méthodologies de production ont démontré que la quasi-totalité des propriétés du chitosane, qu'elles soient physiques telles que la viscosité, la résistance thermique et la stabilité, ou chimiques telles que la solubilité, le pH de la solution et la réactivité, sont étroitement dépendantes de ce paramètre. Le degré de désacétylation (DD) est défini comme le rapport entre le nombre de groupements glucosamine et le nombre total de groupements N-acétylglucosamine (GlcNAc) et glucosamine (GlcN) présents dans la chaîne polymère (Ben Amor, 2024).

La valeur du DD permet de distinguer la chitine du chitosane ; un polymère est conventionnellement qualifié de chitosane lorsque sa valeur de DD dépasse 60%. Plusieurs techniques analytiques sont employées pour la détermination du degré de désacétylation, notamment la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie proche infrarouge (NIR), la spectroscopie ultraviolette, le titrage potentiométrique ainsi que la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). (Ben Amor, 2024).

#### 2.5.4 Viscosité

La viscosité représente l'un des paramètres clés conditionnant l'applicabilité industrielle du chitosane, étant étroitement liée au degré de désacétylation et au poids moléculaire du polymère. Elle augmente proportionnellement avec l'élévation du degré de désacétylation et la diminution du poids moléculaire. La taille des particules et la durée de stockage constituent également des facteurs influençant la viscosité du chitosane. Le nanochitosane présente une viscosité inférieure d'environ 30% à celle du chitosane ordinaire à concentration équivalente. Concernant l'effet du stockage, une réduction d'environ 10% de la viscosité est observée pour le chitosane normal après 24 heures, tandis que les nanocolloïdes enregistrent une diminution de 17% dans les mêmes conditions. La viscosité constitue par ailleurs un indicateur fiable de la stabilité du polymère en solution, une diminution progressive étant systématiquement constatée lors du stockage en raison de la dégradation graduelle du polymère (Alemu & Mondal, 2023).

### 2.6 Propriétés biologiques

Le chitosane peut être considéré comme un substitut des milieux biologiques, car ses liaisons glycosidiques et ses résidus N-acétyl-glucosamine sont présents dans la structure des matrices extracellulaires de la plupart des tissus vivants. Le chitosane est non toxique, biodégradable, biocompatible et biorésorbable. Il présente également des propriétés antithermogéniques, hémostatiques et antitumorales (Hassiba, 2014).

De plus, il ne manifeste aucun comportement antigénique. Le chitosane possède aussi des activités antifongiques et antibactériennes, et constitue un excellent agent cicatrisant. Lors de la précipitation, il perd ses charges positives et le doublet électronique de l'azote se libère. Ces doublets libres, ainsi que la présence de nombreux atomes d'oxygène dans sa structure, lui confèrent un pouvoir chélateur remarquable (Hassiba, 2014).

### 2.6.1 Activité anti-inflammatoire et antimicrobienne du chitosane .

L'étude des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes du chitosane suscite un vif intérêt ces dernières années. Ce polymère prometteur combat l'inflammation et les infections microbiennes. Selon des articles publiés, ses effets pro- ou anti-inflammatoires dépendent de la concentration, l'administration et la forme posologique. Le chitosane déclenche une réponse inflammatoire en stimulant le système immunitaire inné, incluant macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques. Cette activation induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6. Son action pro-inflammatoire favorise la cicatrisation des plaies en stimulant la néoangiogenèse et la migration immunitaire vers la lésion. D'autre part, le chitosane réduit les cytokines et chimiokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1), démontrant des propriétés anti-inflammatoires. L'interaction du chitosane avec les récepteurs Toll-like (TLR) sur les cellules immunitaires, impliqués dans la détection microbienne et l'inflammation, explique son effet anti-inflammatoire (Mawazi et al., 2024).

Le facteur NF- $\kappa$ B, qui contrôle les gènes pro-inflammatoires, représente une voie de signalisation influencée par le chitosane. L'activité antioxydante du chitosane améliore ses propriétés anti-inflammatoires en éliminant les ROS, impliqués dans le développement et la perpétuation de l'inflammation. Des rapports indiquent que les actions pro- et anti-inflammatoires du chitosane sont nuancées et situationnelles. L'activité inflammatoire du chitosane dépend de la concentration, formulation, type de cellule immunitaire et microenvironnement (Mawazi et al., 2024).

### 2.6.2 Mécanisme d'action antibactérien du chitosane

Le mécanisme antibactérien du chitosane repose principalement sur son adhésion aux parois bactériennes chargées négativement, entraînant une perturbation membranaire et une modification de la perméabilité cellulaire, suivie d'une liaison à l'ADN inhibant sa réplication et conduisant à la mort cellulaire. La structure polycationique du chitosane joue un rôle central dans cette activité, l'interaction électrostatique entre ses charges positives et les composants anioniques de la surface bactérienne étant proportionnelle à la densité de charge positive et au nombre de groupements amine présents sur la chaîne polymère. Les réseaux à base de chitosane, tels que les microsphères, exercent leur action antibactérienne en désorganisant la surface cellulaire bactérienne ou en formant une couche imperméable autour de la bactérie, empêchant ainsi les échanges essentiels et aboutissant à la mort cellulaire (**Fig. 11.**) (Mawazi et al., 2024).

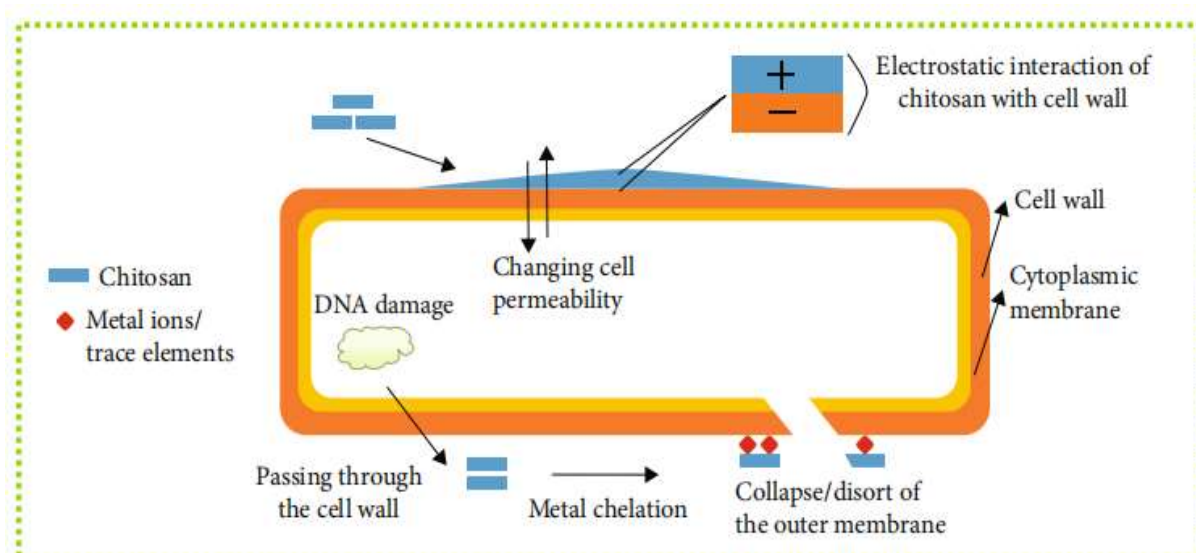


**Fig. 11.** Mécanismes antimicrobiens du chitosane [44] (Alemu & Mondal, 2023)

## 2.7 Rôle dans la cicatrisation

Le chitosane est reconnu pour son effet accélérateur remarquable sur le processus de cicatrisation des plaies, effet confirmé par de nombreuses investigations scientifiques. Ce biopolymère a été mis en œuvre sous diverses formes galéniques et structurales, notamment les nanofibres, les gels, les échafaudages, les membranes, les filaments, les poudres, les granulés, les éponges ainsi que les formulations composites. Sur le plan biochimique, les matériaux dérivés du chitosane interviennent dans la cicatrisation par plusieurs mécanismes interdépendants, incluant l'activation des cellules polynucléaires, la stimulation des fibroblastes, la production de cytokines, la migration des cellules géantes et l'induction de la synthèse du collagène de type IV. Les matrices de nanofibres ont démontré un potentiel particulièrement prometteur en tant qu'échafaudages d'ingénierie tissulaire destinés aux substituts cutanés. Parmi leurs avantages distinctifs, on relève une porosité élevée favorable aux échanges gazeux d'oxygène, une distribution variable de la taille des pores, un rapport surface/volume considérable, et surtout une similitude morphologique étroite avec la matrice extracellulaire naturelle de la peau, favorisant ainsi l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaires. Les avancées récentes en chimie des procédés ont permis d'élaborer des matériaux nanofibrillaires à base de chitosane dotés d'une flexibilité accrue, ouvrant de nouvelles perspectives pour le développement de produits biologiques innovants (**Fig.12.**) (Gokarneshan, 2017).

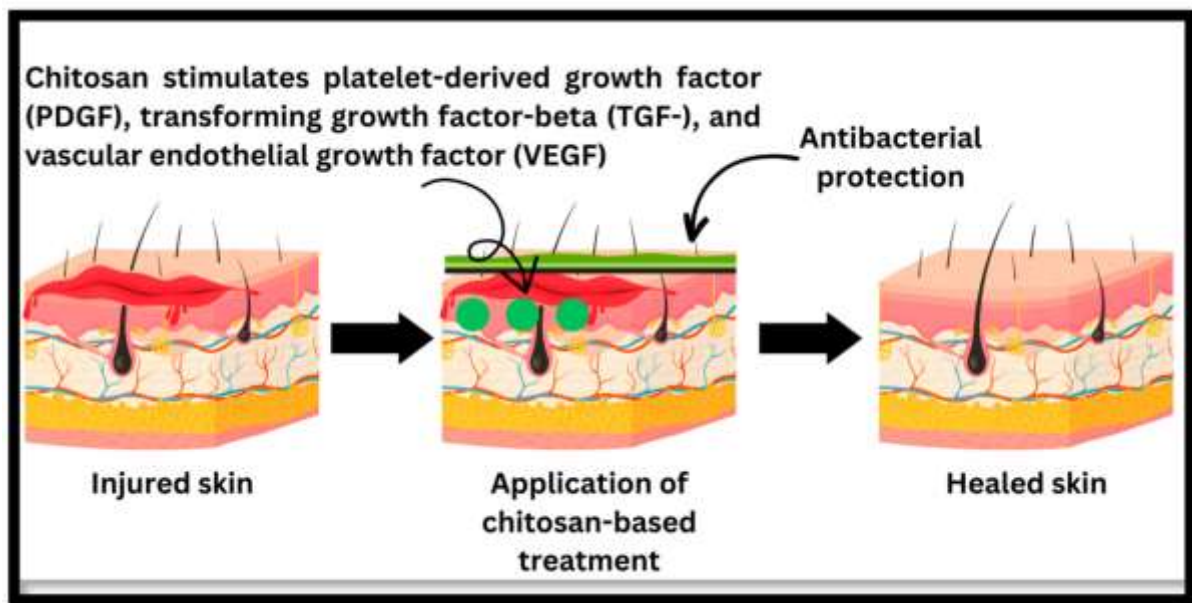


**Fig. 12.** Le processus de cicatrisation de la peau lésée : le chitosane inhibe la croissance bactérienne et accélère le processus de cicatrisation grâce à des facteurs de cicatrisation tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Mawazi et al., 2024).

### 3. Hydrogels

#### 3.1 Définition

Les hydrogels, apparus pour la première fois dans la littérature scientifique dans les années 1960, ont évolué depuis lors pour constituer une classe de matériaux particulièrement diversifiée. Leur propriété fondamentale réside dans leur capacité à gonfler en milieu aqueux sans se dissoudre, caractéristique qui découle de la présence de groupements fonctionnels hydrophiles sur leurs chaînes polymères, notamment les groupements  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$  et  $-SO_3H$ , tandis que les réticulations assurent le maintien de leur intégrité structurale. Cette combinaison confère aux hydrogels un état solide hautement hydraté, reproduisant fidèlement la teneur en eau ainsi que la nature souple et poreuse des tissus biologiques naturels, ce qui leur confère une biocompatibilité exceptionnelle (Gupta *et al.*, 2025).

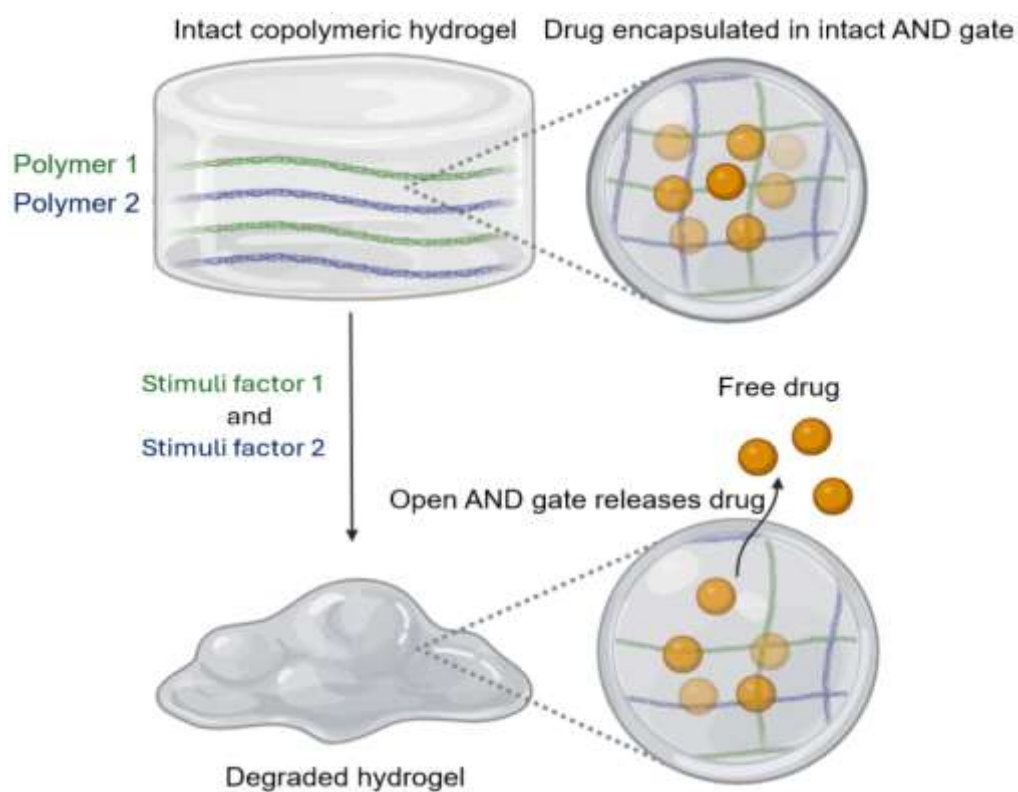


**Fig. 13.** Illustration d'une porte logique ET permettant la libération d'un médicament à partir d'un hydrogel. Le médicament est libéré uniquement si les polymères 1 et 2 sont activés simultanément par les facteurs de stimulation 1 et 2 (Dinh *et al.*, 2025).

#### 3.2 Classification des hydrogels

Les hydrogels se répartissent en trois catégories selon leur composition : naturels, synthétiques et composites.

### 3.2.1 Hydrogels naturels

Les hydrogels issus de polymères naturels présentent des propriétés physicochimiques et biologiques favorables aux applications biomédicales, notamment la biocompatibilité, la biodégradabilité, l'innocuité et la promotion de l'adhésion cellulaire. Leurs principales applications concernent les systèmes de libération contrôlée de médicaments (par exemple, hydrogels sensibles aux changements de pH ; les pourcentages de gonflement varient, entraînant la libération des molécules de médicament) et les pansements pour plaies (utilisés en raison de leur capacité à absorber l'exsudat de la plaie tout en permettant le passage d'oxygène vers le site de la plaie) (Gupta et al., 2025).

Les biopolymères naturels utilisés sont essentiellement des polysaccharides et des protéines, tels que le dextrane, l'acide hyaluronique, l'alginate, l'agarose, la pectine, la cellulose, le carraghénane et le chitosane (Gupta et al., 2025).

### 3.2.2 Hydrogels synthétiques

Les polymères synthétiques, notamment le polyéthylène glycol (PEG) et le polyacrylamide, constituent des candidats prometteurs pour la fabrication d'hydrogels, grâce à leur capacité à former des réseaux hydrophiles stables retenant l'eau et les fluides biologiques, tout en étant biocompatibles et biodégradables. Leurs propriétés mécaniques et adhésives peuvent être optimisées en modulant la concentration des agents de réticulation et les additifs incorporés (Gupta et al., 2025).

### 3.2.3 Hydrogels composites

Les hydrogels composites associent un polymère naturel et un polymère synthétique, conférant au matériau des propriétés mécaniques et biologiques complémentaires, les composants synthétiques assurant une meilleure résistance mécanique tandis que les composants naturels apportent des propriétés spécifiques telles que l'auto-cicatrisation (Gupta et al., 2025).

## 3.3 Applications des hydrogels dans la cicatrisation des plaies :

Les pansements en hydrogel créent un environnement humide pour la plaie, gèrent l'exsudat, procurent une sensation de fraîcheur et peuvent être chargés d'agents antimicrobiens ou de facteurs de croissance pour accélérer la cicatrisation (par exemple, pour les brûlures) (Gupta et al., 2025).

### **3.4 Hydrogels à base de chitosane pour le traitement des plaies**

Les hydrogels à base de chitosane ont été développés pour présenter des propriétés excellentes et modulables, favorisant et accélérant la cicatrisation des plaies. Ce polymère biocompatible, biodégradable et durable est conçu pour répondre à des stimuli internes et externes, donnant naissance à des hydrogels intelligents capables d'améliorer la qualité des soins et d'exercer un effet thérapeutique significatif. Cependant, ces hydrogels à base de chitosane sensibles aux stimuli se heurtent à des défis considérables pour leur transfert de la recherche expérimentale vers les applications cliniques. Étant donné que le pH des plaies chroniques est légèrement supérieur à celui de la peau normale, les hydrogels de chitosane à réponse pH-stimulée représentent une stratégie pertinente pour l'administration ciblée de médicaments au site de la plaie (*Rossary et al., 2025*).

# *Partie pratique*

---

# *Chapitre I*

## *Matériel & méthodes*

---

## 1. Matériel

### 1.1 Matériel biologique

#### 1.1.1 Sangsue médicinale

*Hirudo orientalis* a été obtenue auprès d'un médecin spécialisé en médecine alternative. Le poids des sangsues variait entre 0,9 et 1 g, avec un âge de 9 mois, et elles n'avaient pas été nourries de sang pendant 3 mois, une période nécessaire pour éliminer les résidus sanguins et assurer leur purification.

Ensuite, les sangsues ont été lavées, séchées et broyées, puis conservées au congélateur dans un récipient hermétiquement fermé jusqu'à leur utilisation.



**Fig. 14.** Sangsues médicinales (Image originale)

#### 1.1.2 Les crevettes

Les crevettes *Parapenaeus longirostris* ont été achetées fraîches sur le marché local. Afin d'éliminer les résidus et les impuretés, les carapaces ont été décortiquées et soigneusement lavées à l'eau courante. Ensuite, les échantillons ont été séchés puis broyés afin d'obtenir une poudre, et conservés dans des conditions appropriées jusqu'à leur utilisation.



**Fig. 15.** Carapaces des crevettes (Image originale)

### 1.2 Matériel animal

Un total de vingt-cinq (25) rats albinos mâles adultes de souche Wistar Albino rat, d'un poids moyen de  $209.2 \pm 18.3\text{g}$ , a été obtenu à partir de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie. Les animaux ont été transférés et hébergés dans l'animalerie du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'El-Oued, Algérie. Ils ont été acclimatés pendant deux semaines dans les mêmes conditions expérimentales, comprenant un cycle d'éclairage de 12 h lumière / 12 h obscurité, une humidité relative de  $64 \pm 2\%$ , et une température ambiante de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Une alimentation standard pour rats (Southon et al., 1984) et de l'eau du robinet ont été fournies ad libitum tout au long de l'expérimentation. Le soin et la manipulation des animaux durant toutes les procédures expérimentales ont été réalisés conformément aux recommandations du comité d'éthique local.

### 1.3 Souches bactériennes

Les échantillons ont été testés afin d'évaluer leur activité antibactérienne contre trois souches bactériennes obtenues au laboratoire de l'Institut Pasteur d'Algérie, incluant une souche Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25932) et deux souches Gram négatives (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Escherichia coli* ATCC 25922).

### 1.4 Produits chimiques et réactifs

DPPH ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ,  $\geq 95\%$ ) et Acide ascorbique ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ,  $\geq 99\%$ ), Hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ,  $\geq 98\%$ ), Acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ,  $\geq 37\%$ ), Peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2 \approx 30$

%), Chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ,  $\geq 99\%$ ), Acide acétique ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 99–100 %), Alloxane monohydrate ( $\text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98\%$ ), Acide acétylsalicylique ( $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ ,  $\geq 99\%$ ), Acide trichloroacétique ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ,  $\geq 99\%$ ), Albumine sérique bovine ( $\text{BSA} \geq 98\%$ ), Éthanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , 95 %), Bleu de Coomassie G-250 ( $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$ , grade analytique  $\sim 95\%$ ), Acide éthylènediaminetétraacétique – EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ , 99,0 %), phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Citrate de sodium ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ , 99 %), Acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85 %), Butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ,  $\geq 99\%$ ), Acide thiobarbiturique ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ,  $\geq 98\%$ ). Tous les produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude étaient de qualité analytique et provenaient de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis).

## 2. Méthodes

### 2.1 Étude *in vitro*

#### 2.1.1 Extraction de la Substance Biologique Active (BAS)

Les sangsues ont été lavées avec de l'eau distillée, puis placées dans des boîtes de Petri hermétiquement fermées et congelées pendant 24 heures. Ensuite, les échantillons ont été lyophilisés à  $-80^\circ\text{C}$  pendant 48 heures, puis broyés pour obtenir une poudre fine.

Une quantité de 0,5 g de poudre de sangsue a été pesée et mélangée avec 10 mL de solution de chlorure de sodium 0,9%, préparée dans de l'eau déionisée, puis le mélange a été incubé pendant 45 minutes. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 15000 g pendant 30 minutes à  $4^\circ\text{C}$ .

Enfin, le surnageant obtenu a été collecté et utilisé comme substance biologique active (BAS) à une concentration de 5% pour les étapes ultérieures de l'étude (**Fig. 16.**) (Amaniet *al.*, 2021).

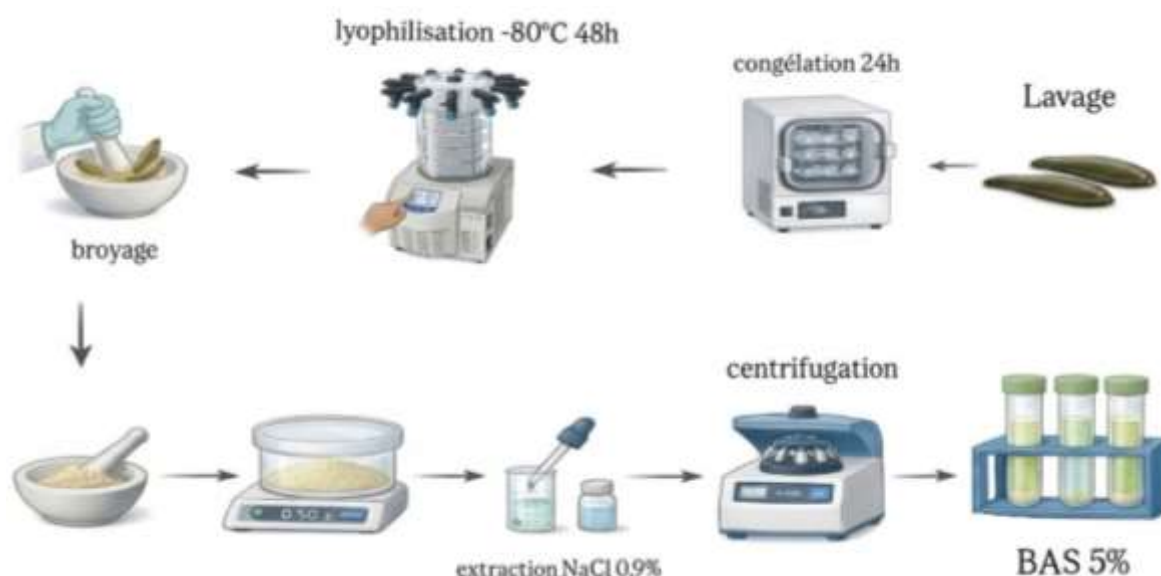


**Fig. 16.** Extraction de la substance biologique active (BAS) à partir des sangsues

## 2.1.2 Extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes

### 2.1.2.1 Préparation de la matière première

Les carapaces de crevettes de l'espèce *Parapenaeus longirostris* ont été collectées puis lavées à l'eau courante afin d'éliminer les impuretés superficielles. Elles ont ensuite été immergées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2,5 % pour la désinfection et la réduction de la charge microbienne (Vilar Junior et al.,2016).

Après ce traitement, les carapaces ont été abondamment rincées à l'eau pour éliminer les résidus d'hypochlorite, puis séchées dans une étuve à 60°C pendant 24 heures jusqu'à dessiccation complète. Les carapaces sèches ont été broyées afin d'obtenir une poudre fine, puis tamisées à l'aide d'un tamis de 16 mesh pour assurer une granulométrie uniforme. La poudre obtenue a été utilisée pour les étapes ultérieures de l'extraction (Ben Amor et al.,2024).

### 2.1.2.2 Extraction du chitosane

L'extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes a été effectuée selon un procédé en quatre étapes principales : la déminéralisation, la déprotéinisation, la décoloration et la désacétylation.

#### a. Déminéralisation

Une masse de 30 g de poudre de carapaces de crevettes a été ajoutée à 300 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 7 %. La déminéralisation a été réalisée pendant 1

heure à 40 °C, sous agitation continue, afin de favoriser la réaction entre l'acide et les minéraux présents, notamment le carbonate de calcium.

À l'issue du traitement, le mélange a été filtré, puis le résidu solide a été lavé plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à disparition des effervescences et obtention d'un pH faiblement acide à neutre. Le produit obtenu correspond à des carapaces déminéralisées (*Ben Amor et al.,2024*).

### **b. Déprotéinisation**

Afin d'éliminer les protéines, une solution alcaline de NaOH à 10 % (m/v) a été préparée en dissolvant 10 g de NaOH dans 100 mL d'eau distillée. L'échantillon déminéralisé a été immergé dans cette solution et maintenu pendant 2 heures à 80 °C sous agitation continue.

Après traitement, l'échantillon a été filtré puis lavé abondamment à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH voisin de 7. Cette étape permet d'obtenir de la chitine brute (*Ben Amor et al.,2024*).

### **c. Décoloration**

La décoloration a été effectuée en traitant la chitine brute avec 100 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 10 %, pendant 30 minutes à 50 °C, sous agitation continue.

Afin d'optimiser l'élimination des pigments, ce traitement a été répété trois fois. Les échantillons ont ensuite été lavés à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Le produit obtenu est une chitine purifiée, claire et dépourvue d'impuretés colorées (*Ben Amor et al.,2024*).

### **d. Désacétylation**

Pour convertir la chitine en chitosane, une solution alcaline concentrée de NaOH à 50 % (m/v) a été préparée en dissolvant 50 g de NaOH dans 100 mL d'eau distillée.

L'échantillon décoloré a été immergé dans cette solution, puis chauffé pendant 4 heures à 100 °C sous agitation continue afin d'assurer une désacétylation complète.

Après réaction, l'échantillon a été filtré et abondamment lavé à l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH voisin de 7, permettant ainsi d'éliminer les résidus alcalins. Enfin, le chitosane obtenu a été séché dans une étuve à 50 °C pendant 24 heures, donnant un produit final sous forme solide et sèche (*Ben Amor et al.,2024*).

### 2.1.2.3 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé selon l'équation suivante (1) :

$$\text{Rendement}(\%) = \left[ \frac{W_1}{W_2} \right] \times 100 \quad (1)$$

Où **W1** représente la masse de l'extrait obtenu et **W2** la masse de la poudre de matière séchée (Boutennoun et al., 2017).

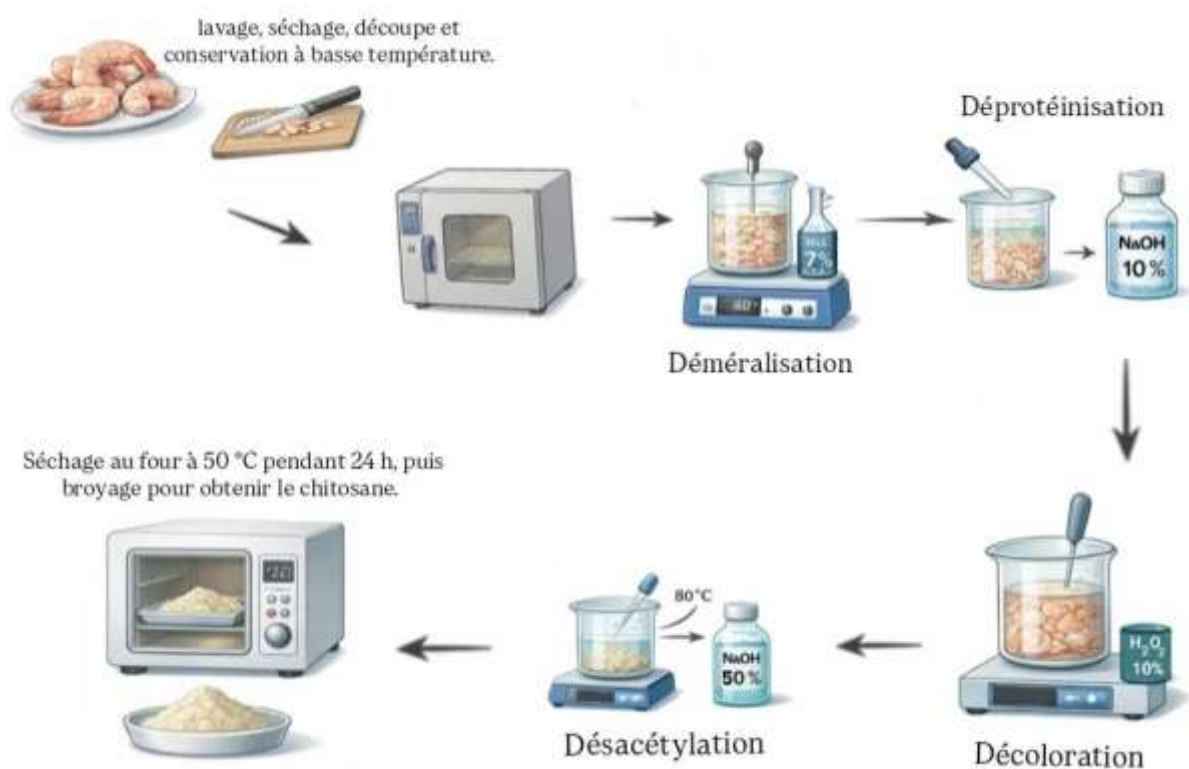


Fig. 17. Extraction du chitosane



Fig. 18. Poudre de chitosane (Image originale).

#### 2.1.2.4 Détermination des propriétés physicochimiques du chitosane préparé

##### a. Détermination de la teneur en cendres (Ash Content, AC)

La teneur en cendres a été déterminée en mesurant la masse des résidus minéraux obtenus après la calcination du chitosane. Une quantité de 0,25 g de chaque échantillon de chitosane a été placée dans un four à moufle à 650°C pendant 4 heures. Après calcination, les creusets ont été laissés refroidir dans un dessiccateur, puis pesés de nouveau. Le pourcentage de cendres a été calculé selon l'équation suivante (2) (Ben Amor et al., 2024) :

$$\text{Cendres \%} = \left[ \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \right] \times 100 \quad (2)$$

Où :  $W_1$  = masse de l'échantillon avant calcination (g),  $W_2$  = masse de l'échantillon après calcination (g).

##### b. Mesure de la teneur en humidité (MC)

La teneur en humidité du chitosane préparé a été déterminée par la mesure de la masse d'eau. Les échantillons de chitosane ont été séchés dans un four à 110 °C pendant 24 heures, puis la teneur en humidité en pourcentage a été calculée à l'aide de la formule suivante (3) (Ben Amor et al., 2024) :

$$\text{Teneur en humidité \%} = \left[ \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \right] \times 100 \quad (3)$$

Où  $W_1$  est le poids de l'échantillon humide et  $W_2$  est le poids de l'échantillon sec après séchage.

#### 2.1.2.5 Techniques de caractérisation utilisées

Afin d'évaluer les propriétés structurales et physicochimiques du chitosane préparé, quatre techniques analytiques principales ont été employées, à savoir :

##### a. Spectroscopie UV-Visible

L'absorbance du chitosane a été analysée en dissolvant 5mg de chitosane dans 5 mL d'une solution d'acide acétique à 1 %, puis en agitant la solution jusqu'à dissolution complète.

La solution obtenue a ensuite été soumise à un balayage spectrophotométrique à l'aide d'un appareil UV-Vis, et les valeurs d'absorbance ont été enregistrées dans la gamme spectrale de 200 à 600 nm (Ben Amor et al., 2024).

### b. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR du chitosane ont été obtenus à l'aide de l'appareil Nicolet iS50 dans la gamme spectrale allant de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , afin d'identifier les groupes fonctionnels caractéristiques du chitosane et de vérifier le succès du processus de désacétylation (Ben Amor et al., 2024).

Le pourcentage de désacétylation du chitosane, selon la formule suivante (4) :

$$\text{DD}\% = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655\text{cm}^{-1}}}{A_{3450\text{cm}^{-1}}} \right) \times \frac{100}{1.33} \right] \quad (4)$$

Où **A1655** : l'absorbance à 1655  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à la vibration de la bande Amide I.

**A3450** : l'absorbance à 3450  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à la bande de vibration du groupe hydroxyle (O-H).

### c. Diffraction des rayons X (XRD)

Le degré de cristallinité du chitosane a été analysé à l'aide d'un appareil de diffraction des rayons X (XRD) équipé d'une source Cu  $K\alpha$ , avec une tension de fonctionnement de 45 kV et un courant de 30 mA. L'échantillon a été examiné dans une plage d'angle de diffraction comprise entre  $2\theta = 9^\circ$  et  $40^\circ$ , avec une vitesse de balayage de 4 minutes par mesure, et à une température constante de 25  $^\circ\text{C}$  (Ben Amor et al., 2024).

L'indice de cristallinité selon l'équation suivante (5) :

$$\text{CrI} = \frac{(I_{110} - I_{\text{am}})}{I_{110}} \quad (5)$$

Où **I110** : l'intensité du pic cristallin à  $2\theta \approx 20^\circ$  **Iam** : l'intensité de la zone amorphe à  $2\theta \approx 11^\circ$

### d. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée afin d'examiner les caractéristiques morphologiques ainsi que la structure de surface des échantillons de chitosane préparé. L'analyse a été réalisée sans aucun revêtement préalable de la surface de l'échantillon. Les micrographies de surface ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type Leo Supra 55 – Zeiss Inc (MEB), sous une tension d'accélération de 15,0 kV et avec un grossissement approprié permettant l'observation de la microstructure de l'échantillon, à une échelle de 500 nm. Cette technique a permis d'évaluer la morphologie de surface et les caractéristiques structurales du chitosane préparé (Ben Amor et al., 2024).

### 2.1.3 Activités biologiques *in vitro* de l'extrait d'*Hirudo medicinalis* et du chitosane

#### 2.1.3.1 Activité de piégeage du radical libre (DPPH)

Un volume de 1 mL de la solution de DPPHest mélangé avec 1 mL de chaque concentration de l'extrait ou du chitosane (ou avec l'acide ascorbique en tant que témoin positif). Après agitation, le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 30 minutes dans l'obscurité afin de permettre l'achèvement de la réaction. À la fin de l'incubation, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, conformément à la méthode décrite par *Mansouri et al.* (2005).

Le pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH a été calculé selon l'équation suivante(6) :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{contrôle}}} \right] \times 100 \quad (6)$$

**Abs contrôle :** absorbance du témoin contenant tous les réactifs sauf l'échantillon.

**Abs échantillon :** absorbance après addition de l'extrait ou du chitosane.

#### 2.1.3.2 Activité de Peroxydation Lipidique (TBARS)

L'activité antioxydante de l'extrait d'*Hirudo medicinalis* et du chitosane a été évaluée *in vitro* par la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), basée sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Un volume de 0,5 mL d'émulsion de jaune d'œuf (10 %) a été mélangé avec 1 mL de chaque concentration de l'extrait ou du chitosane (l'acide ascorbique étant utilisé comme témoin positif), puis 0,05 mL de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,07 M) a été ajouté afin d'induire la peroxydation lipidique (*Hidayathulla et al.*,2014; *Siddique et al.*,2012).

Les tubes ont été incubés pendant 30 minutes à l'obscurité, à température ambiante. Après incubation, les réactifs suivants ont été ajoutés successivement : 1,5 mL d'acide acétique à 20 % (pH ajusté à 3,5 avec NaOH), 1,5 mL d'une solution d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,8 %, et 0,05 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %.

Les mélanges ont été vigoureusement agités afin d'assurer leur homogénéité, puis chauffés pendant 60 minutes dans un bain-marie bouillant (≈ 100 °C). Après refroidissement, 5 mL de butanol ont été ajoutés, suivis d'une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes.

L'absorbance de la phase organique a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé selon la formule suivante (Hidayathulla *et al.*, 2014) :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{contrôle}}} \right] \times 100 \quad (7)$$

**Abs contrôle** : absorbance du témoin contenant tous les réactifs sauf l'échantillon.

**Abs échantillon** : absorbance après addition de l'extrait.

### 2.1.3.3 Activité anti-inflammatoire

Le mélange réactionnel (2,5 mL) contenait 100 µL de BSA, 1,4 mL de tampon phosphate (pH = 6,4), puis 1 mL de différentes concentrations de l'extrait et de l'aspirine (échantillon standard) a été ajouté. De plus, 1 mL d'eau distillée a été utilisé à la place de l'extrait ou de l'aspirine afin de préparer l'échantillon témoin (contrôle). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 15 minutes à 37 °C dans un bain-marie, puis chauffé pendant 5 minutes à 70 °C. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en utilisant le tampon comme blanc (Dharmadeva *et al.*, 2018).

Le pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante(8) :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{contrôle}}} \right] \times 100 \quad (8)$$

**Abs contrôle** : absorbance du témoin contenant tous les réactifs sauf l'échantillon.

**Abs échantillon** : absorbance après addition de l'extrait.

### 2.1.3.4 Activité anticoagulante

Un test d'activité anticoagulante a été réalisé afin d'évaluer l'effet des composants biologiques sur les paramètres de coagulation dans le plasma.

Tout d'abord, 2,3 mL de sang humain frais ont été collectés dans des tubes contenant 3,2 µL de citrate de sodium à 3,8 % comme anticoagulant. Après un mélange doux, le sang a été centrifugé à  $5000 \times g$  pendant 20 minutes à 4 °C afin d'isoler le plasma (Amaniet *al.*, 2021).

Un volume de 1 mL de plasma séparé a été utilisé, auquel ont été ajoutées différentes concentrations de l'extrait testé, puis les échantillons ont été mis en rotation pendant 45 minutes afin d'assurer un contact efficace.

Après homogénéisation, les échantillons ont été soumis à l'analyse des paramètres de coagulation à l'aide d'un coagulomètre Sysmex CS-1600, permettant de déterminer le temps de prothrombine (PT, en secondes), le pourcentage de TP (%), l'INR et le temps de céphaline activée (TCK).

#### 2.1.3.5 Dosage des protéines par Bradford

La préparation du réactif de Bradford se fait en dissolvant 100 mg de bleu de Coomassie (Coomassie Blue) dans 50 mL d'éthanol à 95 %, puis le mélange est agité pendant deux heures dans l'obscurité. Par la suite, 100 mL d'acide orthophosphorique ( $H_3PO_4$ ) à 85 % sont ajoutés.

Le volume final est complété à 1 litre avec de l'eau distillée, puis la solution obtenue est filtrée à l'aide d'un papier filtre.

**Remarque :** Ce réactif reste stable pendant deux semaines à 4 °C.

On ajoute 5 mL du colorant bleu de Coomassie à 1 mL de l'extrait, puis après cinq minutes, l'absorbance est mesurée à 595 nm par rapport à un blanc (Blank).

Pour déterminer la présence et la quantité de protéines, la concentration obtenue est comparée à une courbe étalon d'albumine sérique bovine (BSA) avec les concentrations suivantes : 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1 mg/mL, préparées dans les mêmes conditions expérimentales (Laib.,2023).

#### 2.1.3.6 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait de sangsue et de l'extrait de chitosane a été évaluée par la méthode de diffusion en puits sur gélose Mueller–Hinton (MHA) contre trois souches bactériennes de référence : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries à Gram négatif), ainsi que *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif). Le milieu a été préparé et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes, puis coulé dans des boîtes de Pétri (90 mm) avec une épaisseur d'environ 4 mm, conformément aux protocoles standard.

Les suspensions bactériennes fraîches (18–24 h) ont été ajustées à la turbidité standard de 0,5 McFarland ( $\approx 1,5 \times 10^8$  UFC/mL), puis ensemencées uniformément à l'aide d'un écouvillon stérile.

Les concentrations testées (25 %, 50 %, 75 % et 100 % v/v) ont été préparées à partir des solutions mères des deux extraits. L'eau distillée stérile a été utilisée pour la dilution de l'extrait de sangsue, tandis que l'acide acétique dilué a été utilisé pour la dilution de l'extrait de chitosane. Des puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés, et 50 µL de chaque concentration ont été déposés. Une solution de NaCl 0,9 % a été utilisée comme témoin négatif général, tandis que l'acide acétique a servi de témoin négatif spécifique pour le chitosane. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures selon les recommandations du CLSI.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (mm) à l'aide d'un pied à coulisse numérique. Une zone supérieure à 6 mm a été considérée comme indiquant une activité antibactérienne réelle (Bonev et al., 2008 ; Kiehibauch et al., 2000).

### 2.1.3.7 Formulation d'un hydrogel

Pour la préparation de l'hydrogel à base de chitosane, 0,75 g de chitosane ont été dissous dans 50 mL d'une solution d'acide acétique à 0,5 % (v/v), sous agitation magnétique (250 tr/min) pendant 6 heures à température ambiante, afin d'obtenir une solution homogène de chitosane à 1,5 % (m/v). Ensuite, le pH a été ajusté progressivement par ajout goutte à goutte d'une solution d'hydroxyde de sodium (3 M) sous agitation modérée, jusqu'à atteindre un pH proche de 7, induisant la formation de l'hydrogel. Après gélification, 3 g de glycérol ont été ajoutés en tant que plastifiant, ainsi que 5 mL d'extrait de sangsue à une concentration de 5%. Le mélange a ensuite été agité doucement afin d'assurer l'homogénéité sans altérer la structure du gel. Enfin, l'hydrogel a été transféré dans des récipients stériles hermétiquement fermés et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation (Maiz-Fernández et al., 2022).

## 2.2 Étude *in vivo*

### 2.2.1 Diabète induit par l'alloxane chez les rats

Après une période d'acclimatation de deux semaines et après un jeûne nocturne, les rats (n = 25) ont reçu une injection unique par voie intrapéritonéale d'une solution fraîchement préparée d'alloxane monohydrate (Alloxan monohydrate) (Sigma) à une dose de 150 mg/kg de poids corporel (Madubunyi et al., 2012). L'alloxane a été dissous dans une solution physiologique (NaCl 0,9 %).

Après l'injection intrapéritonéale d'alloxane, les rats ont reçu immédiatement, par gavage, une solution de glucose à 5 % afin de prévenir une hypoglycémie aiguë potentiellement létale. La glycémie a été mesurée 72 heures après l'injection à l'aide d'un glucomètre (Vital-Check ; TECO Diagnostics, Corée) (**Fig.19.**) (Benmoussa.,2020;Majdoubal et al.,2025).

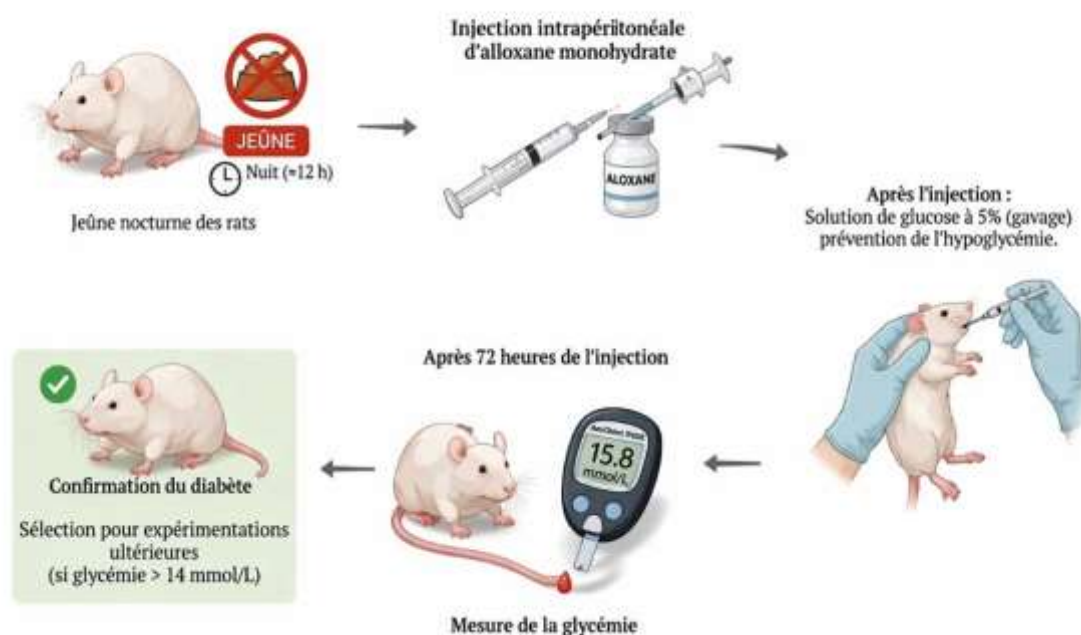


**Fig. 19.** Induction expérimentale du diabète chez les rates

### 2.2.2 Induction des plaies expérimentales

Après 72 heures de l'induction du diabète et la confirmation de son installation, des plaies cutanées expérimentales ont été réalisées. La région dorsale des rats a été rasée sous anesthésie générale induite par le chloroforme dans une chambre fermée, puis désinfectée à l'aide d'un alcool médical. Ensuite, des plaies d'excision cutanée de pleine épaisseur (full-thickness excision wounds) ont été réalisées au niveau du dos de tous les rats, avec un diamètre uniforme d'environ 1 cm, à l'aide d'instruments chirurgicaux stériles (scalpel et pince) (**Fig. 20.**) (Majdoubal et al.,2025).

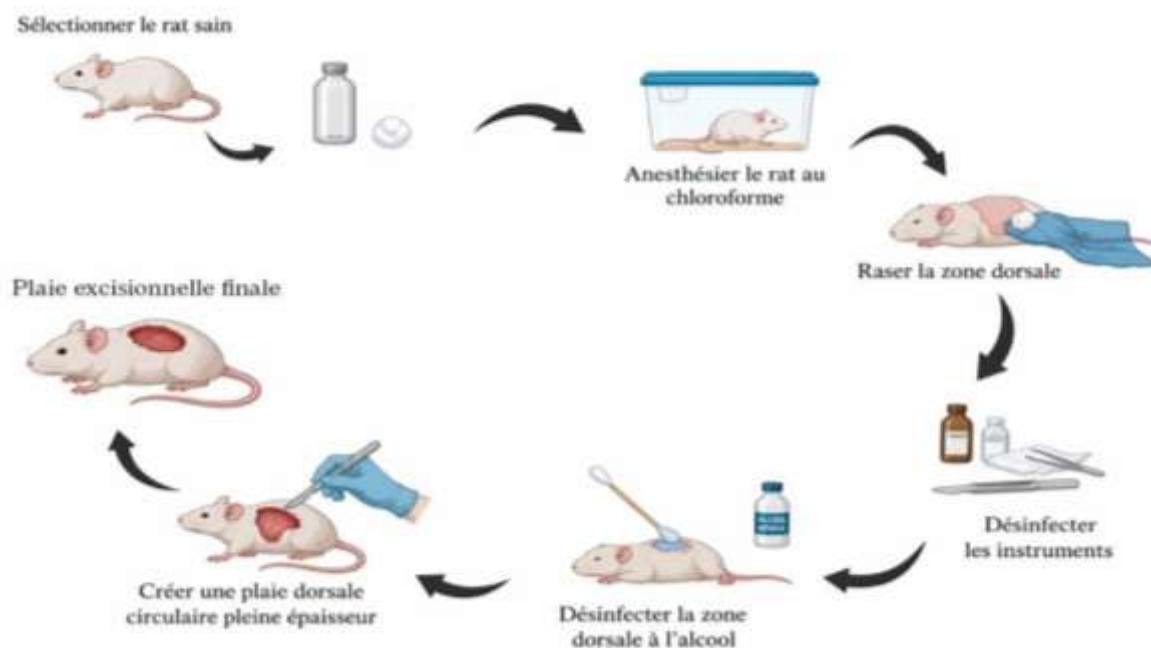


**Fig. 20.** Schéma illustrant le protocole expérimental et l'induction de la plaie dorsale chez le rat.

### 2.2.3 Plan expérimental et traitement

Vingt-quatre heures après l'induction des plaies cutanées, le traitement a été initié. Il a été appliqué une fois par jour, à la même heure, pendant 14 jours consécutifs.

Tous les groupes ont été maintenus dans les mêmes conditions expérimentales.

Des rats Wistar mâles adultes ont été répartis aléatoirement en cinq groupes, avec cinq rats par groupe ( $n = 5$ ), comme suit :

- ✓ **Groupe I :** rats diabétiques présentant des plaies non traitées (groupe **contrôle**).
- ✓ **Groupe II :** rats diabétiques présentant des plaies, traités localement avec un extrait de sangsue à 5%.
- ✓ **Groupe III :** rats diabétiques présentant des plaies, traités localement avec du chitosane à 1,5%.
- ✓ **Groupe IV:** rats diabétiques présentant des plaies, traités avec un hydrogel contenant l'extrait de sangsue (5%) et le chitosane (1,5%).
- ✓ **Groupe V :** rats diabétiques présentant des plaies, traités avec une pommade de référence (ZETA).

À la fin de l'expérience, les animaux ont été euthanasiés sous anesthésie afin de prélever les échantillons biologiques pour analyse.

## 2.2.4 Paramètres utilisés pour l'évaluation et le suivi de la cicatrisation des plaies d'excision

### 2.2.4.1 Évaluation morphologique

Selon la méthode décrite par (Fikru et al., 2012), les changements progressifs de la surface des plaies au cours de la période de traitement ont été documentés à l'aide d'un appareil photo d'un téléphone Samsung A12. Les prises de vue ont été réalisées aux jours 1, 3, 5, 7, 9, 11 et 13, et le suivi a été poursuivi jusqu'à la cicatrisation complète de chaque plaie.

### 2.2.4.2 Mesure de la surface de la plaie

Les contours de la plaie ont été tracés manuellement à l'aide d'une feuille transparente, puis la surface a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (ou le nom du logiciel réellement utilisé peut être indiqué) (Subramanian et al., 2023).

Le taux de contraction de la plaie a été calculé selon la formule suivante (9):

$$\text{Contraction de la plaie (\%)} = \left[ \frac{(\text{Surface de la plaie au jour 0} - \text{Surface de la plaie au jour } n)}{\text{surface de la plaie au jour 0}} \right] \times 100 \quad (9)$$

## 2.2.5 Préparation des échantillons

### 2.2.5.1 Euthanasie et collecte du sang

À la fin de la période de traitement (après 14 jours), les rats ont été soumis à un jeûne de 16 heures, puis légèrement anesthésiés à l'aide de chloroforme à 94 %, suivi de l'euthanasie.

Le sang a été prélevé chez tous les animaux et réparti dans deux types de tubes :

- ✓ **Tubes EDTA étiquetés et numérotés pour chaque rat, destiné aux analyses hématologiques.**
- ✓ **Tubes secs (tubes S / tubes sérum) destinés à l'obtention du sérum pour les analyses biochimiques.**

Le sérum a été obtenu en laissant le sang coaguler, puis en le centrifugeant à 2500 tours/min pendant 10 minutes. Le sérum récupéré a été conservé à -20 °C jusqu'aux analyses biochimiques.

### **2.2.5.2 Paramètres hématologiques**

Les paramètres hématologiques ont été mesurés, incluant le nombre de globules rouges (RBC), la concentration en hémoglobine (Hb), l'hématocrite (HCT), le nombre de globules blancs (WBC) ainsi que le nombre de plaquettes. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un analyseur hématologique automatique.

La technique de Coulter a été utilisée via l'analyseur hématologique automatisé Medonic (Medonic CA620, Boule Diagnostics, Stockholm, Suède), afin de garantir la précision des mesures.

### **2.2.5.3 Analyse des paramètres biochimiques**

Les concentrations de la glycémie, de la protéine C-réactive (CRP) et de l'antistreptolysine O (ASLO) ont été déterminées chez chaque rat à l'aide de kits commerciaux de la société Spinreact (Espagne), selon les références suivantes : glucose (1001200), protéine C-réactive (1200301) et antistreptolysine O (1200101). Toutes les analyses ont été réalisées conformément aux instructions du fabricant, afin de garantir la précision et la fiabilité des résultats.

### **2.2.5.4 Évaluation histopathologique**

Les échantillons tissulaires ont été immédiatement fixés dans une solution de formaldéhyde tamponné à 10 % afin de préserver l'intégrité des structures cellulaires et d'éviter toute dégradation, puis laissés toute une nuit dans le fixateur. Par la suite, les échantillons ont été déshydratés à l'aide d'une série croissante d'éthanol (60 %, 70 %, 80 % et 100 %), avec un renouvellement progressif des solutions afin d'assurer une élimination complète de l'eau. Les tissus ont ensuite été clarifiés dans le xylène afin d'éliminer les résidus d'alcool, puis inclus dans la paraffine. Des coupes fines de 4 à 6 µm ont été réalisées à partir des blocs de paraffine à l'aide d'un microtome rotatif (Thermo Scientific Micron HM 325). Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), une méthode standard permettant d'évaluer les caractéristiques cellulaires et tissulaires. Pour chaque rat, deux à trois lames histologiques ont été préparées et analysées à l'aide d'un microscope optique afin d'évaluer les modifications morphologiques, notamment l'épaisseur de l'épiderme, les altérations du derme, la réponse inflammatoire ainsi que les anomalies cellulaires éventuelles.

#### **2.2.5.5 Analyse bactériologique**

Après l'euthanasie, des échantillons ont été prélevés à la surface des plaies traitées à l'aide d'écouvillons stériles, puisensemencés sur des milieux Hektoen, gélose au sang (Blood agar) et CHROMagar. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Les caractéristiques morphologiques des colonies ont ensuite été évaluées, suivies de l'identification bactérienne à l'aide du système automatisé VITEK 2.

#### **2.2.5.6 Analyse statistique**

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS version 26.0 et présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). La normalité des données ainsi que l'homogénéité des variances a été vérifiées avant l'application d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA à un facteur), suivie du test post hoc de Tukey (HSD), avec un seuil de signification fixé à  $p < 0,05$ .

# *Chapitre II*

## *Résultat & discussion*

---

# *Conclusion*

---

### Conclusion

Cette étude a démontré avec succès le potentiel thérapeutique d'un hydrogel bioactif innovant, combinant du chitosane extrait de carapaces de crevettes et un extrait biologique de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*, pour la prise en charge des plaies chroniques diabétiques. Grâce à une approche globale, un chitosane de haute qualité, présentant un excellent degré de désacétylation et une intégrité structurale remarquable, a été obtenu, tandis que l'extrait de sangsue a démontré de puissantes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticoagulantes et antibactériennes. Intégrés dans une matrice d'hydrogel, ces composants ont produit un effet synergique ciblant efficacement de multiples mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la cicatrisation altérée des plaies chez les patients diabétiques.

Les résultats expérimentaux ont apporté des preuves solides de la performance supérieure de l'hydrogel. Les évaluations *in vitro* ont confirmé une activité significative de piégeage des radicaux libres, des effets anti-inflammatoires notables et une forte action antibactérienne contre les pathogènes courants des plaies. Plus important encore, l'étude *in vivo* sur des rats diabétiques induits par l'alloxane a révélé une accélération remarquable de la fermeture des plaies, une réépithélialisation améliorée, une réorganisation dermique optimisée et une réduction de l'inflammation chronique et de la charge bactérienne. Les observations macroscopiques, les analyses biochimiques, les évaluations bactériologiques et les examens histopathologiques ont tous systématiquement corroboré ces résultats, démontrant une amélioration nette et statistiquement significative à tous les stades du processus de cicatrisation par rapport aux groupes témoins.

La force de cette recherche réside dans sa méthodologie multidisciplinaire et intégrative, qui a combiné une caractérisation physico-chimique avancée (UV-Vis, FTIR, DRX, MEB) à des évaluations biologiques et histologiques approfondies. Cette approche holistique a non seulement validé la qualité et la biocompatibilité de l'hydrogel développé, mais a également mis en évidence sa multifonctionnalité – alliant biocompatibilité, biodégradabilité, activité antimicrobienne et capacité régénératrice – faisant de lui un candidat prometteur pour les soins avancés des plaies.

### Perspectives :

- 
- ✓ Optimisation de la formulation hydrogel afin d'améliorer ses propriétés physicochimiques, rhéologiques, sa stabilité, son adhésion cutanée et le contrôle de la libération des composés bioactifs.
  - ✓ Identification et caractérisation des molécules bioactives présentes dans l'extrait de *Hirudo medicinalis* responsables des activités cicatrisantes, anti-inflammatoires, anticoagulantes et antioxydantes observées.
  - ✓ Analyse de l'expression des biomarqueurs clés de la cicatrisation, tels que VEGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MMP-2 et MMP-9, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du traitement.
  - ✓ Développement de formulations avancées, intégrant des nanoparticules bioactives ou des agents antimicrobiens naturels afin d'augmenter davantage l'efficacité thérapeutique de l'hydrogel.
  - ✓ Études de stabilité à long terme pour déterminer la durée de conservation optimale et les conditions de stockage du biomatériau développé.
  - ✓ Évaluations toxicologiques et biosécuritaires approfondies, incluant la biocompatibilité, l'irritation cutanée et l'innocuité à long terme avant toute application clinique.
  - ✓ Validation sur des modèles expérimentaux plus complexes, notamment des modèles de plaies chroniques sévères, infectées ou associées à d'autres comorbidités métaboliques.

En conclusion, cette étude ouvre de nouvelles perspectives en médecine régénérative et en ingénierie tissulaire en présentant une stratégie thérapeutique naturelle, efficace et multifonctionnelle pour les plaies diabétiques. En exploitant les propriétés biologiques complémentaires du chitosane et de l'extrait de sangsue médicinale, cet hydrogel innovant représente une avancée significative pour surmonter les limites des traitements conventionnels et améliorer la qualité de vie des patients souffrant de complications diabétiques chroniques.

---

# *Références bibliographiques*

---

---

## Referenecs

1. Abnave, P., et al. (2014). Leech-derived molecules and their role in tissue regeneration and immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(2), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.001>
2. Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões, M. (2021). Biofilms in diabetic foot ulcers: Impact, risk factors and control strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8278. <https://doi.org/10.3390/ijms22158278>
3. Ahmed, S., et al. (2021). Chitosan-based biomaterials for wound healing and tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.083>
4. Alemu, D., & Mondal, A. K. (2023). Study on the physicochemical properties of chitosan and their applications in the biomedical sector. *International Journal of Polymer Science*, 2023, Article 5025341. <https://doi.org/10.1155/2023/5025341>
5. Ali, S. K., & Wunu, A. G. (2025). The most commonly known and the identified potential bioactive molecules of leech saliva, their putative medical use, current status and future potential implications in medicine: A review [Preprint]. *Preprints.org*. <https://doi.org/10.20944/preprints202504.1943.v1>
6. Al-Zahrani, S.S., Bora, R.S., & Al-Garni, S.M. (2021). Antimicrobial activity of chitosan nanoparticles. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1874–1880. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2027816>
7. Amani, L., Motamed, N., Mirabzadeh Ardakani, M., Dehghan Shasaltaneh, M., Malek, M., Shamsa, F., Fatemi, E., & Amin, M. (2021). Semi-solid product of medicinal leech enhances wound healing in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(4), e113910. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.113910>
8. Andrews, R. C., & Walker, B. R. (2021). Glucocorticoids and insulin resistance: Old hormones, new targets. *Clinical Science*, 135(4), 425–443. <https://doi.org/10.1042/CS20201372>
9. Anushree, M., et al. (2023). Angiogenic potential of chitosan in wound healing via VEGF and TGF- $\beta$  pathways. *Carbohydrate Polymers*, 304, 120480. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120480>
10. Ardean, C., Davidescu, C. M., Nemeş, N. S., Negrea, A., Ciopec, M., Duteanu, N., Negrea, P., Duda-Seiman, D., & Musta, V. (2021). Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7449. <https://doi.org/10.3390/ijms22147449>
11. Armstrong, R. A., Cook, T. M., Kane, A. D., Kursumovic, E., Nolan, J. P., Oglesby, F. C., Cortes, L., Taylor, C., Moppett, I. K., & Soar, J. (2023). Peri-operative cardiac arrest: Management and outcomes of patients analysed in the 7th National Audit Project of the Royal College of Anaesthetists. *Anaesthesia*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/anae.16157>
12. Ayswarya, V., Saranya, P., Madhumayadevi, P., Swetha, S., & Kaveri, K. (2025). Leech therapy (hirudotherapy): A comprehensive systematic review of pharmacological constituents, mechanisms of action, therapeutic applications, and safety. *International*

- 
- Journal of Research and Innovation in Applied Science, 10(12).  
<https://doi.org/10.51584/IJRIAS.2025.10120030>
13. Bektas, N., Şenel, B., Yenilmez, E., Özatik, O., & Arslan, R. (2020). Evaluation of wound healing effect of chitosan-based gel formulation containing vitexin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.11.008>
  14. Ben Amor, I. (2024). Synthesis and characterization of metal nanoparticles by chitosan [Doctoral dissertation, University of El Oued].
  15. Ben Amor, I., Hemmami, H., Laouini, S. E., Abdelaziz, A. G., & Barhoum, A. (2023). Influence of chitosan source and degree of deacetylation on antibacterial activity and adsorption of AZO dye from water. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03741-9>
  16. Ben Moussa, O. (2021). Formulation and evaluation of a polyherbal solution and green synthesis of ZnNPS against metabolic disorder associated with experimental diabetes in rats [Unpublished thesis]. Echahid Hamma Lakhdar University of El-Oued.
  17. Ben Seghir, B., & Benhamza, M. (2017). Preparation, optimization and characterization of chitosan polymer from shrimp shells. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 1137–1147. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9488-5>
  18. Ben Slima, S., Ktari, N., Chouikhi, A., Hzami, A., Bardaa, S., Trabelsi, I., Ben Salah, B., & Ben Salah, R. (2022). Extraction, characterization, and structure of a novel heteropolysaccharide from *Lepidium sativum* and its effects on wound healing in diabetic rats. *BioMed Research International*, 2022, 7858865. <https://doi.org/10.1155/2022/7858865>
  19. Bielska, B., & Miłowska, K. (2025). Therapeutic potential of chitosan-based and related nanocomposite systems in wound management: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(23), 11748. <https://doi.org/10.3390/ijms262311748>
  20. Bilal, H. S., & Ahmed, S. T. (2023). Comparative ultrastructural study of the salivary glands of two hematophagous leeches (Annelida, Clitellata, Arhynchobdellida) in Iraq. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum*, 17(3), 409–421. <https://doi.org/10.26842/binhm.7.2023.17.3.0409>
  21. Bilden, A., Sabancılar, İ., Azarkan, S. Y., Karadağlı, K., Kaya, S., Kahraman, M., & Çiçek, M. (2025). Investigating the therapeutic potential of crude leech saliva based on its anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory effects. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(5), 328. <https://doi.org/10.3390/cimb47050328>
  22. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
  23. Bonev, B., Hooper, J., & Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295–1301. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>
  24. Boukertouta, S., & Hadeif, S. (2014). Evaluation des paramètres du stress oxydant chez les diabétiques insulino-dépendants [Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 Guelma].
  25. Boutennoun, H., Boussouf, L., Rawashdeh, A., Al-Qaoud, K., Abdelhafez, S., & Kebieche, M. (2017). In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic

- 
- components of Algerian *Achillea odorata* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.054>
26. Boutraa, D. T., Doudi, R., & Leghdemsi, D. (2024). Multifunctional prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) leaf extract cream: A natural remedy for burns, anti-inflammatory action, and UV protection [Master's thesis, University of El Oued]. <https://archives.univ-eloued.dz/items/1b29e719-1963-490e-8069-49caa361e6fc>
27. Bozkir, C. (2022). Understanding diabetes: Causes, symptoms, and treatment. *Journal of Advances in Medical Research*, 5(2), 1–2. <https://doi.org/10.12715/2564-8942.22.02.007>
28. Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1219–1222. <https://doi.org/10.1172/JCI32169>
29. Cao, Y., Yan, R., Sun, M., Guo, J., & Zhang, S. (2025). Effects of exogenous chitosan concentrations on photosynthesis and functional physiological traits of hibiscus under salt stress. *BMC Plant Biology*, 25, 419. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06424-x>
30. Carreras, M. (2004). Etat pro/antioxydant en relation avec le métabolisme lipidique dans les plaquettes sanguines lors du diabète [Mémoire du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études].
31. Che, X., Zhao, T., Hu, J., Yang, K., Ma, N., Li, A., Sun, Q., Ding, C., & Ding, Q. (2024). Application of chitosan-based hydrogel in promoting wound healing: A review. *Polymers*, 16(3), 344. <https://doi.org/10.3390/polym16030344>
32. Che, Y., et al. (2024). Chitosan-based hydrogels for wound healing applications: Recent advances and therapeutic perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 270, 132436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132436>
33. Chen, L., et al. (2021). Inflammation and metabolic regulation during diabetic wound healing. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 689407. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.689407>
34. Cheng, F., et al. (2021). Wound contraction and tissue repair in diabetes: Role of fibroblasts and angiogenesis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 650598. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650598>
35. Dai, T., Tanaka, M., Huang, Y.-Y., & Hamblin, M. R. (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(7), 857–879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>
36. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan — A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
37. Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D. G., & Deng, W. (2021). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 8852759. <https://doi.org/10.1155/2021/8852759>
38. Derbal, N., & Fedali, H. (2015). Mémoire de Master en toxicologie et santé [Mémoire de Master II, Université des Frères Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Animale].
39. Dharmadeva, S., Galgamuwa, L. S., Prasadine, C., & Kumarasinghe, N. (2018). In vitro antioxidant and antibacterial activity of *Hopea cordifolia* (Dipterocarpaceae) bark

- 
- extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2268-3>
40. Dhatariya, K., et al. (2020). Management of hyperglycemia and glucocorticoid-associated metabolic changes. *Diabetic Medicine*, 37(8), 1255–1264. <https://doi.org/10.1111/dme.14319>
41. Dinh, L., Hwang, S.-J., & Yan, B. (2025). Hydrogel conjugation: Engineering of hydrogels for drug delivery. *Pharmaceutics*, 17(7), 897. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17070897>
42. El-Shishtawy, R. M., Al Angari, Y. M., Alotaibi, M. M., & Almulaiky, Y. Q. (2023). Acrylic fabric and nanomaterials to enhance  $\alpha$ -amylase-based biocatalytic immobilized systems for industrial food applications. *Journal of King Saud University - Science*, 35(4), 102636.
43. Feng, P., Luo, Y., Ke, C., Qiu, H., Wang, W., Zhu, Y., Hou, R., Xu, L., & Wu, S. (2021). Chitosan-based functional materials for skin wound repair: Mechanisms and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 650598. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650598>
44. Fikru, A., Makonnen, E., Eguale, T., Debella, A., & Mekonnen, G. A. (2012). Evaluation of in vivo wound healing activity of methanol extract of *Achyranthes aspera* L. in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 9(1), 97–102. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i1.14>
45. Galkowska, H., Wojewodzka, U., & Olszewski, W. L. (2006). Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 14(5), 558–565. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x>
46. Gokarneshan, N. (2017). Role of chitosan in wound healing: A review of the recent advances. *Global Journal of Addiction & Rehabilitation Medicine*, 4(3), 61–64. <https://doi.org/10.19080/GJARM.2017.04.555637>
47. Gong, F., Zhang, Y., Cheng, S., Zhou, X., Zhang, H., Gao, J., Li, X., Ma, G., Wu, J., Zhang, B., Xia, K., & Zhao, F. (2022). Inhibition of TGF $\beta$ 1/Smad pathway by NF- $\kappa$ B induces inflammation leading to poor wound healing in high glucose. *Cells & Development*, 172, 203814. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2022.203814>
48. González-Martínez, J. R., Magallanes-Vallejo, A. G., López-Oyama, A. B., Madera-Santana, T. J., Anaya-Garza, K., & Rodríguez-González, E. (2023). Improved mechanical, optical, and electrical properties of chitosan films with the synergistic reinforcing effect of carbon nanotubes and reduced graphene oxide for potential optoelectronic applications.
49. Gowtham, K., Padmavathi, S., Manimekalai, K., Priyadharshini, R., & Archana, V. (2025). Diabetic wounds: Pathophysiology, complications and advances from conventional to modern therapies. *International Journal of Science and Research Archive*, 17(2), 097–111. <https://doi.org/10.30574/ijrsra.2025.17.2.2927>
50. Gupta, G., Vishwakarma, L. K. K., & Dangi, Y. S. (2025). Hydrogels: A comprehensive review of structure, properties, and multifaceted applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 15(9), 194–200. <https://doi.org/10.22270/jddt.v15i9.7365>

- 
51. Habeeb, B. K., & Al-Warid, H. S. (2025). Biochemical analysis of the saliva extracted from two different leech species. *Iraqi Journal of Science*, 66(7), 2728–2740. <https://doi.org/10.24996/ij.s.2025.66.7.8>
52. Han, C., Singla, R. K., & Wang, C. (2025). Application of biomaterials in diabetic wound healing: The recent advances and pathological aspects. *Pharmaceutics*, 17(10), 1295. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17101295>
53. Hassiba, L. (2014). Extraction et caractérisation du  $\beta$ -chitosane à partir des plumes de calamar : optimisation par la méthode des surfaces de réponses [Thèse de doctorat, Faculté de Technologie, Université Saad Dahleb Blida].
54. He, T., et al. (2018). An in vitro model of angiogenesis during wound healing provides insights into the complex role of cells and factors in the inflammatory and proliferative phase. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2913. <https://doi.org/10.3390/ijms19102913>
55. Hemmami, H., Ben Amor, I., Zeghoud, S., Ben Amor, A., Laouini, S. E., Alsalme, A., Cornu, D., Bechelany, M., & Barhoum, A. (2024). Chitosan extraction from *Amanita phalloides*: Yield, crystallinity, degree of deacetylation, azo dye removal and antibacterial properties. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1353524. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1353524>
56. Heo, C. Y. (2025). Cellular and molecular mechanisms of wound repair: From biology to therapeutic innovation. *Cells*, 14(23), 1850. <https://doi.org/10.3390/cells14231850>
57. Hidayathulla, S., Chua, L. S., & Chandrashekar, K. R. (2014). Phytochemical evaluation, antioxidant and antibacterial activity of *Hopea ponga* (Dennst.) Mabberly extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(11), 326–330.
58. Hu, X., et al. (2025). Hydrogel-based systems targeting inflammatory pathways and glucose metabolism in diabetic wound repair. *Carbohydrate Polymers*, 356, 123901. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123901>
59. Intaraprasit, S., Faikrua, A., Sittichokechaiwut, A., & Viyoch, J. (2012). Efficacy evaluation of the fibroblast-seeded collagen/chitosan scaffold on application in skin tissue engineering. *ScienceAsia*, 38(3), 268–277. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.268>
60. Januel, C. (2003). Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète [Thèse de doctorat, Université Lyon I / INSA-Lyon].
61. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. T. S., Nair, S. V., & Tamura, H. (2011). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials — A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
62. Joint Wound Management Formulary Group. (2016). Wound management formulary (4th ed.). NHS Calderdale CCG et al. <https://www.swyapc.org/wound-management-formulary/>
63. Kandile, N. G., Mohamed, M. I., Mohamed, H. M., & Ahmed, M. E. S. (2024). Therapeutic applications of sustainable new chitosan derivatives and its nanocomposites: Fabrication and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254(Part 2), 127855. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127855>

- 
64. Kamath, M. (2020). Role of leech therapy in wound healing: A short review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(10), 5040–5041. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00882.3>
65. Karimlar, S., Ghasemi Pirbalouti, A., Teymuori, Z., Moslehishad, M., & Hamidi-Esfahani, Z. (2026). Applications of chitosan, an eco-friendly biopolymer in agricultural systems, herbal products, and functional foods: A review. *Food Science & Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/fsn3.71367>
66. Khaouani, F., & Kherbeche, A. (2024). Characterisation of chitosan extracted enzymatically from shrimp shell waste, and study of its antioxidant power. *African Journal of Biological Sciences*, 6(10), 510–519. <https://doi.org/10.33472/AFJBS.6.10.2024.510-519>
67. Kiehlbauch, J. A., Hannett, G. E., Salfinger, M., Archinal, W., Monserrat, C., & Carlyn, C. (2000). Use of the Oxoid Aura image system for reading disc diffusion susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3341–3348. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3341-3348.2000>
68. Kim, H.-S., Hwang, H.-J., Kim, H.-J., Choi, Y., Lee, D., Jung, H.-H., & Do, S. H. (2022). Effect of decellularized extracellular matrix bioscaffolds derived from fibroblasts on skin wound healing and remodeling. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 865545. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.865545>
69. Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A. A. A., & Dudhipala, N. (2022). Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: Trajectory and recent advancements. *Cells*, 11(15), 2439. <https://doi.org/10.3390/cells11152439>
70. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., & Thöming, J. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8, 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
71. Laib, I. (2023). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles based on *Helianthemum lippii* L. extract and evaluation of their biological activities [Doctoral dissertation, University of El Oued].
72. Lang, X., Li, L., Li, Y., & Feng, X. (2024). Effect of diabetes on wound healing: A bibliometrics and visual analysis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S45341>
73. Lang, Y., et al. (2020). Chitosan improves insulin sensitivity and glucose metabolism through modulation of IRS-1 signaling pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.148>
74. Le Reun, M. (2023). Hirudothérapie par *Hirudo medicinalis* : applications en traumatologie et chirurgie réparatrice [Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Rennes]. DUMAS. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-05280438v1>
75. Li, Z., et al. (2024). Controlled release behavior and therapeutic efficiency of chitosan hydrogels in tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 337, 122241. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122241>
76. Li, Z., et al. (2025). Chitosan-based hydrogels for diabetic wound healing and anti-inflammatory regulation. *Carbohydrate Polymers*, 360, 121234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.121234>

77. Liu, H., Wang, C., Li, C., Qin, Y., Wang, Z., Yang, F., Li, Z., & Wang, J. (2018). A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Advances*, 8(13), 7533–7549. <https://doi.org/10.1039/C7RA13510F>
78. Liu, J., Zhang, R., Xu, Z. J., & Dong, Y. (2015). Hirudin and calin from leech saliva improve microcirculation and inhibit thrombosis in diabetic wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.038>
79. Liu, Z., Xiang, H., Xian, K., Cai, L., Yin, D., & Zhong, J. (2026). How transformative are ROS responsive hydrogel nanoformulations to treat refractory infected wounds. *International Journal of Nanomedicine*, 21, 576258. <https://doi.org/10.2147/IJN.S576258>
80. Madubunyi, I. I., Obi, O. J., & Adeniran, S. A. (2012). Evaluation of the antioxidant and antibacterial activities of the leaf extract of *Newbouldia laevis* (P. Beauv.) Seemann. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(11), 2212–2216. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1694>
81. Madubunyi, I., Onoja, S. A., & Isaac. (2012). In vitro antioxidant and in vivo antidiabetic potential of the methanol extract of *Ficus glumosa* Del (Moraceae) stem bark in alloxan induced diabetic mice. *Comparative Clinical Pathology*, 21(4), 389. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1129-2>
82. Maiz-Fernández, S., Pérez-Álvarez, L., Silván, U., Vilas-Vilela, J. L., & Lanceros-Méndez, S. (2022). pH-induced 3D printable chitosan hydrogels for soft actuation. *Polymers*, 14(3), 650. <https://doi.org/10.3390/polym14030650>
83. Majdoub, O., Hamdaoui, N., Albishri, S., Boudaya, M., Kallel, C., Jamoussi, K., Aouadi, K., De Vita, D., El Feki, A., Kadri, A., & Saoudi, M. (2025). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, anti-hemolytic, and enzyme inhibitory activities of polysaccharide derived from *Opuntia stricta* pulp and its effects on wound healing in diabetic rats. *Waste and Biomass Valorization*, 16, 6697–6714. <https://doi.org/10.1007/s12649-025-03006-8>
84. Malhotra, H., & Gautam, R. K. (2024). Biomedical applications of chitosan and its derivatives. In Annu (Ed.), *Biopolymers for biomedical applications* (pp. 25–51). Wiley-Scrivener. <https://doi.org/10.1002/9781119865452.ch2>
85. Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89(3), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.051>
86. Marquez-Gil, A., et al. (2023). Medical leech therapy for hematoma treatment. *Cureus*, 15(8), e43338. <https://doi.org/10.7759/cureus.43338>
87. Mawazi, S. M., et al. (2024). Chitosan-based hydrogels for wound healing applications: Recent advances and therapeutic perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 270, 132436.
88. Mayilvaganan, M., Deepa, R., & Nandakumar, P. (2016). A study on data mining and statistical methods used in diabetes mellitus diagnosis. *International Journal of Advanced Research*, 4(7), 447–452. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/908>
89. Miguel, S. P., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 460–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072>

90. Mohan, K., Ganesan, A. R., Muralisankar, T., Jayakumar, R., Sathishkumar, P., Uthayakumar, V., Provvidenti, V., & Revathi, N. (2020). Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.016>
91. Na, H. J. (2003). The effects of live leech (*Hirudo medicinalis*) therapy on diabetic foot: A clinical case report. *Korean Journal of Oriental Medicine*, 24, 136–138.
92. Nair, P. A., et al. (2022). Medicinal leech therapy and its role in tissue repair and wound healing. *Journal of Integrative Medicine*, 20(4), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2022.04.004>
93. Nordin, A. S., Sulaiman, W. M. A. W., Basri, N. A. O., Isa, J. M., & Anthony, N. A. B. (2025). Investigating the antibacterial properties of leech saliva: Starvation and dose-dependent effect of crude leech saliva extraction (CLSE) on bacterial strains. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 993–1005.
94. Okonkwo, U. A., Chen, L., Ma, D., Haywood, V. A., Barakat, M., Urao, N., & DiPietro, L. A. (2020). Compromised angiogenesis and vascular integrity in impaired diabetic wound healing. *PLoS ONE*, 15(4), e0231962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231962>
95. Olafadehan, O. A., Amoo, K. O., Ajayi, T. O., & Bello, V. E. (2021). Extraction and characterization of chitin and chitosan from *Callinectes amnicola* and *Penaeus notialis* shell wastes. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science*, 12(1), 1–30. <https://doi.org/10.5897/JCEMS2020.0395>
96. Orsted, H. L., Keast, D., Forest-Lalande, L., & Megie, M. F. (2011). Basic principles of wound healing. *Wound Care Canada*, 9(2), 4–12.
97. Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., & Unakalamba, C. B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46–57. <https://doi.org/10.5897/JPAP2013.0001>
98. Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C., & Nozaki, J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.032>
99. Peng, L., Pan, X., & Yin, G. (2015). Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF-κB pathway. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/>
100. Perry, R. J., Camporez, J. P. G., Kursawe, R., Titchenell, P. M., Zhang, D., Perry, C. J., Jurczak, M. J., Abudukadier, A., Han, M. S., Zhang, X. M., Ruan, H. B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S. M., Sul, H. S., Birnbaum, M. J., Davis, R. J., Cline, G. W., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2015). Hepatic acetyl-CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*, 160(4), 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012>
101. Peipei, S., Liang, G., Fang, W., & Chen, X. (2021). Impaired fibroblast activity and tissue reconstruction in diabetic wounds: Role of oxidative stress and microvascular dysfunction. *Frontiers in Physiology*, 12, 643757. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.643757>

- 
102. Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
103. Piekarska, K., Sikora, M., Owczarek, M., Jóźwik-Pruska, J., & Wiśniewska-Wrona, M. (2023). Chitin and chitosan as polymers of the future — Obtaining, modification, life cycle assessment and main directions of application. *Polymers*, 15(4), 793. <https://doi.org/10.3390/polym15040793>
104. Prat, S. (2013). *Hirudo medicinalis : intérêts pharmaceutiques de l'Antiquité à nos jours* [Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Limoges]. Aurore. <https://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/unilim-ori-41853>
105. Qi, L., et al. (2021). ROS scavenging and anti-inflammatory properties of chitosan in tissue repair. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1392–1402. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.064>
106. Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
107. Raghavi, S., Deva Darshini, B., Saravanan, K. M., & Anbarasu, K. (2026). Molecular insights into leech-derived bioactive compounds: Biochemical mechanisms and therapeutic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 27, 2112. <https://doi.org/10.3390/ijms27052112>
108. Rajalakshmi, A., Krithiga, N., & Jayachitra, A. (2013). Antioxidant activity of the chitosan extracted from shrimp exoskeleton. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 16(10), 1446–1451. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.16.10.12033>
109. Rodríguez-Rodríguez, N., Martínez-Jiménez, I., García-Ojalvo, A., Mendoza-Mari, Y., Guillén-Nieto, G., Armstrong, D. G., & Berlanga-Acosta, J. (2021). Wound chronicity, impaired immunity and infection in diabetic patients. *MEDICC Review*, 23(3). <https://doi.org/10.37757/MR2021.V23.N3.8>
110. Rossary, M. D., Djunaedi, J. K. P., Riyantoro, T. P., & Setiawati, A. (2025). Tailoring strategy of chitosan-based hydrogel for improving wound healing: A systematic review. *Thailand Institute of Scientific and Technological Research*, 2025, 11023. <https://doi.org/10.48048/tis.2025.11023>
111. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
112. Shakouri, A., & Wollina, U. (2021). Medicinal leech therapy in modern medicine. *Dermatologic Therapy*, 34(1), e14613. <https://doi.org/10.1111/dth.14613>
113. Shakouri, A., & Wollina, U. (2021). Time to change theory; medical leech from a molecular medicine perspective: Leech salivary proteins playing a potential role in medicine. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 11(2), 261–266. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.038>
114. Shi, Z., Yao, C., Shui, Y., Li, S., & Yan, H. (2023). Research progress on the mechanism of angiogenesis in wound repair and regeneration. *Frontiers in Physiology*, 14, 1284981. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1284981>

115. Siddique, Y. H., Ara, G., & Afzal, M. (2012). Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose-Response*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.2203/dose-response.10-002.Siddique>
116. Siddiqui, A. A., Siddiqui, S. A., Ahmad, S., Siddiqui, S., Ahsan, I., & Sahu, K. (2013). Diabetes: Mechanism, pathophysiology and management — A review. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(2), 1–23.
117. Sig, A. K., Guney, M., Uskudar Guclu, A., & Ozmen, E. (2017). Medicinal leech therapy — An overall perspective. *Integrative Medicine Research*, 6(4), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.001>
118. Son, Y. J., Hwang, I. K., Nho, C. W., Kim, S. M., & Kim, S. H. (2021). Determination of carbohydrate composition in mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae and characterization of mealworm chitin and chitosan. *Foods*, 10(3), 640. <https://doi.org/10.3390/foods10030640>
119. Southon, S., Gee, J. M., & Johnson, I. (1984). Hexose transport and mucosal morphology in the small intestine of the zinc-deficient rat. *British Journal of Nutrition*, 52(2), 371–380.
120. Spitalnik, P. F. (n.d.). Tissue repair: Regeneration, healing and fibrosis: Wound healing [Lecture slides]. Columbia University.
121. Subramanian, S., Murugesan, S., & Arunachalam, K. D. (2023). Chitosan-based hydrogel dressings for diabetic wound healing: Recent advances and therapeutic perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123539. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123539>
122. Tatarusanu, S. M., Sava, A., Profire, B. S., Pinteala, T., Jitareanu, A., Iacob, A. T., Lupascu, F., Simionescu, N., Rosca, I., & Profire, L. (2023). New smart bioactive and biomimetic chitosan-based hydrogels for wound care management. *Pharmaceutics*, 15(3), 975. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030975>
123. Tegegne, K. D., Gebeyehu, N. A., Yirdaw, L. T., Yitayew, Y. A., & Kassaw, M. W. (2024). Determinants of poor glycemic control among type 2 diabetes mellitus patients in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, 12, 1256024. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1256024>
124. Tzeng, Y. M., et al. (2022). Effects of chitosan on lipid metabolism and insulin sensitivity: Mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 20(8), 506. <https://doi.org/10.3390/md20080506>
125. Ünal, K., Erol, M. E., & Ayhan, H. (2023). Literature review on the effectiveness of medicinal leech therapy in the wound healing. *Ankara Medical Journal*, 23(1), 151–164. <https://doi.org/10.5505/amj.2023.20280>
126. Utevsky, S.Y. & Trontelj, P. (2005). A new species of the medicinal leech (*Oligochaeta*, *Hirudinida*, *Hirudo*) from Transcaucasia and an identification key for the genus *Hirudo*. *Parasitology Research*, 98(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0017-7>
127. Vijayaraghavan, J., & Crabtree, J. S. (n.d.). Diabetes. Louisiana State University Health Sciences Center.
128. Vilar Junior, J. C., Rubio Ribeaux, D., Alves da Silva, C. A., & De Campos-Takaki, G. M. (2016). Physicochemical and antibacterial properties of chitosan extracted from

- 
- waste shrimp shells. *International Journal of Microbiology*, 2016, 5127515.  
<https://doi.org/10.1155/2016/512751>
129. Wang, C.-H., Cherng, J.-H., Liu, C.-C., Fang, T.-J., Hong, Z.-J., Chang, S.-J., Fan, G.-Y., & Hsu, S.-D. (2021). Procoagulant and antimicrobial effects of chitosan in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7067.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22137067>
130. Wang, Y., et al. (2021). Chitosan and intestinal permeability modulation: Implications for nutrient absorption. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8097.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22158097>
131. Waskiewicz, Z., Mukhambet, Z., Azarbayer, D., & Bondarev, S. (2025). Inflammatory responses to ultramarathon running: A systematic review of IL-6, CRP, and TNF- $\alpha$  kinetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 6317.  
<https://doi.org/10.3390/ijms26126317>
132. Whitaker, I. S., et al. (2014). Medicinal leech therapy in reconstructive surgery: Mechanisms and clinical applications. *Annals of Plastic Surgery*, 72(4), 407–414.  
<https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3182661c5a>
133. Witwit, L. J., Ali, L. O., & Abbas, A. M. (2024). A critical review of *Hirudo medicinalis* and historical aspects of leech therapy. *Medical Journal of Ahl al-Bayt University*, 3(1).
134. Wu, K., Yan, Z., Wu, Z., Li, J., Zhong, W., Ding, L., Zhong, T., & Jiang, T. (2024). Recent advances in the preparation, antibacterial mechanisms, and applications of chitosan. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(11), 318.  
<https://doi.org/10.3390/jfb15110318>
135. Yang, C., Chen, Y., Huang, H., Fan, S., Yang, C., Wang, L., Li, W., Niu, W., & Liao, J. (2021). ROS-eliminating carboxymethyl chitosan hydrogel to enhance burn wound-healing efficacy. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 679580.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.679580>
136. Yang, J., Chen, Y., Huang, H., Fan, S., Yang, L., Wang, L., Li, W., Niu, W., & Liao, J. (2021). A chitosan-based hydrogel alleviates oxidative stress and promotes diabetic wound healing. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 679580.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.679580>
137. Yang, J., et al. (2025). Anti-inflammatory cytokine modulation by hydrogel systems in diabetic wound healing. *Biomaterials Advances*, 176, 214221.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2025.214221>
138. Yang, X., et al. (2024). Advanced glycation end-products inhibition by chitosan in diabetic wound environments. *Biomaterials Research*, 28, 45.  
<https://doi.org/10.1186/s40824-024-00498-2>
139. Yao, J., et al. (2020). Chitosan promotes keratinocyte migration and fibroblast proliferation in wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115433.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115433>
140. Yore, M. M., Syed, I., Moraes-Vieira, P. M., Zhang, T., Herman, M. A., Hara, E., Xue, L., Chu, C. D., Kim, J., Chen, A., Saghatelian, A., McGraw, T. E., & Kahn, B. B. (2014). Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and

- 
- 
- anti-inflammatory effects. *Cell*, 159(2), 318–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.035>
141. Yue, Y., Xu, R., & Li, N. (2025). Integrating piezoelectric dressings with botanicals as emerging smart dressings for diabetic wound healing. *Nanoscale*, 17(35), 20044–20056.  
<https://doi.org/10.1039/d5nr01797a>
142. Zhan, R., Daniels, A., & Luu, K. (2026). Case report: Heparin coagulant super-sensitivity during leech therapy. *Thrombosis Journal*. Advance online publication.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/42069613/>
143. Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., & Hirano, S. (2000). Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99–105.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00077-2](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00077-2)
144. Zhang, S., Lei, X., Lv, Y., Wang, L., & Wang, L.-N. (2023). Recent advances of chitosan as a hemostatic material: Hemostatic mechanism, material design and prospective application. *Carbohydrate Polymers*, 327, 121673.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121673>
145. Zhang, T., Qin, X., Gao, Y., Kong, D., Jiang, Y., Cui, X., Guo, M., Chen, J., Chang, F., Zhang, M., Li, J., & Yin, P. (2023). Functional chitosan gel coating enhances antimicrobial properties and osteogenesis of titanium alloy under persistent chronic inflammation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1118487.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1118487>
146. Zosangpuii, & Sudheer, P. (2024). Chitosan a natural anti-inflammatory and wound healing agent: A brief update. *Natural Resources for Human Health*, 4(2), 115–127.  
<https://doi.org/10.53365/nrfhh/177602>

---

---

# Annexes

---

---

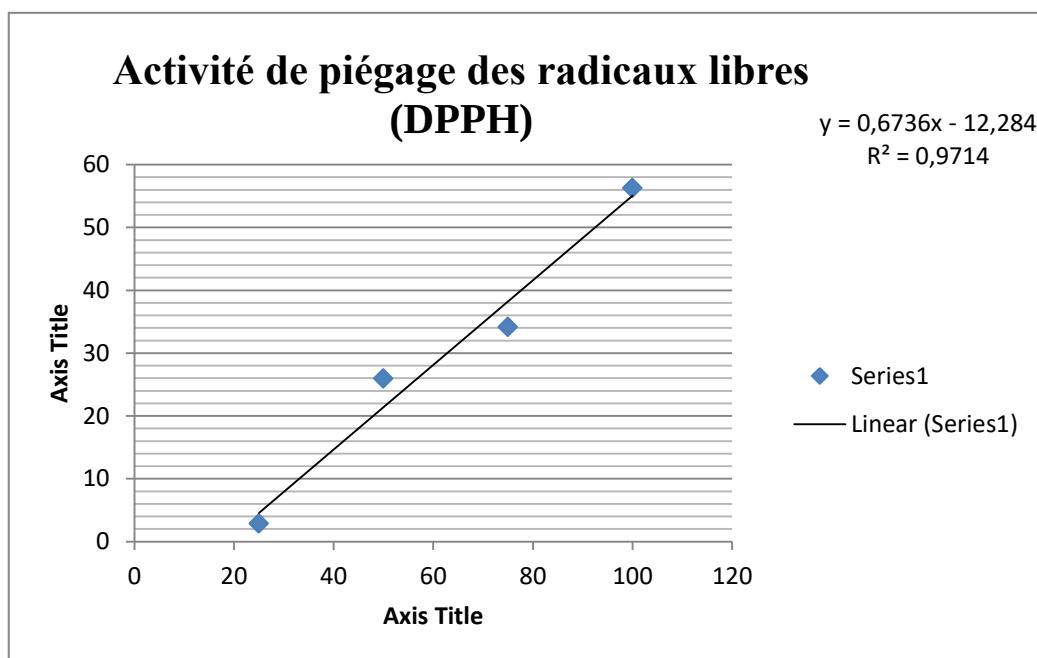


**Figure :** Résultats du test DPPH de l'extrait du Sangsues

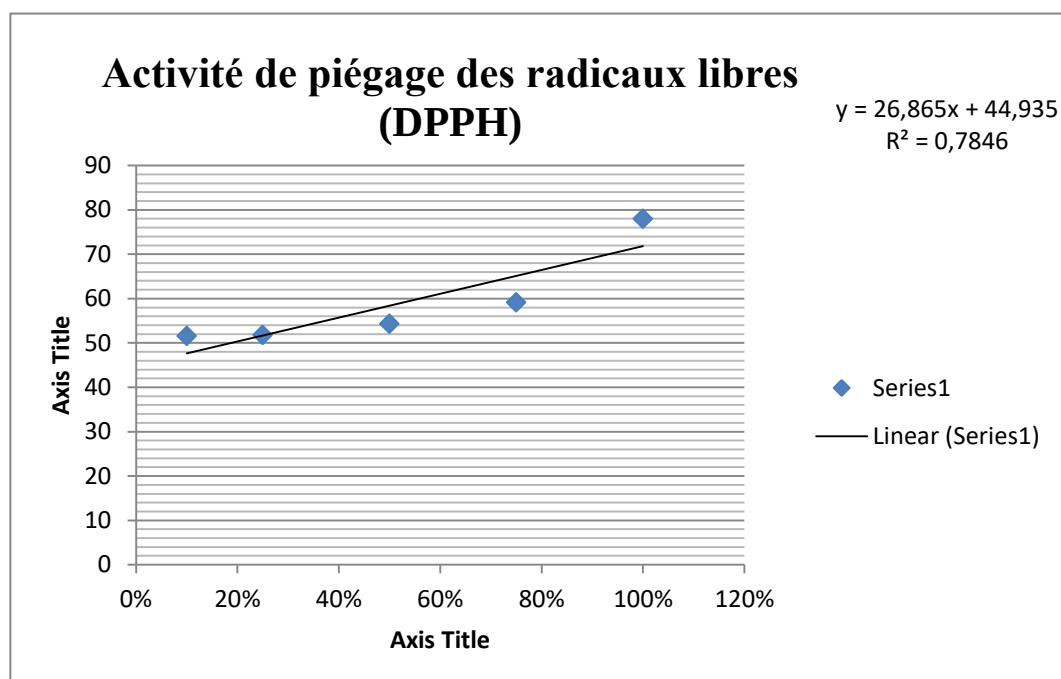


**Figure :** Résultats du test DPPH de l'extrait du chitosane

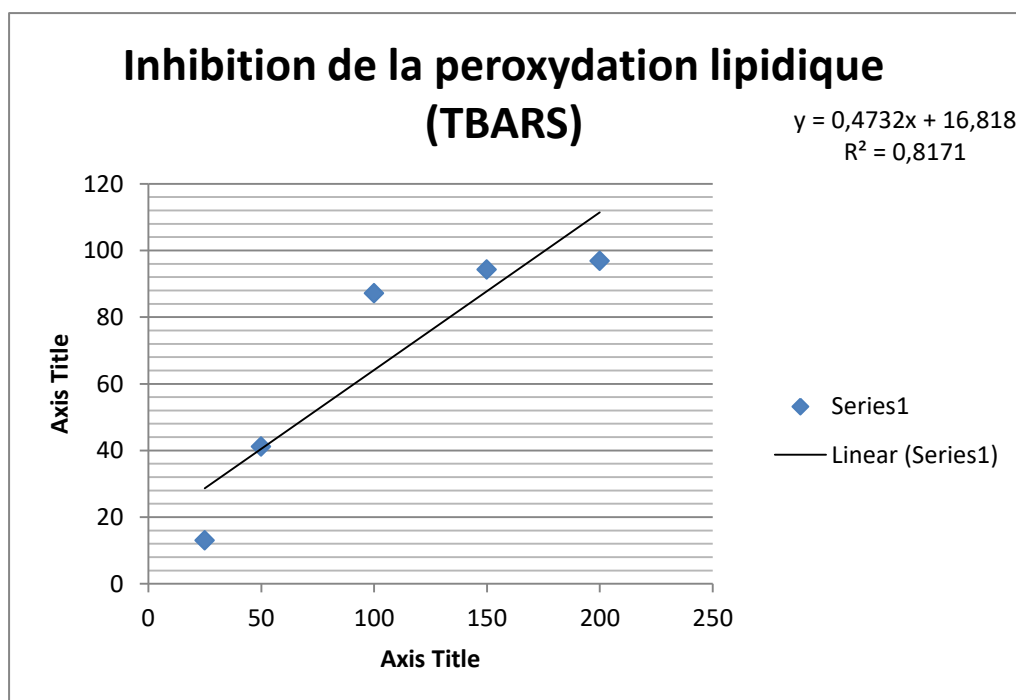


**Figure :** Résultats du test TBARS de l'extrait du Sangsues

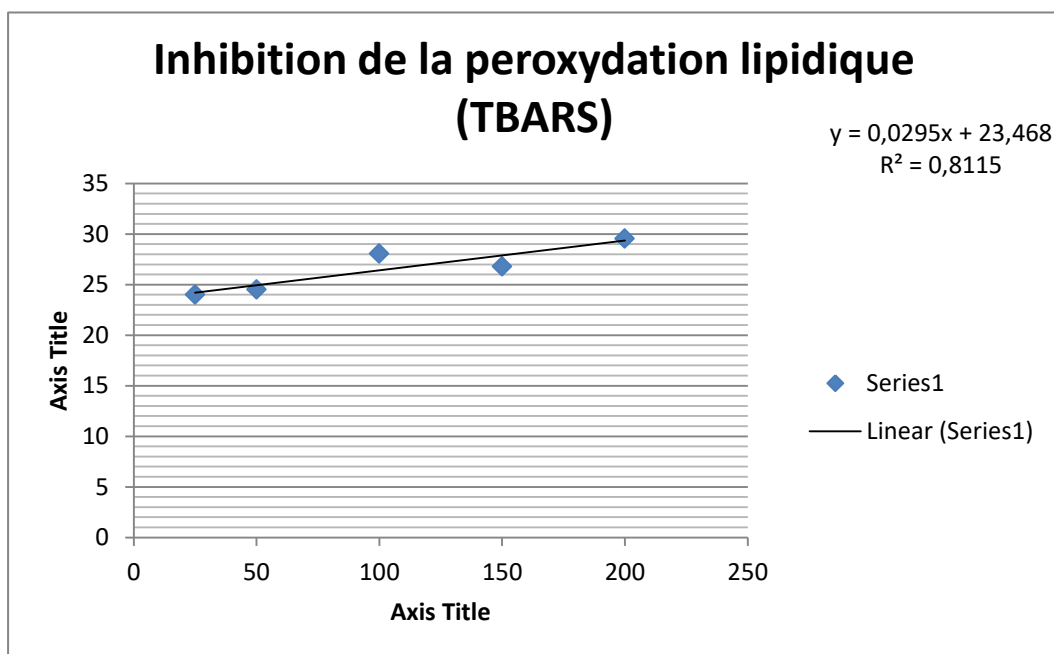


**Figure :** Résultats du test TBARS de l'extrait du chitosane

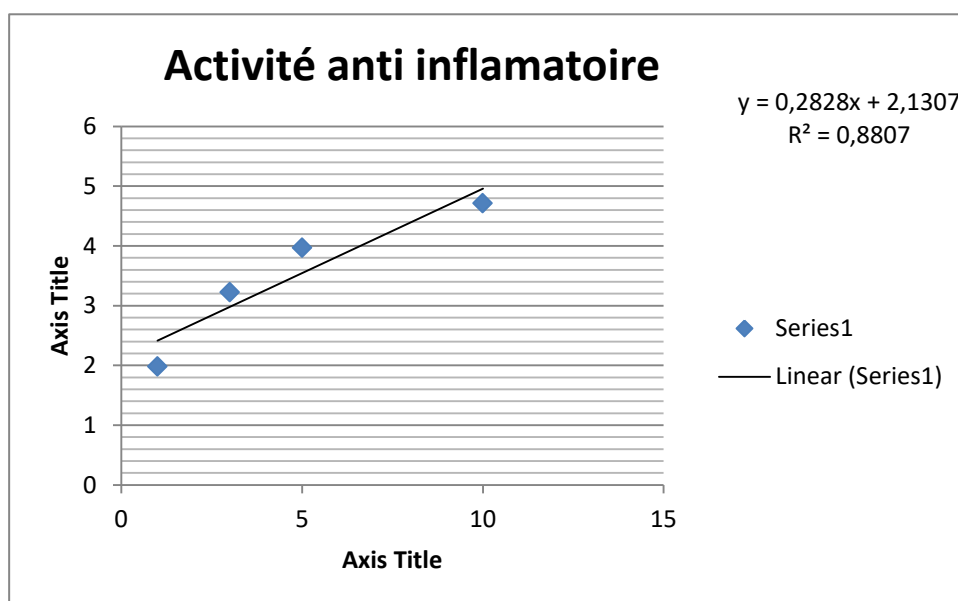


**Figure :** Résultats D'anti-inflammatoires de l'extrait du chitosane

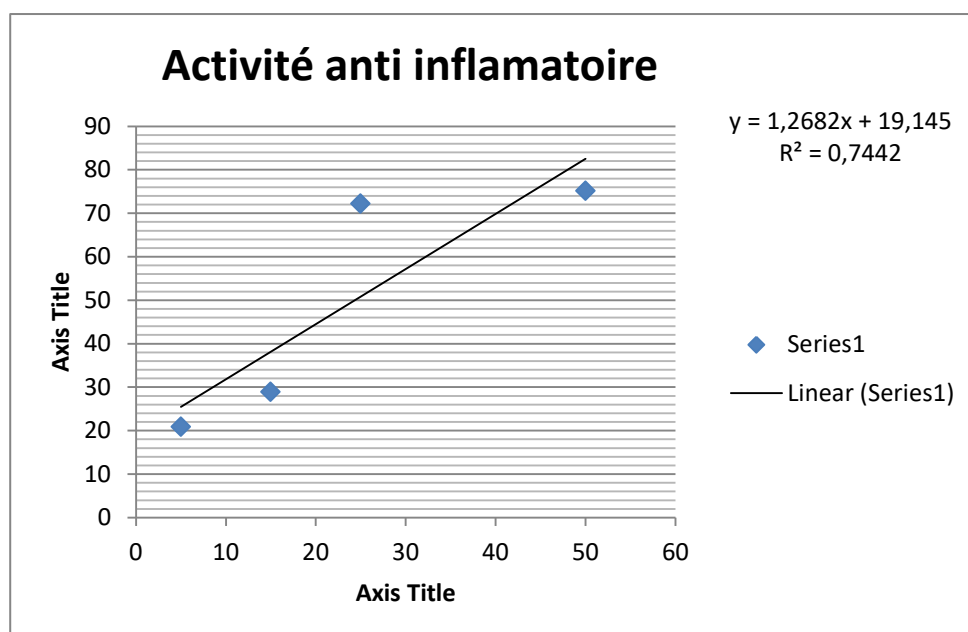


**Figure :** Résultats D'anti-inflammatoires de l'extrait du Sangsues

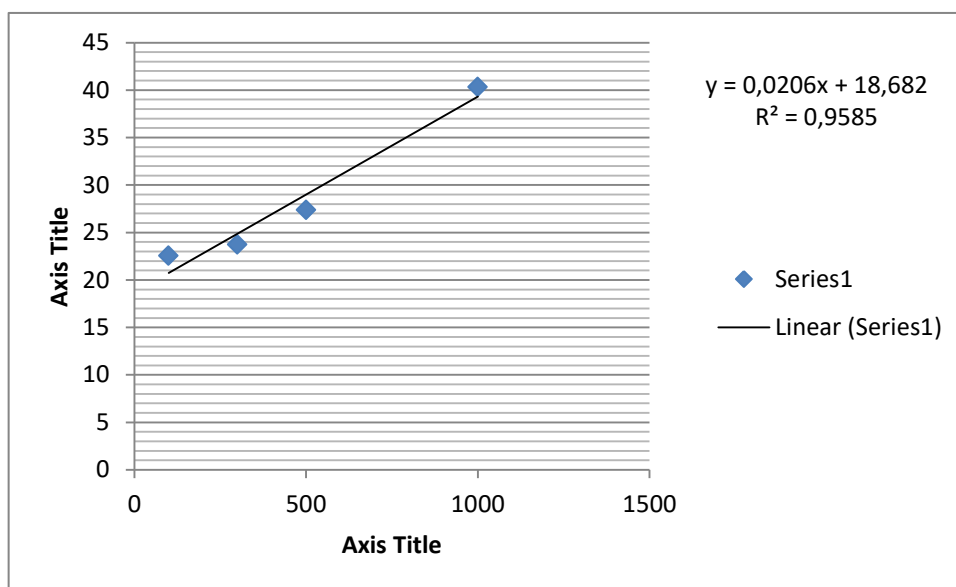


**Figure :** Resultat d'aspegique

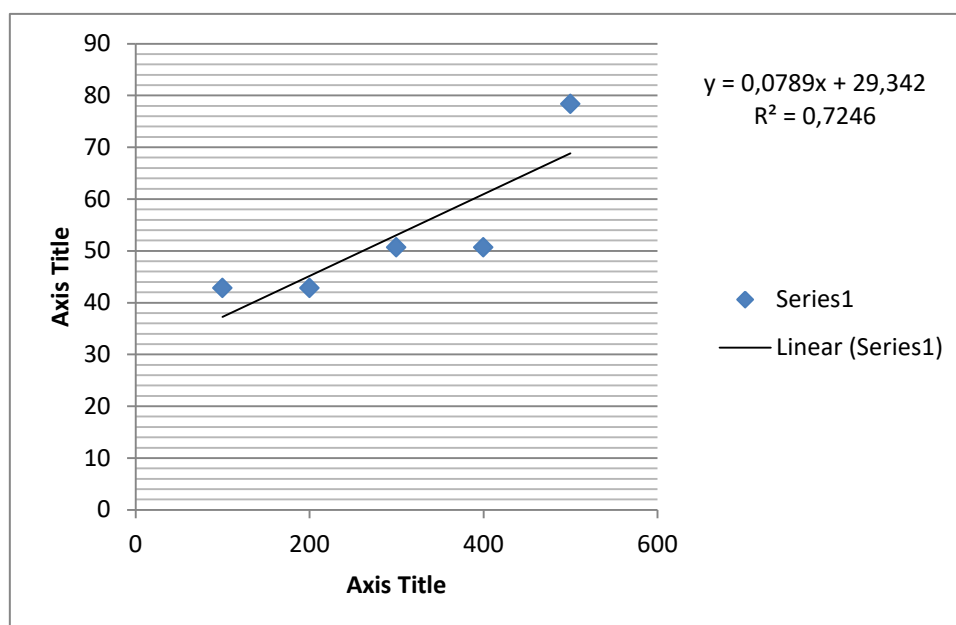


**Figure :** Resultat d'acid ascorbique

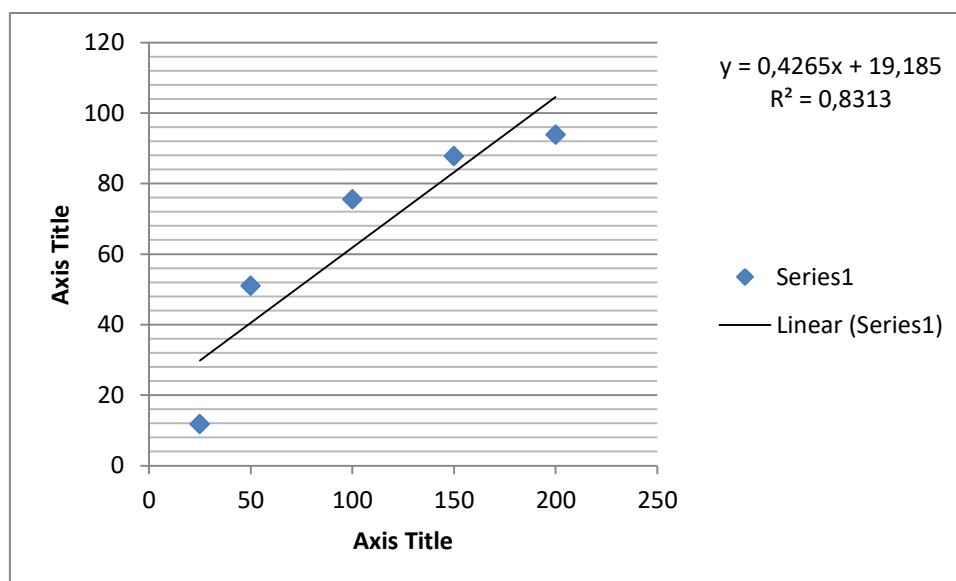


**Figure :** Standard MDA



**Fig.** Collecte du sang (Image originale).



**Fig.** Échantillons des tissus fixés au formaldéhyde tamponné à 10 %(Image originale).



**Fig.** Des échantillons ont été prélevés à la surface des plaies traitées à l'aide d'écouvillons stériles.



**Fig.** Les rats ont été euthanasiés sous anesthésie, et des échantillons biologiques ont été prélevés et analysés (Image originale).



**Fig.** Les sangsues après lyophilisation (image originale).



**Fig.**Étape de Déminéralisation (image originale).



**Fig.**Étape de Déprotéinisation (image originale).

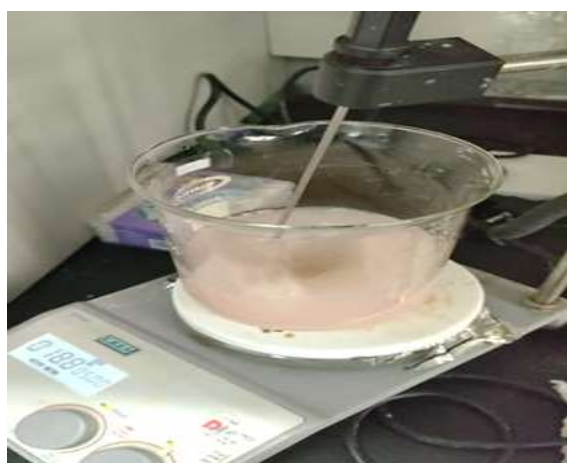


**Fig.**Étape de Décoloration (image originale).



**Fig.** Étape de Désacétylation (image originale).



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الشهيد حمه لخضر بالوادي

مركز تطوير المقاولاتية لجامعة الوادي



الكلية/المعهد : علوم الطبيعة والحياة

القسم: بيولوجيا

المستوى والتخصص : ثانية ماستر بيوكيمياء التطبيقية

إنتاج هيدروجيل علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان،  
موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

اللجنة الوطنية للتربية والعلوم

مقدمة في اطار الحصول على شهادة مؤسسة اقتصادية (مصغرة) في اطار القرار الوزاري 1275

المعدل والمتمم بالقرار الوزاري 008 المؤرخ في 23 فيفري 2025

**BINA Gel**



## الفهرس

أولاً: فريق العمل والإشراف

1- فريق العمل

2- فريق الإشراف

ثانياً: تعريف المشروع

1. تحديد النشاط

2. قطاع النشاط

3. رمز النشاط

ثالثاً: وصف فكرة المشروع

1. ما هي منتجاتي / خدماتي

2. من سيشتري منتجاتي / خدماتي

3. أين سيقام مشروعك وكيف ستصل منتجاتي / خدماتي للزبائن

4. كيف سيتشغل مشروعك

5. مبررات اختيار فكرة مشروعك

رابعاً: دراسة السوق

1. طبيعة وحجم المنافسة: من هم المنافسون المباشرون وغير المباشرين؟

2. حجم السوق المستهدف والمحتمل

3. تحليل SWOT: نقاط القوة والضعف والفرص والتهديدات لمشروعك

4. نموذج العمل التجاري BMC لمشروعك

خامساً: الدراسة التقنية

1. احتياجات المشروع من الموارد البشرية: (ما هي الاحتياجات من الموظفين؟)

2. موقع إقامة مشروعك ومبررات اختياره: أين سيكون موقع مشروعك؟

سادساً: تقدير تكاليف وإيرادات مشروعك

1 - تقدير تكاليف مشروعك

1.1 تقدير المبلغ الإجمالي للاستثمار في مشروعك

2.1 تقدير مشتريات مشروعك من المواد الأولية في مشروعك

3.1 تقدير تكاليف اليد العاملة في مشروعك

4.1 تقدير التكاليف المشتركة لمشروعك

5.1 تقدير تكاليف اهتلاك الاستثمارات لمشروعك

2- تقدير إيرادات مشروعك

1.2 تقدير حجم المبيعات السنوية لمشروعك

2.2 حساب النتيجة السنوية لمشروعك

إنتاج هيدروجين علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

أولاً: فريق العمل والإشراف

1-فريق العمل

| فريق المشروع              | التخصص              | الكلية/ المعهد       | الخبرة/ الكفاءة في مجال المشروع                                                                    |
|---------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| الطالبة: بن عون نور الهدى | بيوكيمياء التطبيقية | علوم الطبيعة والحياة | بيوكيمياء تطبيقية – استخراج وتنقية المواد الفعالة من المصادر الطبيعية وتحضير المستحضرات البيولوجية |
| الطالبة: لعبادي بدر       | بيوكيمياء التطبيقية | علوم الطبيعة والحياة | بيوكيمياء تطبيقية – استخراج وتنقية المواد الفعالة من المصادر الطبيعية وتحضير المستحضرات البيولوجية |
| الطالبة: حسان اية         | بيوكيمياء التطبيقية | علوم الطبيعة والحياة | بيوكيمياء تطبيقية – استخراج وتنقية المواد الفعالة من المصادر الطبيعية وتحضير المستحضرات البيولوجية |
| الطالبة: خلوط نور اليقين  | بيوكيمياء التطبيقية | علوم الطبيعة والحياة | بيوكيمياء تطبيقية – استخراج وتنقية المواد الفعالة من المصادر الطبيعية وتحضير المستحضرات البيولوجية |

2-فريق الإشراف

| المشرف                        | التخصص              | الكلية               |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|
| المشرف الرئيسي: العايب ابتسام | بيوكيمياء التطبيقية | علوم الطبيعة والحياة |

ثانياً: تعريف المشروع: يكون النشاط وفقاً للمدونات التي تحدد قائمة الأنشطة لكل هيئة تسجيل (المركز الوطني للسجل التجاري، الفلاحة، الصناعة التقليدية والحرف)؛

| تحديد النشاط                                                                     | قطاع النشاط                   | رمز النشاط (وفق مدونة الأنشطة للمركز الوطني للسجل التجاري CNRC) |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| صناعة كل المنتجات شبه الصيدلانية و مواد أخرى موجهة لتغليف المواد شبه الصيدلانية. | صناعة المنتجات شبه الصيدلانية | 105702                                                          |

❖ في حالة نشاط مقنن، أو نشاط يحتاج إلى اعتمادات أو تراخيص خاصة، يجب ذكرها وذكر الجهة المانحة لها النشاط 105702 غير مقنن وفق مدونة الأنشطة للمركز الوطني للسجل التجاري (CNRC)، ولا يستوجب الحصول على تراخيص أو اعتمادات خاصة مسبقاً.

ثالثاً: وصف فكرة المشروع:

ينبغي ان يكون صاحب / أصحاب المشروع على دراية بكل تفاصيل المشروع وقادرين على تقديم وصف ملخص ودقيق عنه ، من خلال الإجابة بدقة على العناصر التالية :

إنتاج هيدروجيل علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

### ما هي منتجاتي أو خدماتي: ( حدد بدقة منتجاتك. خدماتك):

**BINA Gel:** الحل الحيوي المبتكر لإعادة الأمل في علاج وإدارة جروح السكري المزمنة والعنيدة. بفضل تقنيته التآزرية الذكية، يقدم هذا الهيدروجيل مفعولاً علاجياً مزدوجاً ومكافئاً يعجل من وتيرة الشفاء والالتئام بشكل ملحوظ: فهو يعمل من جهة على تنشيط وترقية الدورة الدموية الموضعية، وضمان تدفق مثالي ومستمر للدم المحمل بالأكسجين والمغذيات الأساسية إلى عمق الأنسجة المتضررة. ومن جهة أخرى، يشكل الجل درعاً حيوياً واقياً ومضاداً للبكتيريا يمنع حدوث الالتهابات والعدوى الميكروبية، مما يوفر بيئة رطبة ومثالية تحفز الانقسام الخلوي والبناء السريع والأمن للأنسجة الجديدة.

### من سيشتري منتجاتي/ خدماتي (حدد زبائنك بدقة) :

مرضى السكري المصابون بجروح مزمنة أو قرح القدم السكرية،  
الصيدليات والمستشفيات والعيادات المتخصصة في أمراض السكري وجراحة الجروح،  
مراكز إعادة التأهيل وهيئات الصحة العمومية على المستوى الوطني.

### أين سيقام مشروعك وكيف تصل منتجاتي / خدماتي للزبائن: (بين مكان إقامة مشروعك و طرق التواصل مع زبائنك)

شارع 19 مارس 1962، مدينة الوادي محل ملكية خاصة لأحد المؤسسين، بالقرب من مخبر تحاليل الجودة Fati Lab

### طرق الوصول إلى الزبائن:

البيع المباشر للصيدليات والعيادات وأطباء السكري بولاية الوادي والولايات المجاورة  
التوصيل عبر شركات نقل محلية متعاقدة

التسويق عبر صفحات التواصل الاجتماعي (Facebook, Instagram)

المشاركة في الملتقيات العلمية الجامعية والمعارض الصحية

موقع إلكتروني للتعريف بالمنتج وقبول الطلبات

### كيف سيشغل مشروعك (بين من سيقوم بتشغيل المشروع ومن سيساهم في ذلك):

يُسيّر المشروع في شكل مؤسسة مصغرة إنتاجية تعتمد على العمل الجماعي والتنسيق بين أربع شركات مؤسسات حاملات شهادة ماستر بيوكيمياء تطبيقية، حيث تُساهم كل عضوة حسب مهاراتها التقنية في تطوير المشروع وضمان حسن سيره. وتتوزع المهام بطريقة منظمة وتكاملية تشمل: الإشراف والتنسيق العام للمشروع، وتطوير وتحضير التركيبة الحيوية للجل وإجراء التحاليل المخبرية ومراقبة الجودة، ومتابعة الجوانب التقنية والإنتاجية خلال مختلف مراحل التصنيع، والتسويق والتواصل مع الزبائن والجهات الصحية. ويعتمد المشروع على مبدأ التكامل بين أعضاء الفريق من أجل تطوير منتج علاجي بيولوجي مبتكر يستجيب لاحتياجات مرضى السكري المصابين بجروح مزمنة، وذلك في إطار القرار 1275 المعدل بالقرار 008 المؤرخ في 23 فبراير 2025.

### مبررات اختيار فكرة مشروع (اشرح لماذا تم اختيار هذه الفكرة بالذات):

جاء اختيار هذا المشروع استجابةً لحاجة طبية ملحة، إذ تُعدّ الجروح السكرية المزمنة من أكثر المضاعفات خطورةً وانتشاراً في الجزائر والعالم العربي، نظراً للارتفاع المتزايد في معدلات الإصابة بمرض السكري. وتكمن أهمية الفكرة في تطوير هيدروجيل تآزري مبتكر يجمع بين مستخلص العلق الطبي الغني بمركبات نشطة بيولوجياً والشيتوزان المعروف بخصائصه المضادة للبكتيريا والمُعززة لإلتئام الأنسجة، مما يوفر بديلاً علاجياً فعالاً ومحلياً الصنع بتكلفة أقل مقارنةً بالمنتجات المستوردة. ويُضاف إلى ذلك أن المشروع يقوم على مبدأ الاقتصاد الدائري من خلال الاستفادة من الطب البديل ممثلاً في العلق الطبي، والنفايات البيولوجية كقشور الجمبري التي يُستخرج منها الشيتوزان، وتحويلها إلى مادة طبية عالية القيمة. فضلاً عن ذلك، يُسهم المشروع في استثمار موارد طبيعية محلية ودعم الاكتفاء الذاتي في قطاع الصناعة الصيدلانية والطبية، مع فتح آفاق واسعة للتصدير والتوسع المستقبلي.

### رابعاً: دراسة السوق

طبيعة وشدة المنافسة: من هم المنافسون المباشرون وغير المباشرون؟

| شدة المنافسة | طبيعة المنافسة |            | المنافسون        |
|--------------|----------------|------------|------------------|
|              | مباشرة         | غير مباشرة |                  |
| ضعيفة        | متوسطة         | قوية       |                  |
|              | ×              | ×          | مرهم Mebo        |
| ×            |                | ×          | Gel d'anthracite |
|              | ×              | ×          | مرهم Zeta        |

### أذكر استراتيجيات مؤسستك في التعامل مع منافسيها:

تقديم منتج طبيعي 100%: يعتمد BINA Gel حصرياً على مكونات بيولوجية طبيعية (مستخلص العلق الطبي والشيتوزان المستخلص من نفايات الجمبري)، خالٍ تماماً من المواد الكيميائية الضارة، في مقابل المنتجات الكيميائية المستوردة يعتمد المشروع على المواد الخام المحلية والنفايات البيولوجية المجانية (قشور الجمبري) لتخفيض تكاليف الإنتاج، مما يتيح تقديم سعر منخفض ومنافس مقارنةً بالمنتجات المستوردة.

يستند BINA Gel إلى دراسات علمية محكمة تثبت فعالية مستخلص العلق الطبي والشيتوزان في علاج الجروح السكرية المزمنة، مما يكسب ثقة الأطباء والصيادلة والمرضى.

تعتمد المؤسسة على التسويق المباشر عبر وسائل التواصل الاجتماعي، والتوزيع المحلي المباشر للصيدليات والعيادات، لضمان الوصول السريع إلى الفئة المستهدفة بأقل تكلفة تسويقية.

### حجم السوق المستهدف والمحتمل:

- **حجم السوق المستهدف:** يمثل مجموعة الأفراد أو المؤسسات والتي تقدم لها أو تعرض عليها - منتجاتك/خدماتك. (يطلب تحديد الشريحة المستهدفة، تعدادها، مكان تواجدها، .....).

**الشريحة المستهدفة:** مرضى الجروح السكرية المزمنة، والصيدليات، والعيادات الطبية الخاصة، وأطباء السكري وجراحة الجروح.

**تعدادها:** تُحصى الجزائر 4 ملايين مصاب بداء السكري، أي ما يُمثّل 14% من البالغين، ويُعاني ما بين 15% و 25% منهم من جروح مزمنة، مما يُعطي تقديراً بـ 600,000 إلى مليون مريض على المستوى الوطني .  
**مكان تواجدها:** ولاية الوادي في المرحلة الأولى، ثم الولايات المجاورة (ورقلة، بسكرة، تبسة) في مرحلة التوسع.

- **حجم السوق المحتمل:** السوق المحتمل هو مجموعة الأفراد أو المؤسسات التي تطلب أو يحتمل ان تطلب منتجاتك أو خدماتك لإشباع حاجا تهم ورغباتهم. (من يشتري منتجاتنا/ خدماتنا؟ من وما الذي يحفزهم على ذلك؟ أين يتواجدون؟ كم أعدادهم؟).

يشتري منتجاتنا كل مريض سكري معرّض للإصابة بجروح مزمنة مستقبلاً، وكل مؤسسة صحية عمومية أو خاصة على المستوى الوطني.

يحفزهم غياب بديل علاجي طبيعى ومحلي الصنع، وارتفاع تكلفة المستحضرات المستوردة المخصصة لعلاج الجروح السكرية التي تُثقل كاهل المريض والمنظومة الصحية على حدٍ سواء، مما يجعل BINA Gel خياراً علاجياً فعالاً وميسور التكلفة وصنعاً جزائرياً خالصاً.

يتواجدون على كامل التراب الوطني، مع آفاق توسع نحو الأسواق المغاربية المجاورة. متابعة  
أعدادهم ما يقارب 5 ملايين جزائري مصاب بداء السكري بنسبة 15% من إجمالي السكان، يُشكّلون قاعدة سوقية كامنة ضخمة لم تُستغل بعد بمنتجات طبيعية وطنية.

**تحليل SWOT:** نقاط القوة والضعف والفرص والتهديدات لمشروع:

- **نقاط القوة:** كل العناصر (داخل المؤسسة) التي تشكل مصدر قوة لمشروع (قد تكون: مهارات خاصة، موارد بشرية، موارد مادية، .....).
- **نقاط الضعف:** كل العناصر (داخل المؤسسة) التي تشكل نقطة ضعف أو توقف عائقا امام مشروع حالي أو مستقبلي
- **الفرص:** كل العناصر الخارجية التي لها أثر إيجابي على تنفيذ مشروع أو تطوره في المستقبل
- **التهديدات:** كل العناصر الخارجية التي لها أثر سلبي على تنفيذ مشروع أو تطوره في المستقبل

### جدول تحليل SWOT

| عوامل تعطل تحقيق الأهداف                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | عوامل تساعد في تحقيق الأهداف                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SWOT         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <p><b>نقاط الضعف Weaknesses</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. رأس مال أولي محدود كمؤسسة مصغرة</li> <li>2. محدودية التجربة التسويقية والتجارية</li> <li>3. قد يكون الإنتاج الأول بكميات صغيرة</li> <li>4. الحاجة إلى تجهيزات مخبرية ذات تكلفة عالية</li> <li>5. غياب شبكة توزيع راسخة في البداية</li> <li>6. متطلبات التخزين المبرّد تزيد التكلفة التشغيلية</li> <li>7. صعوبة استيراد بعض المواد الكيميائية</li> <li>8. غياب سجل تجاري سابق يُضعف المصداقية أمام الزبائن المؤسسين</li> </ol> | <p><b>نقاط القوة Strengths</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. منتج طبيعي 100% بخصائص علاجية مثبتة علمياً</li> <li>2. تكلفة مواد أولية منخفضة (مخلفات صديقة للبيئة)</li> <li>3. خبرة المؤسسين في المجال العلمي والبيولوجي</li> <li>4. إعفاء ضريبي لمدة 10 سنوات</li> <li>5. قرب الموقع من مراكز رعاية صحية</li> <li>6. دعم مركز تطوير المقاولاتية.</li> </ol> | عوامل داخلية |
| <p><b>التهديدات Threats</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. دخول منافسين يقلّدون المنتج لاحقاً</li> <li>2. تقلّب أسعار المواد الأولية المستوردة</li> <li>3. محدودية إدراك المستهلك للمنتجات الطبية الجديدة</li> <li>4. احتمال فرض اشتراطات تسجيل صيدلاني مستقبلاً</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                  | <p><b>الفرص Opportunities</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ارتفاع انتشار السكري في الجزائر (سوق واسع)</li> <li>2. دعم الدولة لريادة الأعمال الجامعية (قرار 1275)</li> <li>3. توجه عالمي نحو منتجات الطب الحيوي الطبيعية</li> <li>4. إمكانية التصدير مستقبلاً</li> <li>5. غياب منافس محلي مباشر يقدم نفس المنتج</li> </ol>                                  | عوامل خارجية |

## إنتاج هيدروجيل علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

### 1. نموذج العمل التجاري BMC لمشروع:

| العملاء                                                                                                                                                                      | العلاقة مع العملاء                                                                                                                                                                          | القيمة المقترحة                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | الأنشطة الرئيسية                                                                                                                                                                                                        | الشركاء الرئيسيون                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• مرضى السكري (جروح مزمنة)</li> <li>• الصيدليات والعيادات</li> <li>• المستشفيات (خاصة وعامة)</li> <li>• جمعيات مرضى السكري</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• بيع مباشر للصيدليات</li> <li>• متابعة مرضى عبر الهاتف/تطبيق</li> <li>• حملات توعية في المراكز الصحية</li> <li>• صفحات التواصل الاجتماعي</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• علاج طبيعي 100% للجروح المزمنة</li> <li>• تكلفة أقل من المنتجات المستوردة</li> <li>• متاح محلياً وسهل الاستخدام</li> <li>• آمن وفعال للمرضى</li> <li>• يُقلّل مخاطر البتر السكري</li> <li>• دعم البحث العلمي المحلي (صنع في الجزائر)</li> </ul>                                                                                                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• استخلاص الشيتوزان من قشور الجمبري</li> <li>• استخلاص مادة العلق البيولوجية</li> <li>• تصنيع الهيدروجيل وتعبئته</li> <li>• مراقبة الجودة</li> <li>• التسويق والتوزيع</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• المطاعم (المحلية توفير قشور الجمبري)</li> <li>• مركز تطوير المقاولاتية</li> <li>• الصيدليات والعيادات (قناة توزيع)</li> <li>• شركات التوصيل المحلية</li> <li>• مخبر Fati Lab</li> </ul> |
|                                                                                                                                                                              | <b>قنوات توزيع</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• بيع مباشر بالتوصيل</li> <li>• الصيدليات والعيادات</li> <li>• منصات إلكترونية</li> <li>• وسائل التواصل الاجتماعي</li> </ul>      | <b>الموارد الرئيسية</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• الموارد المادية: <ul style="list-style-type: none"> <li>• محل إنتاج ملكية خاصة لأحد المؤسسين ،</li> <li>• تجهيزات وآلات، مواد أولية،</li> </ul> </li> <li>• الموارد البيولوجية: <ul style="list-style-type: none"> <li>• قشور الجمبري (مجانية من مخلفات المطاعم)</li> <li>• مستعمرة العلق الطبي (تُبنى تدريجياً من السنة الأولى)</li> </ul> </li> </ul> |                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <p>• الموارد البشرية:</p> <p>4كوادر حاملات شهادة ماستر بيوكيمياء تطبيقية</p> <p>خبرة في استخلاص وتنقية المواد الفعالة</p> <p>• الموارد المعنوية:</p> <p>دعم مركز تطوير المقاولاتية (القرار 1275)</p> <p>قرب الموقع من مخبر Fati Lab</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |  |
| <p><b>التكاليف</b></p> <p>• تكلفة الاستثمار الإجمالية: 5,567,000 دج (آلات إنتاج، تجهيزات مخبرية، تهيئة المحل، أصول بيولوجية...)</p> <p>• تكاليف مواد أولية: 32,000 دج، منخفضة بفضل النفايات البيولوجية المحلية (قشور الجمبري من مخلفات المطاعم)</p> <p>• أجور العمال (سنة): 1,152,000 دج</p> <p>• أعباء خارجية (سنة): 45,000 دج</p> <p>• اهتلاك سنوي: 515,000 دج</p> |                                                                                                                                                                                                                                         | <p><b>الإيرادات</b></p> <p>• مبيعات BINA Gel 2,000 دج/قارورة × 1000 قارورة = 2,000,000 دج (سنة 1)</p> <p>• بيع شيتوزان خام 100 دج × 500 غ = 50,000 دج (سنة 1)</p> <p>• بيع علق طبي حي 300 دج/علقة (من السنة 2)</p> <p>• إجمالي إيرادات السنة 1: 2,050,000 دج</p> <p>• إجمالي إيرادات السنة 3: 6,380,000 دج (نمو متوقع)</p> |  |  |

## خامساً: الدراسة التقنية

احتياجات المشروع من الموارد البشرية: حدد بدقة احتياجات مشروعك من الموارد البشرية

| طبيعة المستخدمين                                                            | العدد | الكفاءات / الشهادات     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------|
| المسير                                                                      | 1     | ماستر بيوكيمياء تطبيقية |
| الإطارات (مهندسين، رؤساء المصالح، المكلفين بالتسويق، رؤساء الورشات... إلخ). | 1     | ماستر بيوكيمياء تطبيقية |
| عمال التحكم (المكلفين بالمخزن، السكرتاريا... إلخ).                          | 1     | ماستر بيوكيمياء تطبيقية |
| عمال التنفيذ (السائق، الحارس، عامل النظافة... إلخ).                         | 1     | ماستر بيوكيمياء تطبيقية |

اختيار موقع إقامة المشروع: أين سيكون موقع المشروع ومبررات اختياره؟ (قدم المبررات اللازمة لاختيار موقع المشروع)

الموقع: شارع 19 مارس 1962، مدينة الوادي، بالقرب من مخبر تحاليل الجودة **Fati Lab**

المساحة المتاحة: لا تقل عن 50 م<sup>2</sup> (قسم إنتاج + قسم تخزين + مكتب إداري) ملك خاص لأحد المؤسسات، مما يلغي تكاليف الإيجار كلياً ويُخفّض الأعباء التشغيلية.

مبررات الاختيار:

1. انعدام تكلفة الإيجار: كون المحل ملكاً خاصاً يُشكّل ميزة اقتصادية مباشرة تنعكس إيجابياً على ربحية المشروع منذ السنة الأولى.

2. القرب من مخبر الجودة **Fati Lab**: يُتيح إجراء اختبارات مراقبة الجودة (التعقيم، التركيز) بسرعة وبتكلفة منخفضة، مما يضمن الاستجابة الفورية لأي إشكال في الإنتاج.

3. القرب من جامعة الشهيد حمه لخضر: يُسهّل التواصل المستمر مع مركز تطوير المقاولاتية والاستفادة من الدعم الأكاديمي والتقني في إطار القرار 1275.

4. توفر السوق المستهدف: تتركز بولاية الوادي شبكة واسعة من الصيدليات والعيادات والمستشفيات التي تُمثّل القنوات التوزيعية الأولى للمنتج.

إنتاج هيدروجين علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

سادسا: تقدير تكاليف وإيرادات المشروع

## 1 - تقدير تكاليف المشروع

1.1 تقدير المبلغ الإجمالي للاستثمار: (تكلفة المشروع)

| المبلغ (دج) | البيان                                                                    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 5 000 000   | آلات ومعدات الإنتاج                                                       |
| 250 000     | تهيئة المحل                                                               |
| 75 000      | الأصول البيولوجية (الحيوانات- الأشجار...)                                 |
| 0           | العتاد المتنقل ( لا حاجة في المرحلة الأولى يُعتمد على شركات توصيل خارجية) |
| 20 000      | العتاد المكتبي                                                            |
| 40 000      | عتاد الإعلام الآلي                                                        |
| 15 000      | عتاد السمعي البصري                                                        |
| 10 000      | عتاد الاتصالات                                                            |
| 50 000      | تركيب التجهيزات                                                           |
| 75 000      | المصاريف العامة المتعلقة بالإنشاء                                         |
| 32 000      | رأس المال العامل (المادة الأولية)                                         |
| 5,567,000   | المبلغ الإجمالي للاستثمار (تكلفة المشروع)                                 |

2.1 تقدير مشتريات المشروع من المواد الأولية

| السنة 3 | السنة 2 | السنة 1 | قائمة المواد الأولية                               |
|---------|---------|---------|----------------------------------------------------|
| L2      | 1.5L    | 1L      | المادة الأولية 1:<br>HCl                           |
| 1000 دج | 1000 دج | 1000 دج | سعر الوحدة 1L                                      |
| 2000 دج | 1500 دج | 1000 دج | مبلغ المادة الأولية 2                              |
| 4Kg     | 3Kg     | 2kg     | المادة الأولية 2:<br>NaOH                          |
| 900 دج  | 900 دج  | 900 دج  | سعر الوحدة ( 1kg )                                 |
| 3600 دج | 2700 دج | 1800 دج | تكلفة شراء المادة الأولية 3                        |
| 2L      | 1.5L    | 1L      | المادة الأولية 3:<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 400 دج  | 400 دج  | 400 دج  | سعر الوحدة ( 1L )                                  |
| 800 دج  | 600 دج  | 400 دج  | تكلفة شراء المادة الأولية 4                        |
| 2L      | 1.5L    | 1L      | المادة الأولية 4:<br>Acide acétique                |
| 1800 دج | 1800 دج | 1800 دج | سعر الوحدة 1L                                      |
| 3600 دج | 2700 دج | 1800 دج | تكلفة شراء المادة الأولية 5                        |

إنتاج هيدروجين علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

|            |            |             |                                         |                                                   |
|------------|------------|-------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 2L         | 1.5L       | 1L          | الكمية المشتريات                        | المادة الاولى 5:<br>Glycérol                      |
| 2000دج     | 2000دج     | 2000دج      | سعر الوحدة                              |                                                   |
| 4000دج     | 3000دج     | 2000دج      | تكلفة شراء المادة الاولى 6              |                                                   |
| 3000قارورة | 1900قارورة | 1000 قارورة | الكمية المشتريات                        | المادة الاولى 6:<br>قارورة زجاجية طبية معقمة 10ml |
| 20دج       | 20دج       | 20دج        | سعر الوحدة                              |                                                   |
| 60000دج    | 38000دج    | 20000دج     | تكلفة شراء المادة الاولى 7              |                                                   |
| 3000ملصق   | 1900 ملصق  | 1000ملصق    | الكمية المشتريات                        | المادة الاولى 7:<br>ملصقات والتغليف               |
| 5دج        | 5دج        | 5 دج        | سعر الوحدة                              |                                                   |
| 15000دج    | 9500دج     | 5000دج      | تكلفة شراء المادة الاولى 8              |                                                   |
| 89,000 دج  | 58,000 دج  | 32,000 دج   | إجمالي مبالغ المشتريات من المواد الاولى |                                                   |

### 3.1 - تقدير تكاليف اليد العاملة

| قيمة الاجر |           |           | عدد العمال |         |         | تسمية المنصب                                                                |
|------------|-----------|-----------|------------|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------|
| السنة 3    | السنة 2   | السنة 1   | السنة 3    | السنة 2 | السنة 1 |                                                                             |
| 32,000 دج  | 28,000 دج | 24,000 دج | 1          | 1       | 1       | المسير / أو الميسرون                                                        |
| 32,000 دج  | 28,000 دج | 24,000 دج | 1          | 1       | 1       | الإطارات (مهندسين، رؤساء المصالح، المكلفين بالتسويق، رؤساء الورشات... إلخ). |
| 32,000 دج  | 28,000 دج | 24,000 دج | 1          | 1       | 1       | عمال التحكم (المكلفين بالمخزن، السكرتاريا... إلخ).                          |
| 32,000 دج  | 28,000 دج | 24,000 دج | 1          | 1       | 1       | عمال التنفيذ (السائق، الحارس، عامل النظافة... إلخ).                         |

- ينبغي ان لا يقل الاجر الشهري الصافي عن الحد الأدنى المضمون

### 4.1 تقدير التكاليف الخارجية للمشروع

| السنة 03 | السنة 02 | السنة 01 | البيان                            |
|----------|----------|----------|-----------------------------------|
| 20000 دج | 20000 دج | 20000 دج | مصاريف الكهرباء / الغاز / الماء   |
| 5000 دج  | 5000 دج  | 5000 دج  | تكاليف الصيانة و التصليح          |
| 0 دج     | 0 دج     | 0 دج     | تكاليف الايجار                    |
| 0 دج     | 0 دج     | 0 دج     | مصاريف تأمين العتاد و المعدات     |
| 5000 دج  | 5000 دج  | 5000 دج  | مصاريف التسويق (الدعاية والإشهار) |
| 5000 دج  | 5000 دج  | 5000 دج  | تكاليف التكوين والتدريب           |
| 10000 دج | 10000 دج | 10000 دج | مصاريف عامة (أعباء خارجية) أخرى   |
| 45000 دج | 45000 دج | 45000 دج | المجموع                           |

إنتاج هيدروجيل علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

### 5.1 تقدير تكاليف اهتلاك الاستثمارات

| البيان              | مدة الاهتلاك ( بالسنوات ) | قسط الاهتلاك السنوي (دج) |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| آلات ومعدات الإنتاج | 10                        | 500000                   |
| العتاد المتنقل      | 0                         | 0                        |
| العتاد المكتبي      | 10                        | 2000                     |
| عتاد الإعلام الآلي  | 5                         | 8000                     |
| عتاد السمعي البصري  | 5                         | 3000                     |
| عتاد الاتصالات      | 5                         | 2000                     |
| المبلغ الإجمالي     |                           | 515000                   |

- يطبق الاهتلاك الخطي (تحدد مدة الاهتلاك وفقا لقرار وزارة المالية المؤرخ في 14 أفريل 2025 المعدل والمتمم للقرار الصادر بتاريخ 25 فيفري 2024 الذي يحدد مدة اهتلاك التثبيات المطبقة لتحديد النتيجة الجبائية – الجريدة الرسمية عدد 29 لسنة 2025)

### 3-تقدير إيرادات المشروع

#### 1.3 تقدير حجم المبيعات السنوية

| البيان                                 | السنة 1                     | السنة 2      | السنة 3      |
|----------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| المنتج / الخدمة 1:<br><br>BINA Gel     | الكمية المباعة              | 1000 قارورة  | 1900 قارورة  |
|                                        | سعر الوحدة (قارورة الواحدة) | 2000 دج      | 2000 دج      |
|                                        | قيمة مبيعات المنتج          | 2000000 دج   | 3800000 دج   |
| المنتج / الخدمة 2:<br>الشيتوزان الخام  | الكمية المباعة              | 500g         | 1kg          |
|                                        | سعر الوحدة (غرام الواحد)    | 100 دج       | 100 دج       |
|                                        | قيمة مبيعات المنتج          | 50000 دج     | 100000 دج    |
| المنتج / الخدمة 3:<br>العلق الطبي الحي | الكمية المباعة              | 0 علقة       | 200 علقة     |
|                                        | سعر الوحدة (علقة الواحدة)   | 300 دج       | 300 دج       |
|                                        | قيمة مبيعات المنتج          | 0 دج         | 60000 دج     |
| إجمالي المبيعات                        |                             | 2,050,000 دج | 3,960,000 دج |
|                                        |                             |              | 6,380,000 دج |

### 2.3 حساب النتيجة السنوية

| البيان | السنة 01 | السنة 02 | السنة 03 |
|--------|----------|----------|----------|
|--------|----------|----------|----------|

إنتاج هيدروجيل علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

|                                           |              |              |              |
|-------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| رقم الأعمال ( المبيعات ) ... (1)          | 2,050,000 دج | 3,960,000 دج | 6,380,000 دج |
| المشتريات المستهلكة ... (2)               | 32,000 دج    | 58,000 دج    | 89,000 دج    |
| الأعباء الخارجية ... (3)                  | 45,000 دج    | 45,000 دج    | 45,000 دج    |
| القيمة المضافة ... (4) = (1) - (2) - (3)  | 1,973,000 دج | 3,857,000 دج | 6,246,000 دج |
| الأجور و الأعباء الاجتماعية ... (5)       | 1,324,800 دج | 1,545,600 دج | 1,766,400 دج |
| إجمالي فائض الاستغلال ... (6) = (4) - (5) | 648,200 دج   | 2,311,400 دج | 4,479,600 دج |
| الإهلاكات و المؤونات ... (7)              | 515,000 دج   | 515,000 دج   | 515,000 دج   |
| نتائج الاستغلال ..... (8) = (6) - (7)     | 133,200 دج   | 1,796,400 دج | 3,964,600 دج |
| الضرائب على الشركات / IFU .... (9)        | 0            | 0            | 0            |
| صافي الدخل ..... (10) = (8) - (9)         | 133,200 دج   | 1,796,400 دج | 3,964,600 دج |
| تطور رقم الأعمال                          | مرجع         | 93.17%       | 61.11%       |

خاتمة:

القيمة المضافة المتوقعة للمشروع على الاقتصاد المحلي والوطني.....  
أولاً القيمة المضافة الاقتصادية:

يُسهم مشروع BINA Gel في تقليص فاتورة استيراد المستحضرات الجلدية الدوائية المتخصصة في علاج الجروح المزمنة وذلك بتوفير بديل وطني بيولوجي عالي الجودة بتكلفة تنافسية. يُؤلّد المشروع قيمة مضافة مباشرة من خلال الإنتاج المحلي، والتشغيل الجزئي للكفاءات الجامعية، وتحقيق عائد مالي يُعيد ضخّه في الاقتصاد المحلي بولاية الوادي كما يُرسّخ ثقافة المقاولاتية العلمية في الوسط الجامعي بما يتوافق مع أهداف القرار 1275 المعدل 2025.

ثانياً القيمة المضافة الاجتماعية والصحية :

يُعالج المشروع إشكالية صحية عامة متنامية؛ إذ يُعاني ما يزيد على 4 ملايين جزائري من داء السكري، يُقدّر من بينهم نسبة معتبرة يُصابون بجروح مزمنة تستلزم تدخلاً علاجياً موضعياً متخصصاً. يُقدّم BINA Gel بديلاً علاجياً فعالاً وآمناً وميسور التكلفة، مما يُخفف العبء على المنظومة الصحية ويُحسّن جودة حياة الفئة المستهدفة. فضلاً عن ذلك، يُجسّد المشروع تمكين المرأة الجامعية في مجال ريادة الأعمال البيوتقنية.

إنتاج هيدروجين علاجي بيولوجي يجمع بين مستخلص العلق الطبي والشيتوزان، موجّه لعلاج الجروح المزمنة لدى مرضى السكري

### ثالثاً القيمة المضافة البيئية والاستدامة:

يعتمد المشروع على توظيف النفايات البيولوجية (قشور الجمبري) مصدراً للشيتوزان، بدل إهدارها بيئياً. يُكرّس هذا التوجه مبادئ الاقتصاد الدائري والابتكار البيوتقني المستدام، ويُقدّم نموذجاً قابلاً للتوسع في استثمار المخلفات الصناعية والزراعية لصناعة منتجات بيولوجية ذات قيمة مضافة عالية.

