

UNIVERSITE KASDI MERBAH - OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des sciences biologiques



Mémoire en vue l'obtention du diplôme de Master Académiques

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Qualité des produits et sécurité alimentaire

**Extraction et caractérisation de l'acide Hyaluronique
extrait de l'humeur vitrée du dromadaire**

Présentée par :
Ben Hamida Nihad

Tebba Feriyal

Soutenue publiquement le :14/09/2023

Devant le jury compose de :

Président	Mosbah Said	MCA	UKM ouargla
Promoteur	CHOUANA TOUFIK	MCA	UKM ouargla
Copromoteur	RAHMANI YOUCEF	MCB	UKM ouargla
Examineur	Benaoun Fatima	MCB	UKM ouargla

Année universitaire: 2022/2023

REMERCIEMENTS

En premier lieu, nous tenons à remercier ALLAH le tout puissant pour nous avoir donné la force et la volonté à finaliser ce travail.

*Nous voudrions témoigner de nos remerciements et nos gratitude à notre promoteur **Dr Chouana. T**, pour nous avoir encadré, pour la confiance qu'il nous a accordé, pour le temps précieux qu'il nous a consacré, son assistance, sa disponibilité, sa compréhension et ses conseils qui nous a beaucoup aidé à réaliser ce travail.*

*Nous remercions sincèrement **Dr Rahmani.Y** de ce tenir à nous cotés, et de nous aider à terminer la partie appliquée et de nous avoir encouragés à continuer*

*A **Dr Mosbah.S** nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury.*

*A **Dr Benaoun .F** nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de examiner ce travail.*

Un grand merci aussi à tous les enseignants du notre spécialité qualité des produits et sécurité alimentaires.

Nous sommes reconnaissants aux personnes qui nous ont apporté un soutien psychologique dans les moments déficilles ya compris les membres de laboratoire CRAPC

Sans oublier ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

D'abord je remercie « Allah » de m'avoir donné le courage et

La patience pour continuer ce mémoire

Je dédie ce modeste travail...

A ma chère mère

Ma très chère et précieuse mère source de tendresse et d'amour

*, je ne trouve pas les mots pour exprimer ma gratitude en vers tout ce que tu as fait pour moi
pour ton soutien et aide, tu étais toujours à mes cotés Puisse dieu, te préserver et t'accorder*

santé, longue vie et bonheur

A mon cher père

qui m'a toujours

*soutenu, éduqué et a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je le
remercie de m'avoir transmis ce caractère.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai
toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis
pour mon éducation et ma formation.*

A mes chers frères Ishak Saïd Idris et ma chère sœur Isra

À toute la famille Mon grand père et ma grande mère a mon précieux oncle Nasroo

Ma chère amie Fouzia *merci beaucoup d'être restée à mes cotées dans les moments
difficiles*

A ma douce copine khawla *merci d'être avec moi*

Malgré la distance tu ma toujours pousse à continuer tu ma écouté sans ennui je t'aime

A tous ceux que j'aime et qui je respect merci

Nado

Dédicac

D'abord je remercie « Allah » de m'avoir donné le courage, la force et

La patience d'achevé ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail

Aux deux êtres qui sont les plus chères dans ma vie, pour leur bonté, leur soutien et leur patience face aux moments difficiles traversés au cours de ma vie, qui ont partagé avec moi ma joie et ma peine

A ma mère et à mon père à qui je dis : merci

Et ces remerciements ne leur suffiront jamais, que dieu les garde pour moi

*Et je n'oublie pas mes deux frères que je l'aime beaucoup : **ma chère Rania***

*Et **mon cher frère** Ayman Je les remercie beaucoup*

*A tous les étudiants de **Master 2 Qualité et Sécurité des Produits alimentaires***

***Pour** l'année 2022/2023 Je leur dédie mes salutations.*

Et à ceux qui m'ont le plus encouragé et soutenu dans mes jours les plus difficiles;

*Et à toute **ma famille** j'espère que ce travail est un témoignage honnête de ma part, l'étudiant*

Persévérant Fofa.

Feriyal

Liste des tableaux

Tableau 1: Masse molaire moyenne de l'acide hyaluronique en fonction de son origine, d'après Laurent et Balazs, (1970)	10
Tableau 2 : Méthodes d'extraction et de purification pour obtenir de l'AH à partir de sources terrestres et marines (Ruschoni et <i>al.</i> , 2022)	33
Tableau 3: Résumé des différents paramètres économiques pour la production d'HA à l'aide de sources sauvages et recombinantes (Ruschoni et <i>al.</i> ,2022)	36
Tableau 4: Matériels et produits utilisés.....	54

Liste des figures

Figure 1: Anatomie de l'œil et de la barrière hémato-rétinienne	6
Figure 2: Unité di saccharidique, constituant de base de l'acide hyaluronique	10
Figure 3: Un tétrasaccharide d'une chaîne HA	13
Figure 4: Structure secondaire du AH dans du DMSO avec et sans présence d'eau	14
Figure 5: Plan (1) et élévation (2) de projections dessinées par ordinateur de la molécule d'hyaluronane en forme de bande. (3) est la vue vue le long de l'axe de l'hélice à deux plis...	15
Figure 6: Rôle de l'AH lors de la réaction inflammatoire	17
Figure 7: L'angiogenèse du tissu tumoral.....	19
Figure 8: Biosynthèse de l'AH au travers de la membrane plasmique	23
Figure 9: Représentation schématique du cycle m établi de l'AH induit par la blessure dans les plaieess	23
Figure 10: Cycle de dégradation de l'AH	26
Figure 11: Chromophores photoréactifs liés à l'AH pour la réticulation	28
Figure 12: L'unité disaccharidique de l'AH fonctionnalisées avec des hydrazides.	30
Figure 13: Extraction de l'acide Hyalorunique de loeil de Nile Tilapia (Oreochromis niloticus).....	32
Figure 14: Organigramme des différentes opérations développées dans la préparation de l'AH hautement purifiant à partir de l'humeur vitrée du globe oculaire de poisson. Les lignes discontinues (B) montrent des répétitions possibles dans les étapes afin d'augmenter..	38
Figure 15: Organigramme des méthodes de purification pour extraire l'acide hyaluronique (HA) du vitré humour (VH) du globe oculaire de poisson. SED : sédiment, SUP : surnageant, PER : perméat et RET : rétentat	39
Figure 16: Classification des cancers basée sur les caractéristiques histologiques.....	55
Figure 17: Préparation d'échantillons et le nettoyage(Photo personnelle).	56
Figure 18: Les étapes de dissection d'Œil et extraction de l'humeur vitrée (Photo personnelle)..	57
Figure 19:	61
Figure 20: Orientation des spins nucléaires suite à l'application d'un champ magnétique B0	63
Figure 21: Spectre IR (ATR) de l'exriat brut de l'acide hyaluronique.	64
Figure 22: Spectres RMN-13C de l'acide hyaluronique	65
Figure 23: Spectres RMN-1 H de l'acide hyaluronique.....	66

Liste d'abreviations

13C : Carbone 13.

CCP : Chlorure de cétylpyridinium

CD44 : Classe de différenciation 44.

CDI: Carbonyle di-imidazole

CH₃COOH : Acide acétique

CVI : Les cellules valvulaires interstitielles.

D2O : Deuterium oxide.

Da : Daltons.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DVS: Divinyl sulfone.

FCE : facteurs de croissance épidermiques.

FCEV : facteur de croissance endothélial vasculaire

FCF : Facteur de croissance des fibroblastes.

FFT : Filtration à flux tangentiel

GAG : Glycosaminoglycane.

HAS: Hyaluronates synthéthases.

HCl: Chlorure d'hydrogène.

HV : Humeur vitrée.

HYAL : Hyaluronidases

IFN α : Interféron α .

IL : Interleukine.

IR : infrarouge.

KB : kappa B.

KDa : Kilo daltons.

KH₂PO₄ : Potassium dihydrogène phosphate

MDa : Millions de daltons .

MEC : Matrice extra cellulaire.

mAH: Masse de l'acide hyaluronique.

MHz : Megahertz.

mR: Masse du résidu.

NaH₂PO₄: Sodium dihydrogenephosphate

NaOH: Hydroxyde de sodium

NF : Nuclear factor /Facteur nucléaire.

NH : Hydrures d'azote.

Nm : Nano mètre.

OH : Hydroxyde

PEG: Poly(éthylène glycol)

PGPGE : Polyglycérol polyglycidyl éther

pK : Protéine kinase.

pKa : Protéine kinase a.

PKC : Protéine kinase c.

PM: Poids moléculaires

ppm : Parties par million.

RFCE: Récepteur du facteur de croissance épidermique.

RMN : Résonance magnétique nucléaire

TLR4 : Toll-like-receptor 4 / le récepteur Toll-like 4 .

UV: Les rayons ultraviolet.

v/v: Volume/Volume.

α : Alpha.

μm : Micromètre.

Table des matières

REMERCIEMENTS	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste d'abreviations	
Introduction :	1
I. Partie I: Généralités sur l'humeur vitrée.....	4
I.1. Anatomie et composition générale de l'œil :.....	4
I.1.1. Chambre antérieure :.....	4
I.1.2. Chambre postérieure :	4
I.2. Définition de l'humeur vitrée	4
I.2.1. Composition générale de l'HV	5
II. Partie II:Généralité sur l'acide Hyaluronique	6
II.1. L'acide hyaluronique (AH):	6
II.2. Historique:	7
II.3. La structure de l'acide Hyaluronique:	8
II.4. Propriétés physico chimique de l'acide Hyaluronique:.....	10
II.4.1. Masse moléculaire:	10
II.4.2. Solubilité et viscosité:.....	11
II.4.3. Etudes en phase solide:.....	11
II.4.4. Sensibilité aux agents physiques, chimiques et enzymatiques:.....	12
II.4.5. Propriétés anti-radicalaires et anti-oxydantes:.....	12
II.5. Caractères macromoléculaires:	12
II.5.1. Propriétés des polyélectrolytes:	13
II.5.2. Conformation:.....	13
II.6. Rôles fonctionnelles du AH dans l'organisme vivant:	16
II.6.1. Dans la réponse inflammatoire:	16
II.6.2. Rôle dans l'initiation de la réponse à une lésion tissulaire.....	17
II.6.3. Rôles dans la cicatrisation:	18

II.6.4. Régénération de la matrice extracellulaire	18
II.6.5. Régénération épithéliale:	19
II.6.6. Rôle dans l'angiogénèse:	19
II.6.7. Rôle dans le cartilage:.....	20
II.6.8. Pathologies pulmonaires:.....	20
II.7. Synthèse:.....	21
II.7.1. Source intrinsèque:	21
II.7.2. Source extrinsèque:.....	23
II.8 .Catabolisme de l'acide hyaluronique intrinsèque:.....	24
II.9. Dérivation chimique de l'AH.....	26
II.9.1. Hylans:	26
II.9.2. Autres dérivés de l'AH:.....	29
II.10. Production et obtention de HA:	30
II.10.1. Source animale	31
II.10.2. Source microbienne	34
II.10.3. Processus en aval pour la récupération de l'AH:	37
II.11. Les applications de l'acide hyaluronique :	40
II.11.1. en chirurgie:	40
II.11.2. Œil (Ophtalmologie):	40
II.11.3. Chirurgie esthétique:	41
II. Matériel et Méthodes	54
II.1. Objectif	54
II.2. Le matériel et les produits utilisés:	54
II.3. Préparation d'échantillons:	55
II. 3.1. Nettoyage et lavage d'Œil	55
II. 3.2. Dissection d'Œil	55
II.4. Préparations des produits.....	56
II.4.1. Préparation de la solution saline tamponnée:	56
II.4.2. Préparation de la solution enzymatique:.....	56
II.4.3. Préparation de la solution d'éthanol à 70%	56
II.5. Le protocole d'extraction de l'acide hyaluronique.....	57
II.6. Calcul du rendement d'extraction	59

II.7. Caractérisation physicochimique de l'extrait obtenu :	59
II.7.1. L'analyse spectroscopies IR	59
II.7.2. La Résonance Magnétique Nucléaire(RMN):	60
III. Résultats et discussions	62
III.1.Le rendement d'extraction.....	62
III.2. Spectre Infrarouge	62
III.3. Spectroscopie RMN	64
III.4. Spectroscopie RMN	64
Conclusion.....	68
Références bibliographiques.....	70
Anexes.....	79

Introduction

Introduction :

Le corps humain, ainsi que celui des animaux, a été étudié par les scientifiques depuis de nombreuses années dans le but de comprendre son fonctionnement et de tirer profit de ces connaissances pour le traitement de diverses maladies. De nombreuses avancées ont été réalisées et il est désormais possible de reproduire ou d'extraire des parties du corps humain ou animal pour les utiliser comme agents thérapeutiques. L'acide hyaluronique est l'un de ces composants. Depuis sa découverte, ses nombreuses caractéristiques ont été étudiées, révélant son rôle moléculaire d'importance physiologique. Il est l'un des principaux constituants de la matrice extracellulaire de la peau et du cartilage, et on le trouve généralement dans tout l'organisme (Laura ,2020).

En conséquence, l'acide hyaluronique se révèle être un matériau fantastique pour relier et connecter les différents composants de la matrice extracellulaire. De plus, il joue d'autres rôles tout aussi fascinants dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. Il intervient également dans des processus tels que l'angiogenèse, l'inflammation et les réactions du système immunitaire (Laura ,2020).

Son utilisation s'est donc développée en exploitant toutes ses capacités. Il est notamment connu pour son utilisation en chirurgie esthétique afin de réduire les rides du visage. Il trouve également des applications en chirurgie dentaire, où il contribue à la création de contours faciaux esthétiques en complément des soins orthodontiques. L'acide hyaluronique est largement utilisé dans l'industrie cosmétique, où il contribue à la formulation de crèmes, gels, masques et sérums en raison de ses propriétés hydratantes, anti-âge et revitalisantes. Sa présence est souvent mise en avant dans la promotion de ces produits (Laura ,2020).

De ce fait, l'acide hyaluronique s'est progressivement établi comme traitement pour diverses maladies et a fait son entrée en tant que principe actif dans l'arsenal pharmaceutique pour le traitement de pathologies aiguës et chroniques. Il offre une gamme de solutions thérapeutiques avec un risque négligeable (Laura ,2020).

Dans notre travail, nous nous concentrons sur la possibilité d'extraire et de caractériser l'acide hyaluronique de l'humeur vitrée du dromadaire sahraoui. Nous étudierons ses propriétés physico-chimiques et explorerons les techniques de purification et de caractérisation de cette molécule.

Introduction

Notre recherche est structurée en trois chapitres. Le premier chapitre présente des informations générales sur l'œil et l'humeur vitrée, ainsi qu'une introduction à l'acide hyaluronique, sa découverte, ses différentes formes et ses domaines d'application.

Le deuxième chapitre décrit la partie expérimentale, en détaillant les étapes de l'extraction de l'acide hyaluronique de l'humeur vitrée du dromadaire, ainsi que les produits et les équipements utilisés dans notre travail. Nous présenterons également la méthode de conservation du produit final.

Enfin, le dernier chapitre présentera les résultats de notre étude, y compris le rendement de l'acide hyaluronique et sa caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN), Le rendement de l'extraction et spectre infrarouge (IR).

Nous espérons que cette recherche contribuera à une meilleure compréhension de l'acide hyaluronique extrait de l'humeur vitrée du dromadaire et ouvrira de nouvelles perspectives dans le domaine des thérapies basées sur cette molécule.

Chapitre I
Partie Bibliographique

I. Partie I: Généralités sur l'humeur vitrée:

L'œil est un organe sensoriel sphérique présent chez les organismes vivants (humains et animaux) qui leur permet de voir les choses clairement. Lorsqu'il est endommagé ou perdu, la vision est altérée. En raison de son rôle essentiel, l'œil a suscité un grand intérêt de la part des chercheurs (personnelle).

I.1. Anatomie et composition générale de l'œil :

La plupart des animaux de la ferme partagent une architecture oculaire de base similaire, à quelques exceptions près (Abuagla, 2016). En ce qui concerne l'œil du dromadaire (camelin), ses composants de base sont similaires à ceux de l'œil bovin (Dyce et Wensing, 1971), ovin (Mai, 1954), laitier (Constantinescu, 2001) et canin (Bradley, 1959). La composition de l'humeur vitrée du dromadaire comprend les éléments suivants (Figure 1) :

I.1.1. Chambre antérieure :

La chambre antérieure de l'œil comprend les éléments suivants : la rétine avasculaire, les fibres zonulaires, la cornée, l'iris, le cristallin, les processus ciliaires et la conjonctive (Bévalot, 2014).

I.1.2. Chambre postérieure :

La chambre postérieure de l'œil comprend les éléments suivants : le corps vitré (humeur vitrée), la choroïde, le canal hyalin de Cloquet, la rétine optique, la zone de la fovéa, la papille, le nerf optique et enfin la sclérotique (Bévalot, 2014).

I.2. Définition de l'humeur vitrée

L'humeur vitrée (HV) est un gel incolore qui présente une consistance semblable à de la gelée (Beauthier, 2008). Elle est composée d'un réseau complexe de fibres de collagène interconnectées et de glycosaminoglycanes hyaluronanes hydrophiles, qui ensemble produisent un gel humide avec peu de cellules (Stitt et *al.*, 1998 ; Zilg et *al.*, 2009 ; Gajewski, 2004). Elle est constituée à 99% d'eau, et le 1% restant est composé de constituants macromoléculaires et de faible poids moléculaire tels que les sucres, l'urée, la créatinine et les électrolytes. Les

différents électrolytes pouvant être mesurés dans l'HV comprennent le sodium, le potassium, le chlorure, le calcium et le magnésium (Coe et *al.*, 1984 ; Osuna et *al.*, 2000). Elle est extrêmement pauvre en cellules (seulement quelques phagocytes et hyalocytes) et n'est pas vascularisée (Whikehart, 2004). De plus, elle sert de matrice alternative simple à collecter lors des autopsies (Pelander et *al.*, 2010).

L'humeur vitrée (HV) est une substance de consistance gélatineuse située entre la rétine et le cristallin, remplissant 80% de la chambre postérieure de l'œil (Bévalot et *al.*, 2016). Il a été établi que la composition chimique de l'HV est stable et n'est pas significativement affectée par l'autopsie (Coe, 1993 ; Madea, 2005).

I.2.1. Composition générale de l'HV

Le cristallin sépare le compartiment contenant l'HV du compartiment contenant le liquide dans la partie antérieure de l'œil. Ce compartiment postérieur est défini par la sclère, l'épithélium pigmentaire rétinien et la choroïde à l'arrière, et le corps ciliaire et le cristallin à l'avant. L'HV est un tissu très hydraté qui contient entre 98 et 99,7% d'eau (Le Goff et Bishop, 2008). Son volume moyen est de 4 mL. Sa structure gélatineuse résulte de la présence de protéines fibrillaires, principalement des fibres de collagène liées à des glucides de type glycosaminoglycanes, principalement dérivés de l'acide hyaluronique (Le Goff et Bishop, 2008).

De plus, l'HV contient une petite quantité d'autres protéines que le collagène, telles que l'opticine, ainsi que des électrolytes tels que le sodium, le potassium, le chlore, le lactate et l'ascorbate. L'HV contient très peu de cellules et est avasculaire. Les hyalocytes jouent un rôle dans la synthèse des constituants de l'HV ainsi que dans la réponse immunitaire de l'HV, qui est adaptée pour réduire l'inflammation intraoculaire, selon Sonoda et *al.* (2005).

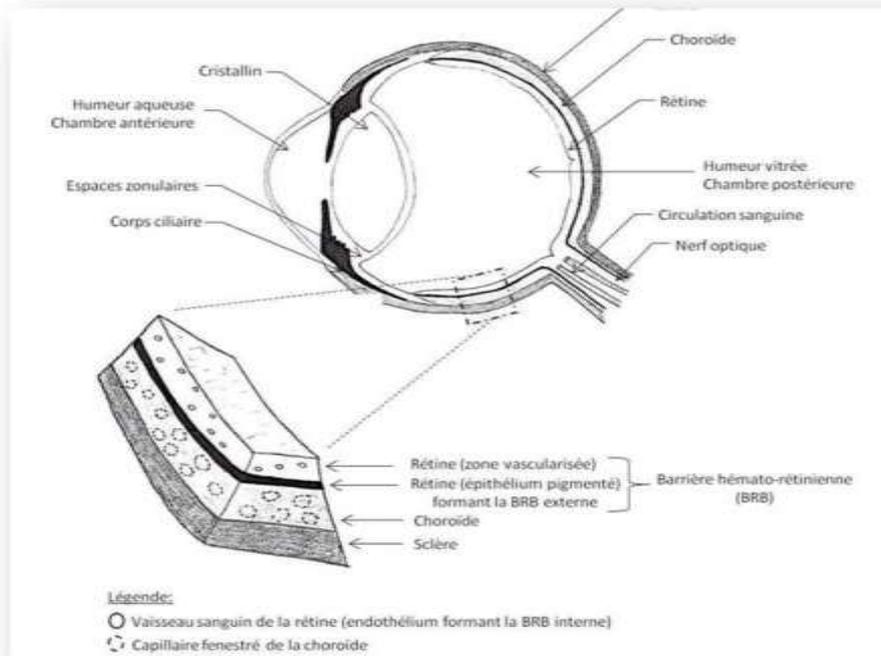


Figure 01: Anatomie de l'œil et de la barrière hémato-rétinienne (Bévalot, 2014).

II. Partie II:Généralité sur l'acide Hyaluronique

II.1. L'acide hyaluronique (AH):

L'acide hyaluronique (AH) est un polysaccharide linéaire naturel présent dans le tissu conjonctif, le liquide synovial et d'autres tissus de la matrice extracellulaire. Il remplit diverses fonctions physiologiques et structurelles, telles que les interactions cellulaires et extracellulaires, les interactions avec d'autres molécules et les interactions avec les facteurs de croissance, le contrôle de la pression osmotique et la lubrification des tissus. Toutes ces activités contribuent à maintenir l'intégrité homéostatique et structurelle des tissus. De nombreuses études sur la fonction physiologique du AH chez l'homme, ainsi que ses propriétés chimiques et physiques, ont démontré son importance en tant que biomatériau utilisé dans des applications esthétiques, médicales et pharmaceutiques (Parveen et *al.*, 2013).

L'acide hyaluronique est une substance naturellement présente dans notre corps et est responsable de l'attraction et de la rétention de l'humidité. On pense qu'il améliore l'interaction entre les cellules et favorise la synthèse de collagène, ce qui peut prévenir l'apparition des rides et améliorer la texture de notre peau (Parveen et *al.*, 2013).

L'acide hyaluronique est synthétisé naturellement par des protéines membranaires intégrales appelées hyaluronane synthases (HAS) et dégradé par des enzymes de la famille des hyaluronidases. Outre son rôle dans les articulations, les médecins utilisent également des injections d'acide hyaluronique pour traiter les rides de la peau en raison de son importance pour la santé du collagène (Parveen et *al.*, 2013).

L'acide hyaluronique est également utilisé dans les crèmes et les lotions pour prendre soin de la peau, car il aide à hydrater la peau et à lutter contre la sécheresse et la perte d'élasticité liées au vieillissement cutané, où les réserves d'acide hyaluronique diminuent. Des études ont montré que l'application topique d'acide hyaluronique accélère la cicatrisation des plaies en protégeant les tissus des dommages causés par les radicaux libres d'oxygène. Les effets bénéfiques de l'acide hyaluronique ont été observés immédiatement après la blessure et également à long terme dans le processus de guérison des plaies. Des études ont rapporté une réduction de 70% de la surface des plaies suite à un traitement à l'acide hyaluronique (Sardijde , 2013).

II.2. Historique:

L'acide hyaluronique a été identifié pour la première fois par des scientifiques de l'Université de Columbia à New York, Meyer et al., John Palmer, en 1934. Ils ont réussi à isoler une molécule à partir du liquide vitré des yeux de vache. En raison de sa consistance semblable au verre et de la présence d'acide uronique, l'une des deux composantes de sucre, ils ont proposé le nom d'acide hyaluronique (AH). Cette découverte a jeté les bases de nombreuses recherches ultérieures sur les propriétés et les utilisations de l'acide hyaluronique (Vedamurthy ,2004).

Plusieurs chercheurs ont contribué à la découverte et à l'étude de l'acide hyaluronique (AH) au fil des années. Voici quelques étapes importantes :

- En 1937, Kendall, Heidelberger et Dawson ont identifié un polysaccharide identique à l'acide hyaluronique dans la capsule de la souche streptococcique hémolytique A.
- Dans les années 1950, Karl Meyer a décrit la composition macromoléculaire de l'acide hyaluronique, sa présence sous forme de sel libre dans le liquide synovial, ainsi que ses caractéristiques physiques et ses fonctions rhéologiques.
- Les premières injections intra-articulaires réussies d'acide hyaluronique ont été réalisées en 1966 sur des chevaux de course souffrant d'arthropathies traumatiques.

- En 1968-1970, l'AH a été utilisé en ophtalmologie comme facteur de viscosupplémentation en complément de la chirurgie de la cataracte pour prévenir le retrait de l'endothélium cornéen.
- En 1972, une partie d'un sel d'acide hyaluronique disodique a été injectée avec succès dans des articulations arthrosiques humaines par Rydell. Cette découverte a été confirmée par Peyron et Balasz en 1974, puis par Weiss en 1981.
- En 1986, l'hyaluronate de sodium a été renommé "hyaluronan" pour se conformer à la nomenclature internationale des polysaccharides.
- Le premier acide hyaluronique a été commercialisé en 1995. Il est apparu sur le marché de l'esthétique dans les années 1990 (alors que le collagène bovin américain était commercialisé depuis 1981).

Ces étapes ont contribué à l'avancement des connaissances sur l'acide hyaluronique et à son utilisation dans différents domaines, tels que la médecine, l'ophtalmologie et l'esthétique (Montélimar, 2006) .

II.3. La structure de l'acide Hyaluronique:

Le polymère linéaire de glycosaminoglycane (GAG) appelé hyaluronane est formé par des unités répétées de 1,3-N-acétylglucosamine et d'acide 1,4-D-glucuronique. La structure de l'hyaluronane est représentée dans la figure suivante (Figure 2).

Les hydroxyles, le groupe carboxylate et la conformation des deux sucres dans l'acide hyaluronique jouent un rôle important dans sa structure et ses propriétés. Le carbone anomérique de l'acide glucuronique est positionné de manière avantageuse à des positions équatoriales par rapport au sucre voisin, ce qui contribue à la stabilité énergétique de la molécule. En revanche, tous les atomes d'hydrogène sont situés dans des emplacements axiaux moins favorables sur la molécule (Diane Rigo et *al.*,2023).

En raison de la nature anionique de l'acide hyaluronique, sa structure devient extrêmement stable sur le plan énergétique. De plus, l'acide hyaluronique est hautement hydrophile, ce qui signifie qu'il a une forte affinité pour l'eau (Abdallah et *al.*,2020). Gallo et *al.* (2019) ont déclaré que l'acide hyaluronique est le seul glycosaminoglycane (GAG) lié aux protéines qui n'est pas sulfaté. Comparé aux autres GAG qui sont généralement plus petits, l'acide

hyaluronique se compose généralement de 100 à 20 000 unités répétitives et a un poids moléculaire compris entre 105 et 108 Daltons (Gallo et *al.*,2019).

Le poids moléculaire de l'acide hyaluronique peut varier en fonction de sa source. Par exemple, l'acide hyaluronique d'origine animale a généralement des poids moléculaires élevés allant jusqu'à 20 000 kDa. En revanche, l'acide hyaluronique d'origine bactérienne a généralement des poids moléculaires compris entre 1000 et 4000 kDa (Abdallah et *al.*,2020).

Les unités disaccharidiques sont ensuite reliées par des liaisons $\beta(1-4)$ glucosamine, formant ainsi une chaîne d'acide hyaluronique composée de plus de 25 000 unités di saccharidiques. Cette chaîne peut varier en longueur et en poids moléculaire, et l'acide hyaluronique peut être de taille variable (Laura ,2020).

L'acide hyaluronique possède une structure complexe avec à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Cette structure lui confère la capacité de moduler les propriétés physico-chimiques de son environnement. En fonction des conditions, il peut exister sous forme d'acide hyaluronique (forme acide) ou sous forme d'hyaluronate de sodium (forme saline) (Laura ,2020).

En effet, l'acide hyaluronique adopte une conformation hélicoïdale à l'état solide. Cette conformation est due aux liaisons hydrogène qui se forment entre les sucres adjacents de la chaîne. De plus, la répulsion mutuelle des résidus carboxyle contribue également à stabiliser cette structure hélicoïdale (Laura ,2020). AH est hautement hydrophile et peut absorber et retenir une grande quantité d'eau, contribuant ainsi à son aspect gélatineux et à ses propriétés hydratantes (Laura ,2020).

Il convient de noter que les propriétés et la conformation de l'acide hyaluronique peuvent varier en fonction des conditions physico-chimiques du milieu dans lequel il se trouve, telles que le pH, la concentration en sel et les cations présents. Ces facteurs peuvent influencer la conformation de la chaîne et donc les propriétés de l'acide hyaluronique (Laura ,2020).

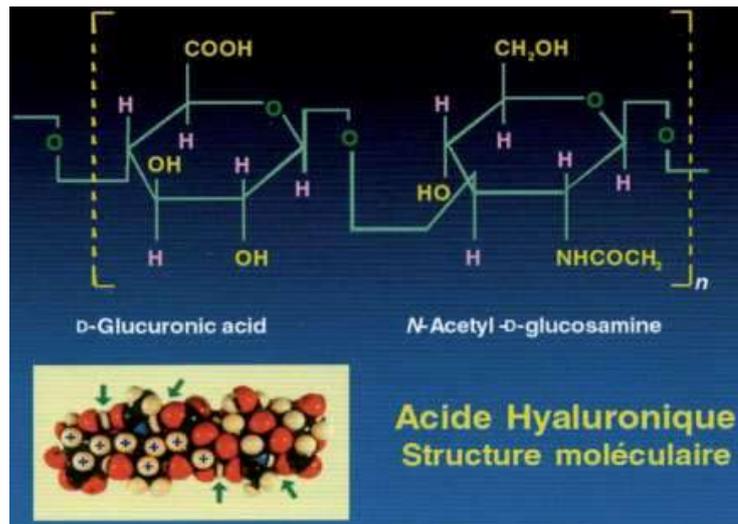


Figure 2: Unité di saccharidique, constituant de base de l'acide hyaluronique (Maheu, 2020).

II.4. Propriétés physico chimique de l'acide Hyaluronique:

En raison de ses caractéristiques rhéologiques et structurales uniques, l'acide hyaluronique (AH) joue un rôle crucial dans notre corps. Les structures supramoléculaires de l'AH contrôlent la forme et l'organisation structurale des tissus, en particulier en relation avec le réseau de fibres de collagène. Il confère aux tissus des propriétés mécaniques, telles que l'amortissement des cartilages et l'élasticité des vaisseaux sanguins. De plus, il participe au maintien de l'intégrité et de l'hydratation de plusieurs tissus, notamment la peau et le cerveau (Asari et *al.*,2000).

II.4.1. Masse moléculaire:

La masse moléculaire de l'acide hyaluronique peut varier en fonction de son origine et de ses conditions de production. Les polymères d'AH peuvent avoir une taille de 102 à 104 kilo daltons (kDa) in vivo, et la longueur des chaînes peut varier de 2000 à 50000 dimères. La masse moléculaire moyenne de l'acide hyaluronique peut différer selon la source à partir de laquelle il est extrait. Voici un tableau présentant la masse molaire moyenne de l'acide hyaluronique en fonction de son origine, selon les travaux de Laurent et Balazs en 1970.

Veillez noter que les valeurs exactes de la masse molaire peuvent varier en fonction de différentes études et des méthodes de mesure utilisées.

Tableau 1: Masse molaire moyenne de l'acide hyaluronique en fonction de son origine, d'après Laurent et Balazs, (1970)

Origine de l'acide hyaluronique		Masse molaire (g.mol ⁻¹)
Crêtes de coq		1,2*10 ⁶
Liquide synovial bovin		14*10 ⁶
Humeur vitrée bovine		7,7*10 ⁴ à 1,7*10 ⁶
Liquide synovial	Sain	6*10 ⁶
	dégénéré	2,7*10 ⁶
Cordon ombilical humain		3,4*10 ⁶

II.4.2. Solubilité et viscosité:

En effet, l'acide hyaluronique (AH) est un polyélectrolyte soluble dans l'eau. À faible concentration, les interactions électrostatiques entre les fonctions carboxylates entraînent l'expansion des pelotes macromoléculaires, ce qui augmente la viscosité de la solution. Cela lui confère sa capacité à former des gels visqueux élastiques et à augmenter la viscosité des solutions aqueuses (Price et *al.*,2007).

L'AH est un composant clé de l'hydratation dermique en raison de sa capacité à attirer et à retenir l'eau. Il peut fixer jusqu'à 1000 fois son poids en eau, ce qui contribue à maintenir l'hydratation de la peau. La longueur des chaînes, les modifications chimiques, les variations de pH et d'autres facteurs peuvent influencer les propriétés viscoélastiques des gels d'AH (Price et *al.*,2007).

Le pH acide provoque la protonation des groupes acétamides de l'AH, ce qui génère des forces de répulsion électrostatiques. La forme précise de l'AH en solution aqueuse n'est pas entièrement connue. La stabilité de sa chaîne diminue avec l'augmentation de la température, ce qui peut entraîner la rupture des liaisons hydrogène. La valeur du pKa de l'AH est d'environ 2,9, ce qui indique un faible degré de dissociation du groupe acide carboxylique. Cela favorise la formation de liaisons hydrogène et d'interactions moléculaires.

II.4.3. Etudes en phase solide:

Les études en phase solide ont permis de mieux comprendre la structure de l'acide hyaluronique (AH). La diffraction des rayons X a révélé que ce polysaccharide adopte une structure hélicoïdale, qui est stabilisée par des liaisons hydrogène (Winter et *al.*,1975) ont

démontré que les différentes conformations hélicoïdales dépendent des contre ions présents, tels que H⁺, Na⁺, K⁺ et Ca²⁺. Ces conformations sont maintenues par des liaisons hydrogène et des zones flexibles de désorganisation. Ces études ont contribué à une meilleure compréhension de la structure tridimensionnelle de l'AH à l'état solide (Price et *al.*,2007).

II.4.4. Sensibilité aux agents physiques, chimiques et enzymatiques:

L'acide hyaluronique (AH) peut subir une dégradation polymérique causée par différentes influences, telles que les rayons UV, les rayons gamma, les ultrasons, l'action enzymatique de la hyaluronidase et la dépolymérisation redox par le peroxyde d'hydrogène et/ou l'ascorbate(Liu et *al.*, 2008 ; Tokita and Okamoto, 1995). Parmi les propriétés physiques les plus importantes de l'AH, on trouve sa distribution de poids moléculaire, son poids moléculaire moyen et sa viscosité intrinsèque. Lors du contrôle de qualité du produit, ces deux premières caractéristiques sont généralement examinées de manière approfondie. Elles jouent un rôle clé dans la détermination de la qualité et de la performance de l'AH (Price et *al.*,2007).

II.4.5. Propriétés anti-radicalaires et anti-oxydantes:

La nature hautement ionisée de l'acide hyaluronique lui permet d'agir comme un antioxydant et comme un agent protecteur. Il absorbe les électrons libérés par les radicaux libres pour les éliminer, mais ce faisant, il se dégrade progressivement par dépolymérisation. La disparition progressive de l'acide hyaluronique entraîne une diminution de l'élasticité de la peau L'étude de l'acide hyaluronique (AH) en solution et de ses interactions a suscité un intérêt important en raison de son importance biologique. Les premières études dans les années 1940 ont porté sur les dimensions et la forme des chaînes d'AH, en utilisant la biréfringence de et de la viscosité du liquide synovial, qui comprennent tous deux des quantités importantes d'acide hyaluronique (Kogan et *al.*,2007).

II.5. Caractères macromoléculaires:

l'humeur vitrée. Il a été observé que les chaînes d'AH présentaient une longueur de particule importante et une distribution poly dispersée. Dans les années 1950, Ogston et Stainer ont proposé que l'AH en solution se comportait hydro dynamiquement comme une grande sphère solvatée qui contenait environ 1 000 fois plus d'eau que de matière organique. Malgré de nombreuses recherches au cours des 60 dernières années, il reste encore des débats sur la structure et les

interactions de l'AH en solution, en raison de la simplicité de sa structure répétitive en disaccharide (Ogston et *al.*,1950).

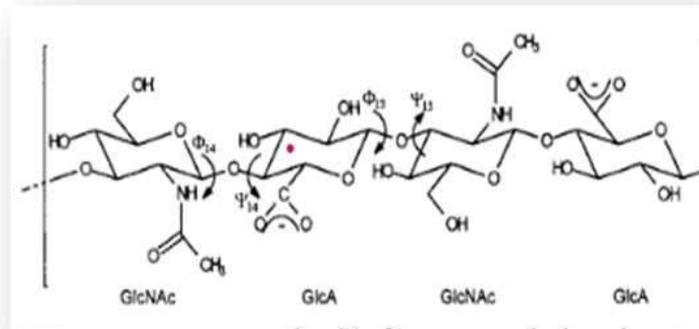


Figure 3: Un tétrasaccharide d'une chaîne AH (Lubomír et *al.*,1998).

II.5.1. Propriétés des polyélectrolytes:

Dans les années 1950, Balazs et Laurent ont proposé un modèle de viscosité caractéristique pour les polyélectrolytes, dont l'acide hyaluronique (AH). Les charges présentes sur les résidus carboxyliques de l'acide D-glucuronique de l'AH sont espacées d'environ 1 nm une fois qu'elles sont complètement ionisées. Ces charges influencent la géométrie des chaînes d'AH et leurs interactions avec les molécules voisines, et leur configuration est affectée par le pH et la force ionique de l'environnement. En 1957, Laurent a étudié la diffusion statique de la lumière et la viscosité de l'hyaluronate de sodium en solution aqueuse et de l'hyaluronate de cétypyridinium dans le méthanol. Il a observé que le rayon de giration des chaînes d'AH variait (200 nm dans la première solution et 120 nm dans la seconde), suggérant un changement de conformation lorsque les charges étaient neutralisées. Cleland, en 1968, a confirmé que les chaînes d'AH se resserraient avec une diminution du pH et une augmentation de la force ionique, ce qui démontrait la nature polyélectrolytique de ces molécules. Des études plus récentes, menées par Fouissac et *al.* et Hayashi et *al.*, (2016) ont examiné l'effet de la concentration ionique sur le rayon de giration et la longueur de persistance de l'AH avec différents poids moléculaires. Ces études ont montré que l'expansion électrostatique des chaînes d'AH pouvait être décrite par le modèle d'Odijk, supposant une conformation de chaîne vermiforme. Cependant, Hayashi et *al.*, (2016) ont noté que la contribution électrostatique à la longueur de persistance à faible concentration ionique était différente de celle prédite par le modèle (d'Odijk, 1970).

II.5.2. Conformation:

Il n'est pas surprenant que plusieurs études aient été menées pour mieux comprendre l'organisation tridimensionnelle de l'acide hyaluronique (AH), le composant clé de la matrice extracellulaire. Depuis 1958, les premières images de diffraction des rayons X ont été publiées. Les études sur le hyaluronate de sodium ont démontré que les poudres produites par précipitation et séchage à l'éthanol ont un caractère semi-cristallin (Bettelheim, 1958). À partir de 1972, la structure cristalline du hyaluronate de sodium a été étudiée par Atkins et Sheehan. Winter et al., ont montré que ce polysaccharide possède une conformation en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène. Une conformation en double hélice antiparallèle a été mise en évidence par diffraction des rayons X pour des films de AH à pH 2,5 (Harada, 1997). Jusqu'à présent, il n'a pas été possible d'observer de transition conformationnelle hélice-pelote pour les solutions de AH provenant de crête de coq, malgré des modifications du pouvoir rotatoire spécifique et du dichroïsme circulaire (Harada, 1996). Cette transition pourrait être liée à la présence de protéines dans le AH d'origine animale. Selon Scott et ses collaborateurs, une conformation stabilisée est obtenue grâce à un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires impliquant les groupes carboxylique, acétamido et hydroxyle (Hashidzume et al., 2006).

Le RMN ^1H et ^{13}C a été utilisé pour tenter de déterminer la configuration de l'acide hyaluronique (AH) en solution aqueuse. Cependant, l'utilisation de l'eau comme solvant ne permet pas une observation facile des groupes NH et OH impliqués directement dans les liaisons hydrogènes. Par conséquent, de nombreuses études ont été réalisées dans le DMSO deutérié. En 1984, Scott et al. ont identifié quatre liaisons hydrogène par unité de saccharidique (Pozuelo, 1997). Selon les recherches de Cowman et al., l'ajout d'eau à une solution de AH dans le DMSO modifie l'équilibre des liaisons hydrogènes. La liaison hydrogène directe serait remplacée par une molécule d'eau qui crée un pont entre le NH et le COO⁻ (Zhang et al., 1998).

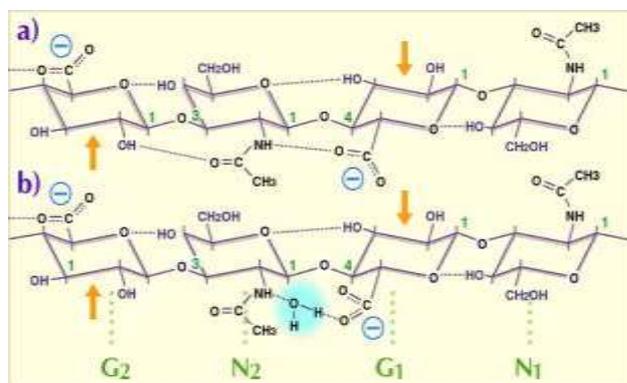


Figure 4: Structure secondaire du AH dans du DMSO avec et sans présence d'eau (Zhang et al., 1998)

Les liaisons hydrogène intramoléculaires périodiques, telles que l'hélice 21, sont maintenues stables par deux liaisons spécifiques. La première implique le NH du groupe acétamido et le groupe carboxylate via la liaison (14), tandis que la deuxième implique l'oxygène O5 du cycle et l'alcool C4-O4 H via la liaison (13) (Figure 4 (a)). Des études supplémentaires ont été menées en utilisant la spectroscopie infrarouge pour localiser les ponts hydrogène intra- et interchaînes et observer l'insertion des molécules d'eau (Figure 4 (b)). La spectroscopie infrarouge a également permis de mettre en évidence le mécanisme d'hydratation et les changements de conformation induits dans la chaîne lors de l'hydratation. Dans une étude menée par Almond *et al.*, 1997 la configuration des oligosaccharides en solution a été explorée à l'aide de la dynamique moléculaire. Les résultats ont montré une réorganisation rapide des liaisons hydrogène intramoléculaires, avec un échange de molécules d'eau (Kjoniksen , 2005; Charlot *et al.*, 2007). Le modèle microscopique le plus couramment accepté pour l'acide hyaluronique en solution est celui d'une hélice 21 stabilisée par un réseau dynamique de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les résidus adjacents Cette structure semi-rigide a été observée dans les simulations de dynamique moléculaire réalisées par Almond *et al.* 2000.

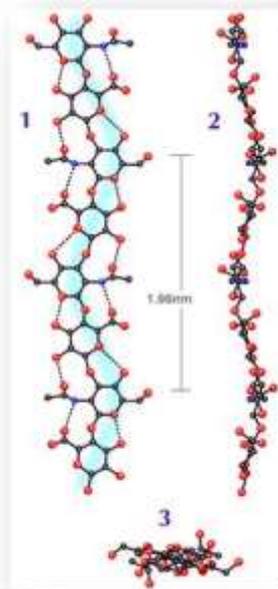


Figure5: Plan (1) et élévation (2) de projections dessinées par ordinateur de la molécule d'hyaluronane en forme de bande. (3) est la vue vue le long de l'axe de l'hélice à deux plis. (Scott ,1989).

II.6. Rôles fonctionnelles du AH dans l'organisme vivant:

Dans l'organisme humain, les régions les plus abondantes en acide hyaluronique sont l'épiderme, le liquide synovial, le cordon ombilical et le gel vitreux de l'œil. L'acide hyaluronique possède une structure moléculaire de poids élevé qui lui confère des propriétés structurales particulières. Il agit comme un agent de liaison en se liant aux fibres de la membrane extracellulaire de différents tissus. (Rousselle et *al.*, 2019).

Grâce à sa structure hélicoïdale et à ses charges négatives, l'acide hyaluronique présente des propriétés hydrophiles et viscoélastiques qui contribuent à l'hydratation de la matrice extracellulaire (MEC) et des tissus. Un seul gramme d'AH peut retenir jusqu'à six litres d'eau. Les molécules d'eau en contact avec l'AH peuvent former des liaisons hydrogène avec d'autres molécules d'eau, créant ainsi un gel hydrophile volumineux. De plus, l'AH agit comme un amortisseur et un lubrifiant grâce à ses propriétés visqueuses et flexibles (Rousselle et *al.*, 2019).

II.6.1. Dans la réponse inflammatoire:

L'acide hyaluronique possède des propriétés régulatrices qui dépendent de la taille de la molécule (Miyoshi et *al.*, 1988). Les oligomères de faible poids moléculaire de l'AH déclenchent des effets pro-inflammatoires qui contribuent à la régulation de la réponse immunitaire. Ces oligomères sont produits par la fragmentation de l'AH lors d'épisodes inflammatoires ou de traumatismes par des hyaluronidases (Balazs et Laurent, 1986 ; Balazs, 1979). Ils agissent comme de puissants stimulateurs de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et ont un effet immunostimulant et antigénique. De plus, ils agissent comme des médiateurs pro-inflammatoires en activant les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, en stimulant le récepteur Toll-like 4 (TLR4), en activant le facteur nucléaire NF-kappa B en synergie avec l'interféron α (IFN) et en entraînant la synthèse d'IL-8 et d'IL-10 (Miyoshi et *al.*, 1988).

Les oligomères de l'AH stimulent également l'angiogenèse en favorisant la prolifération des cellules endothéliales en synergie avec le facteur de croissance des fibroblastes (FCF) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (FCEV) (Balazs et Laurent, 1986). Cette action pro-inflammatoire des oligomères de l'AH favorise les processus de cicatrisation des plaies. Contrairement aux oligomères, les macromolécules d'AH ont des effets anti-inflammatoires (Balazs et Laurent, 1986 ; Balazs, 1979). L'AH de haut poids moléculaire produit des effets immunosuppresseurs et anti-antigéniques. Ils inhibent l'activation du facteur nucléaire NF-

kappa B. En effet, les macromolécules de l'AH masquent les récepteurs membranaires des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire, empêchant ainsi leur activation et contribuant ainsi à l'action anti-inflammatoire (Balazs et Laurent , 1986 ; Balazs , 1979).

Au cours de la stimulation inflammatoire, telle que dans les lésions tissulaires, on observe une dégradation de l'acide hyaluronique (AH) de haut poids moléculaire en AH de bas poids moléculaire. Cette dégradation est causée par les espèces réactives de l'oxygène et les enzymes protéolytiques telles que les hyaluronidases, chondroïtinases et hexosaminidases. Ces enzymes provoquent une réaction inflammatoire en se liant aux récepteurs CD44 et TLR. Cette liaison conduit à la synthèse et à l'activation de la protéine NF-kB, qui à son tour stimule la production de plusieurs molécules inflammatoires telles que les cytokines TNF-alpha et IL-6. Ces molécules sont responsables de l'activation de la synthèse de l'AH de poids moléculaire élevé, ce qui maintient l'inflammation initiale (Laura ,2020).

Les fragments d'AH de poids moléculaire élevé déplacent alors les fragments plus petits de l'AH. Ces fragments sont éliminés par les récepteurs TLR4 et CD44. Dans le même temps, l'AH de haut poids moléculaire inhibe la protéine PKC, ce qui contribue à la résolution de l'inflammation, à la réparation tissulaire et au retour à l'état de quiescence (Laura ,2020).

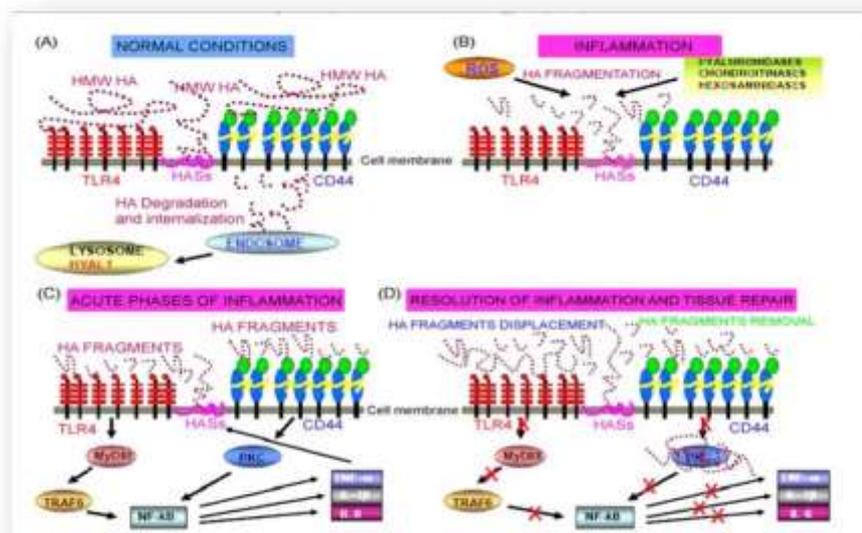


Figure 6: Rôle de l'AH lors de la réaction inflammatoire (Campo et al., 2010).

II.6.2. Rôle dans l'initiation de la réponse à une lésion tissulaire

En conditions physiologiques, l'acide hyaluronique (AH) se présente sous la forme d'un polymère de poids moléculaire élevé dépassant les 10^6 Da. Cependant, en cas de blessure, des fragments d'AH de masse moléculaire plus faible s'accumulent. Des études in vitro ont suggéré que la génération de ces fragments peut avoir une influence. Par exemple, des oligomères contenant 8 à 16 disaccharides obtenus par digestion enzymatique de l'AH natif favorisent l'angiogenèse, tandis que l'AH de haut poids moléculaire ne le fait pas (Mathieu , 2011).

La fragmentation du hyaluronane in vivo pourrait résulter de l'expression régulée des hyaluronidases ou de processus d'oxydation. Cette fragmentation est requise pour l'acquisition de la fonctionnalité de signalisation de l'AH. La génération d'AH fragmenté dans des conditions de blessures tissulaires peut servir la fonction de signalisation dans l'organisme où l'homéostasie normale a été perturbée (Noble, 2002).

II.6.3. Rôles dans la cicatrisation:

L'acide hyaluronique présente une excellente capacité à retenir l'eau, ce qui permet une hydratation des tissus et préserve l'humidité cutanée. Il est abondant dans les peaux juvéniles. En plus de cette remarquable propriété hygroscopique, l'acide hyaluronique participe également aux processus de guérison (Mathieu , 2011).

II.6.4. Régénération de la matrice extracellulaire:

La synthèse de collagène par les cellules fibroblastiques joue un rôle crucial dans la régénération de la matrice cutanée lors du processus de cicatrisation. La qualité de la cicatrice dépend de la nature de cette synthèse. Dans des études expérimentales, l'administration d'acide hyaluronique à longue chaîne a été constatée pour stimuler la prolifération des fibroblastes, tout en réduisant la production totale de collagène cicatriciel par les fibroblastes de la peau adulte (Croce et *al.*,2001).

L'utilisation de l'acide hyaluronique favorise la restructuration de la matrice extracellulaire et régule le dépôt de collagène. De manière surprenante, l'hyaluronidase, qui libère de nombreux fragments d'acide hyaluronique, favorise la guérison, tandis que des niveaux élevés persistants d'acide hyaluronique réduisent la contraction des fibroblastes. (West et *al.*, 1991).

La production d'acide hyaluronique par les fibroblastes peut être influencée par de nombreux facteurs de croissance, et les produits de dégradation sont bénéfiques pour l'angiogenèse (West et *al.*, 1991).

II.6.5. Régénération épithéliale:

L'utilisation topique de l'acide hyaluronique améliore la prolifération des cellules de la couche superficielle de la peau, que ce soit dans des conditions expérimentales ou dans un organisme vivant. L'acide hyaluronique agit en favorisant la circulation des cellules de la cornée, en agissant de manière synergique avec la fibronectine ou le facteur de croissance endothélial (Mathieu , 2011).

De plus, l'acide hyaluronique joue un rôle protecteur pour l'épiderme en capturant les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène produits par les rayons ultraviolets (Mathieu , 2011)

II.6.6. Rôle dans l'angiogénèse:

Que ce soit pendant le développement embryonnaire ou la réparation des tissus chez l'adulte, l'angiogénèse joue un rôle crucial dans la création de nouveaux tissus en permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants ou de précurseurs d'endothélium circulant. Pour répondre aux besoins nutritionnels et d'hydratation des tissus, de nouveaux vaisseaux doivent être formés. L'acide hyaluronique (AH) de haut poids moléculaire présent dans la matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle important dans l'angiogénèse physiologique en interagissant avec le récepteur CD44 situé au niveau des cellules endothéliales. Cette liaison empêche les cellules endothéliales d'activer leurs voies de signalisation, les maintenant inactives et incapables d'interagir (Laura ,2020).

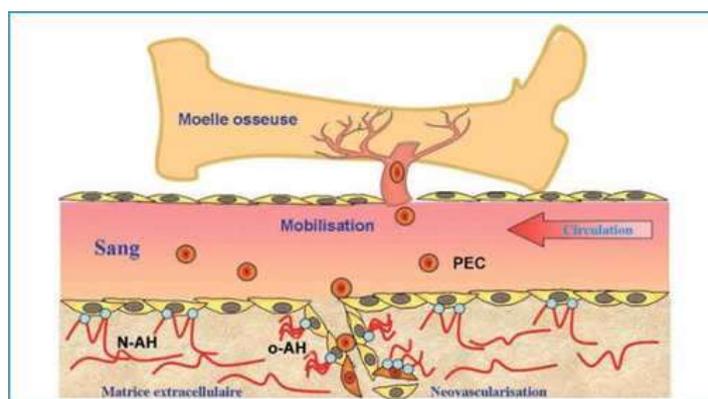


Figure 7: L'angiogénèse du tissu tumoral (Lataillade et *al.*,2010).

Cela maintient la malignité des tumeurs en leur permettant de rester peu différenciées tout en se développant dans un environnement propice à leur prolifération et leur croissance. De

plus, cet acide hyaluronique de haut poids moléculaire peut se dégrader en un acide hyaluronique de bas poids moléculaire, qui favorise l'angiogenèse et conduit à la formation de vaisseaux sanguins, permettant la migration des cellules tumorales. Les molécules d'acide hyaluronique de bas poids moléculaire ont également un rôle dans l'angiogenèse pathologique en participant à l'angiogenèse intraplaque. Elles contribuent non seulement à la prolifération cellulaire mais aussi à l'inflammation des plaques (Laura ,2020).

II.6.7. Rôle dans le cartilage:

Les chondrocytes, qui sont les cellules constitutives du cartilage articulaire, sont le seul type de cellules présentes dans ce tissu conjonctif. Ils produisent une matrice extracellulaire (MEC) dense, principalement composée de collagène, d'acide hyaluronique (AH) et de protéoglycanes. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans les propriétés élastiques et résistantes de ce tissu. De plus, elles favorisent les interactions avec des substances actives telles que les cytokines et les facteurs de croissance. Cependant, dans des conditions d'hypoxie et de vascularisation insuffisante, les chondrocytes présentent une capacité métabolique limitée (Mathieu,2011).

Dans des conditions physiopathologiques telles que l'arthrose, il se produit une dégradation irréversible des composants de la matrice (Magdalou et *al.*, 2008). L'acide hyaluronique de haut poids moléculaire est abondant dans le liquide synovial, contribuant à la lubrification des articulations grâce à sa capacité à retenir l'eau, ainsi qu'à l'absorption efficace des chocs grâce à ses propriétés mécaniques.

La présence d'un groupe hydrazido permet le couplage avec des médicaments et/ou la réticulation. Les hyaluronates de palmitoyl ont été utilisés pour créer des liposomes enrobés de polysaccharides pour l'administration de médicaments. Cette méthode permet de prévenir la destruction des liposomes par la phospholipase. Il a été constaté que la conformation finale des liposomes était influencée par la longueur des chaînes d'AH déposées à leur surface. Les palmitoylhyaluronates ont démontré une meilleure activité d'émulsification dans les mélanges eau-huile lorsque la masse molaire des chaînes d'AH diminuait (Mathieu ,2011).

II.6.8. Pathologies pulmonaires:

L'AH améliore l'environnement des cils dans les poumons en permettant une transition en douceur entre une viscosité élevée et une viscosité basse, tout en maintenant la perméabilité des alvéoles pulmonaires. Chez les nourrissons prématurés souffrant de maladies respiratoires,

l'administration de corticostéroïdes peut réduire les niveaux élevés d'AH afin de diminuer la prévalence du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né (Price *et al.*, 2007).

Dans les maladies pulmonaires, les niveaux d'AH augmentent et l'œdème pulmonaire peut être réduit par l'administration d'hyaluronidase ou de corticostéroïdes, qui n'ont aucun effet sur la fibrose ultérieure. Cependant, il est important de noter que ces traitements n'ont pas d'effet sur la fibrose pulmonaire (Price *et al.*, 2007).

Dans les maladies chroniques inflammatoires des voies respiratoires, la surproduction de liquide visqueux peut être due à la fragmentation de l'acide hyaluronique par des molécules réactives de l'oxygène. L'interaction entre l'AH et les récepteurs CD44 active une protéine qui clive les précurseurs des facteurs de croissance épidermiques (FCE) en facteurs actifs. Il semble que des niveaux élevés d'AH soient suffisants pour provoquer l'interaction CD44/ RFCE, entraînant ainsi une surproduction de liquide visqueux (Yu *et al.*, 2011).

II.7. Synthèse:

L'acide hyaluronique est présent dans de nombreux tissus du corps humain, notamment l'épithélium, le tissu conjonctif, les tissus nerveux, le vitré et le liquide oculaire, la synovie et la peau. Il est également l'un des composants majeurs de la matrice extracellulaire. Les concentrations d'acide hyaluronique varient selon les régions du corps. Il circule librement, adhère aux tissus et s'intègre à la matrice extracellulaire, contribuant ainsi au maintien de la structure environnante (Laura ,2020).

Dans la peau, plus de 50% de l'acide hyaluronique du corps humain se trouve, mais avec le vieillissement de la peau, une grande partie de l'AH est perdue dans l'épiderme, ce qui entraîne principalement l'apparition de rides sur le visage humain.

La structure de l'acide hyaluronique reste la même tout au long de l'évolution, des bactéries telles que *Pseudomonas* aux mammifères tels que les rats, les lapins et les humains. Sa présence ubiquitaire dans l'organisme explique son excellente tolérance. En raison de sa biocompatibilité et de son faible risque d'allergies, cette molécule est largement utilisée dans les traitements médicaux (Ke *et al.*, 2008).

II.7.1. Source intrinsèque:

De nombreuses cellules, telles que les cellules épithéliales, mésenchymateuses, immunitaires, ainsi que les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques,

contribuent à la production intrinsèque de l'acide hyaluronique (AH). Au niveau de la peau, les fibroblastes du derme sont les principaux producteurs, tandis que les cellules épidermiques en synthétisent également en plus faible quantité.

L'acide hyaluronique est une molécule entièrement composée de saccharides et ne contient aucune partie protéique. Sa synthèse est donc unique. La production de glycosaminoglycanes se produit généralement dans l'appareil de Golgi, tandis que la polymérisation de l'acide hyaluronique a lieu à l'intérieur de la membrane plasmique de la cellule. Ce processus est réalisé par un ensemble spécialisé de protéines membranaires appelées Hyaluronate Synthetases (HAS) (Laura ,2020).

Il existe trois iso-enzymes de ces protéines enzymatiques chez les mammifères : HAS-1, HAS-2 et HAS-3. Chacune de ces iso-enzymes présente des différences en termes de comportement, de stade de développement, d'activité spécialisée et de taille de l'acide hyaluronique polymérisé qu'elle produit (Laura ,2020).

La HAS-1, bien qu'elle soit la moins fonctionnelle, synthétise de l'acide hyaluronique de manière physiologique, bien que son taux de synthèse soit plus lent. La HAS-2 joue un rôle plus important dans le développement embryonnaire et est également impliquée dans la réponse à des situations de stress telles que les hémorragies, les plaies ou les brûlures, contribuant ainsi au processus de cicatrisation. La HAS-3 est considérée comme la plus performante dans la synthèse de l'acide hyaluronique (Laura ,2020).

Les HAS-1 et HAS-2 produisent des chaînes longues d'acide hyaluronique, qui servent de composants structuraux de la matrice extracellulaire. En revanche, la HAS-3 produit des fragments plus courts qui interviennent au niveau péri-cellulaire. Les HAS combinent séquentiellement un acide glucuronique et une unité nicotinamide à l'extrémité N-terminale pour produire le polymère d'acide hyaluronique. Ce polymère traverse ensuite la membrane plasmique pour être libéré dans l'espace extracellulaire (Laura ,2020).

Cette méthode de synthèse permet d'aligner indéfiniment le polymère d'acide hyaluronique. Étant donné que l'acide hyaluronique a une masse moléculaire élevée, sa synthèse dans l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique aurait entraîné la destruction de la cellule (Laura ,2020).

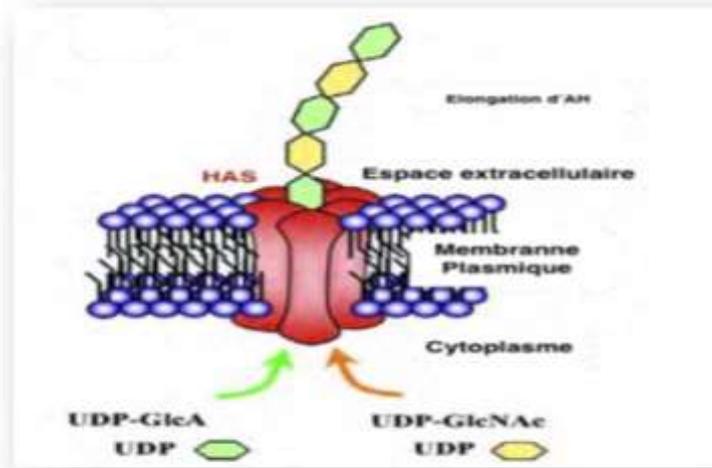


Figure8: Biosynthèse de l'AH au travers de la membrane plasmique (Dicker et *al.*,2014).

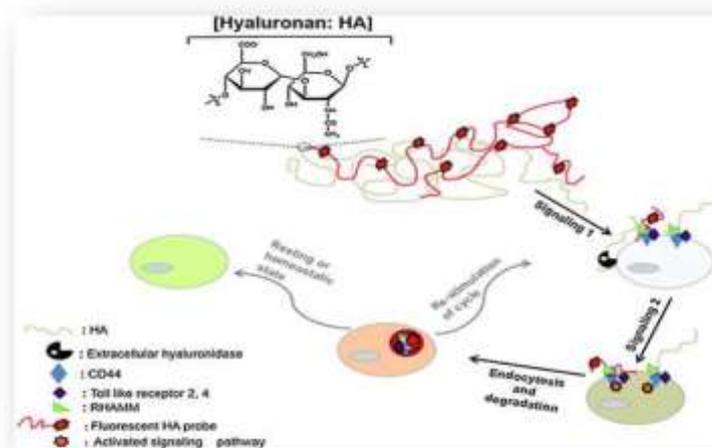


Figure 9: Représentation schématique du cycle métabolique de l'AH induit par la blessure dans les plaies (Veisheh et Turley, 2011).

II.7.2. Source extrinsèque:

En thérapie, il existe deux méthodes principales pour obtenir de l'acide hyaluronique (AH) : la fermentation bactérienne et l'extraction à partir de peignes de poulet.

La fermentation bactérienne utilise des souches de bactéries streptococciques pour produire de l'acide hyaluronique. Cette méthode permet d'obtenir des poids moléculaires d'acide hyaluronique compris entre 0,6 et 2,4 millions de daltons (MDa) (Richette,2016) .

L'extraction à partir de peignes de poulet est une autre méthode utilisée pour obtenir de l'acide hyaluronique. Cette méthode permet d'obtenir des poids moléculaires plus élevés, généralement de 2 à 6 MDa, ce qui est proche du poids moléculaire normal du liquide synovial (Richette,2016).

Dans certains cas, il est possible de réticuler plusieurs chaînes d'acide hyaluronique de poids moléculaire intermédiaire pour obtenir un poids moléculaire plus élevé, d'environ 6 MDa. Cette réticulation transforme l'acide hyaluronique en un gel, qui présente une viscosité plus élevée par rapport à l'acide hyaluronique non réticulé. Ce gel réticulé a une demi-vie légèrement plus longue dans les articulations, ce qui peut être bénéfique dans certaines applications thérapeutiques (Richette,2016).

Il est important de noter que plus le poids moléculaire de l'acide hyaluronique est élevé (El maghraoui,2009), plus la viscosité du gel obtenu est importante. La viscosité du gel d'acide hyaluronique peut jouer un rôle dans ses propriétés physiques et son efficacité thérapeutique, notamment lorsqu'il est utilisé comme agent de comblement dans le domaine de la médecine esthétique ou comme lubrifiant dans le traitement de l'arthrose.

II.8 .Catabolisme de l'acide hyaluronique intrinsèque:

En effet, l'acide hyaluronique se décompose rapidement dans le corps. Sa demi-vie est courte, de l'ordre de 3 à 5 minutes dans la circulation sanguine, environ 1 jour dans la peau et de 1 à 3 semaines dans les tissus tels que le cartilage (Laura ,2020).

La dégradation de l'acide hyaluronique se produit principalement par l'action d'enzymes appelées hyaluronidases. Il existe six hyaluronidases différentes identifiées jusqu'à présent. Voici quelques exemples :

- L'HYAL-1 est présente dans la plupart des tissus et elle est responsable de la dégradation de l'acide hyaluronique intracellulaire, le coupant en petits fragments de 2 à 10 disaccharides.
- L'HYAL-2 est également présente dans de nombreux tissus et elle dégrade l'acide hyaluronique présent dans la matrice extracellulaire.
- Le rôle de l'HYAL-3 n'est pas encore bien défini.

Il convient de noter que l'HYAL-2 commence par découper l'acide hyaluronique de poids moléculaire élevé en fragments de taille intermédiaire, d'environ 20 kDa et 50 disaccharides.

Son expression se limite aux lysosomes et son activité est optimale à un pH de 4. L'HYAL-1 est l'enzyme finale de ce processus de dégradation (Laura ,2020).

Environ 85 % de l'acide hyaluronique est excrété par les ganglions lymphatiques régionaux, où il est dégradé localement. Les 15 % restants passent dans la circulation sanguine et sont éliminés principalement par le foie et les reins. Ainsi, environ un tiers de la quantité totale d'acide hyaluronique est renouvelé chaque jour.

Cette dégradation de l'acide hyaluronique dans les tissus et sa courte demi-vie contribuent à maintenir son homéostasie dans le corps et permettent une régulation dynamique de sa présence et de ses fonctions.

En effet, la dégradation de l'acide hyaluronique se produit par une succession de réactions enzymatiques qui clivent le biopolymère en monosaccharides. Ce processus génère des polymères de taille décroissante qui exercent des fonctions biologiques variées et souvent opposées (Laura ,2020).

Le renouvellement rapide de l'acide hyaluronique est en partie dû à son drainage des tissus vers les vaisseaux lymphatiques. Environ 85 % de l'acide hyaluronique est décomposé au niveau des ganglions lymphatiques régionaux. Les 15 % restants qui atteignent la circulation sanguine sont rapidement éliminés, avec une demi-vie de 3 à 5 minutes, principalement par le foie et les reins (Laura ,2020).

Ce métabolisme rapide de l'acide hyaluronique est similaire aux mécanismes de survie activés en réponse au stress. En cas de stress, tels qu'une crise cardiaque, une hémorragie ou une septicémie, le corps est capable de produire rapidement de grandes quantités d'acide hyaluronique en réduisant sa dégradation plutôt qu'en activant sa synthèse, qui est un processus plus lent et inefficace. (Laura ,2020).

Ainsi, la dégradation et le renouvellement rapides de l'acide hyaluronique contribuent à son homéostasie dans le corps et permettent une adaptation rapide aux situations de stress ou de perturbation de l'équilibre physiologique (Laura ,2020).

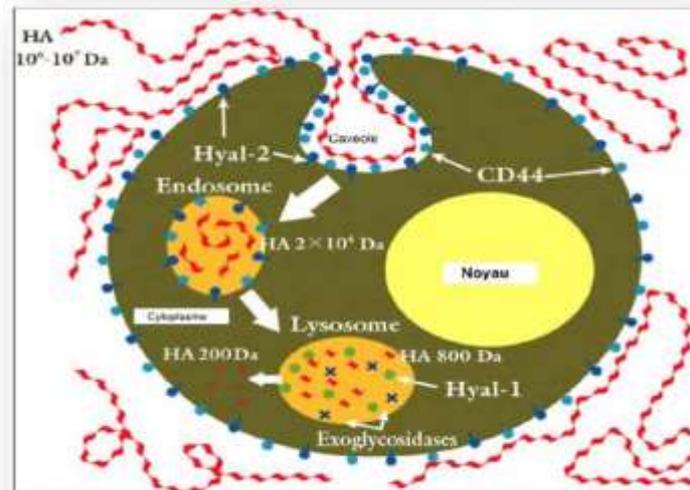


Figure 10: Cycle de dégradation de l'AH (Dicker et *al.*, 2014).

II.9. Dérivation chimique de l'HA:

II.9.1. Hylans:

Effectivement, dans les premières études sur la dérivation de l'acide hyaluronique (AH), Laurent et *al.* ont utilisé le 1,2,3,4-diépoxybutane pour réticuler les chaînes d'AH (Laurent et *al.*, 1964). Une autre méthode couramment utilisée pour la réticulation des chaînes d'AH repose sur la réaction du formaldéhyde ou d'autres agents réticulants tels que la diméthylurée, la diméthyléthylèneurée, l'oxyde d'éthylène, la polyaziridine ou le polyisocyanate (Balazs et *al.*, 1987). Ces agents réticulants réagissent avec les groupes hydroxyles des polysaccharides et les groupes amino ou imino des protéines présents dans l'AH à un pH neutre.

Lors de la réticulation, les chaînes d'AH forment un réseau tridimensionnel, et la solution se comporte alors comme de la gelée, reflétant les connexions protéiques entre les chaînes d'AH. Dans des conditions de réaction idéales, une connexion entre deux et huit molécules d'AH peut se produire. Cette approche permet d'obtenir des hylans dont la masse molaire varie de 8×10^6 à 24×10^6 Da. Il est important de noter que, dans ces préparations réticulées, entre 0,4 % et 0,8 % de la substance est constituée de protéines (Balazs et *al.*, 1987).

La réticulation de l'acide hyaluronique permet de former des gels à plus haute viscosité et de prolonger la demi-vie de l'AH dans les tissus, ce qui peut être bénéfique pour certaines applications thérapeutiques (Balazs et *al.*, 1986).

Une autre méthode de réticulation de l'acide hyaluronique utilise la réaction entre le divinyl sulfone (DVS) et les groupes hydroxyles de l'AH. Cette réaction se produit facilement dans des solutions alcalines aqueuses à température ambiante, et elle permet de former des gels d'AH réticulés (Balazs et *al.*,1986).

Le DVS réagit rapidement avec l'AH, et des gels solides réticulés peuvent être obtenus en quelques minutes seulement. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et efficace pour produire des gels d'AH réticulés (Matsuda et *al.*,1995).

La recherche sur la réticulation photochimique a également été entreprise afin de permettre l'élimination des composés non réagis des gels d'acide hyaluronique réticulés. Des chercheurs, tels que Matsuda et *al.*, ont développé des techniques utilisant des procédés photochimiques pour créer de l'acide hyaluronique réticulé qui peut être durci ou modifié grâce à des méthodes spécifiques (Matsuda et *al.*,1995).

Ces avancées dans les méthodes de réticulation de l'acide hyaluronique offrent différentes options pour la fabrication de gels d'AH réticulés, adaptés à diverses applications médicales et thérapeutiques (Matsuda et *al.*,1995).

Dans une étude menée par Matsuda et *al.* en 1995, ils ont développé de l'acide hyaluronique photoréticulable en utilisant différentes techniques. Les groupes hydroxyle ou carboxyle du polymère d'AH ont été estérifiés avec une substance photoactive. Ensuite, l'acide hyaluronique photodurcissable ainsi obtenu a été exposé à une lumière UV avec des longueurs d'onde allant de 260 à 400 nm (Matsuda et *al.*,1995).

Différents chromophores photoréactifs ont été utilisés pour cette réaction. Les acides cinnamiques ont été utilisés comme chromophores photoréactifs qui réagissent avec les groupes hydroxyle de l'acide hyaluronique. Les uraciles substitués par un carboxyalkyle et les coumarines substituées par un carboxyalkyle ont également été utilisés comme chromophores photoréactifs, réagissant avec les groupes hydroxyle de l'acide hyaluronique (Hubbell et *al.*, 1996).

De plus, des dérivés de la 1,2-O-éthanothymine et de la 1,2-O-éthanouracile ont été utilisés comme chromophores photoréactifs qui interagissent avec les groupes carboxyles de l'acide hyaluronique (Yui et *al.*,1993).

Ces techniques de photoréticulation permettent de modifier les propriétés de l'acide hyaluronique en introduisant des groupes réactifs qui peuvent se lier entre eux lors de l'exposition à la lumière UV. Cela offre de nouvelles possibilités pour la création de matériaux d'acide hyaluronique réticulés avec des propriétés spécifiques, adaptées à des applications médicales et thérapeutiques (Yui et *al.*,1993).

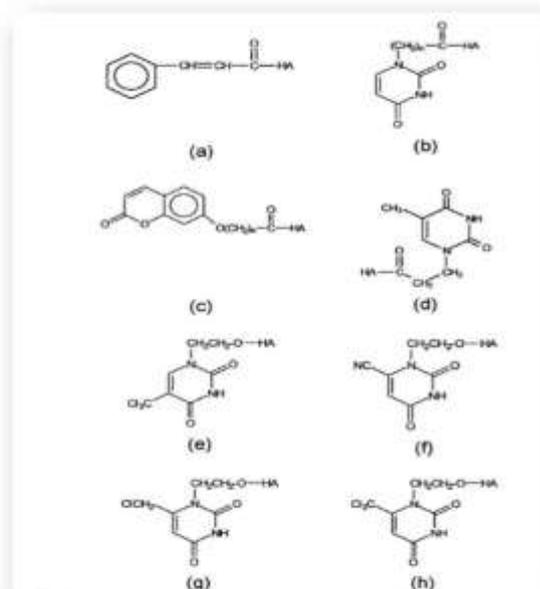


Figure11: Chromophores photoréactifs liés à l'AH pour la réticulation (Lubomír et *al.*,1998) .

Dans une autre étude menée par Hubbell et al. en 1996, différentes combinaisons d'oligoglycolacrylates de poly(éthylène glycol) (PEG) et d'acide hyaluronique ont été étudiées. Pour cela, le PEG monoacrylate activé par le carbonyle diimidazole (CDI) a été utilisé pour synthétiser des PEG-acrylates, et l'acide hyaluronique a été acrylé. (Lubomír et *al.*,1998).

La photopolymérisation de l'acide hyaluronique acrylé a été réalisée par irradiation UV en utilisant le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone comme initiateur. Cela a permis de former des matrices de gel liées au polyglycérolpolyglycidyl éther (PGPGE) de l'acide hyaluronique (Lubomír et *al.*,1998).

Ces matrices de gel ont été appliquées pour l'administration de l'acide acétylsalicylique, un médicament, dans l'œil sous l'effet de la lumière visible. La réaction de réticulation a eu lieu à un pH basique et à une température de 60 °C immédiatement après le mélange de l'acide

hyaluronique et de l'éther polyglycidyle. Les gels formés étaient opaques et présentaient une teneur en eau élevée, atteignant 99,5 % (Yui et *al.*,1993).

Cette approche permet de créer des gels d'acide hyaluronique réticulés contenant des polymères de poly(éthylène glycol) qui peuvent être utilisés pour l'administration contrôlée de médicaments et d'autres applications biomédicales. (Yui et *al.*,1993).

II.9.2. Autres dérivés de l'AH:

Des dérivés non réticulés de l'acide hyaluronique ont également été étudiés. Une approche consiste à créer des esters carboxylés d'acide hyaluronique en utilisant une réaction entre des sels d'ammonium quaternaires et des solvants aprotiques. Cette méthode a été suggérée par (Rastrelli et *al.* en 1990 et Kvam en 1992). Différents alcools peuvent être utilisés pour effectuer cette réaction, et le taux d'estérification peut varier de 0 % à 100 %. Les caractéristiques physiques et chimiques des esters d'acide hyaluronique diffèrent de celles de l'acide hyaluronique d'origine, et ils sont insolubles dans l'eau (Rastrelli et *al.*,1990).

Dans un brevet déposé par Balazs et Leshchiner en 1985, il est mentionné que des polymères synthétiques tels que les polyuréthanes, les polyoléfines, les polymères acryliques, les polyamides, les polyesters et les polysiloxanes peuvent être utilisés pour modifier l'acide hyaluronique (Rastrelli et *al.*,1990).

Un autre brevet déposé par Rhee et al. en 1995 suggère que pour obtenir des acides aminés libres, l'acide hyaluronique doit être désacétylé par hydrolyse basique. Même après une injection in situ, l'acide hyaluronique et le polymère artificiel peuvent interagir (Elwood et *al.*,1988).

Dans le brevet d'Elwood et Riccarton, il est mentionné que l'acide hyaluronique peut être conjugué avec des médicaments chimiothérapeutiques ou d'autres composés biologiquement actifs pour des applications spécifiques (Elwood et *al.*,1988).

Effectivement, dans l'étude d'Elwood et al. en 1988, l'utilisation de groupes aminés a été utilisée pour la conjugaison de l'acide hyaluronique avec des médicaments tels que les antibiotiques. Les chaînes d'acide hyaluronique doivent d'abord être activées par le bromure de cyanogène et les groupes hydroxyle de l'acide hyaluronique, ou par les carbodiimides et les groupes carboxyle de l'acide hyaluronique, avant de réagir avec le médicament. La combinaison

entre l'acide hyaluronique et le médicament réagit et précipite ensuite dans de l'éthanol pur (Elwood et *al.*,1988).

Dans le traitement thérapeutique de l'arthrite, des variantes d'acide hyaluronique greffées avec des antioxydants ont été créées. Le greffage se produit au moins sur l'un des groupes hydroxyle de l'acide hyaluronique. Une réaction chaîne par chaîne dans des solvants polaires aprotiques entre l'antioxydant 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoyl chloride et le sel de méthyltricaprylammonium de l'acide hyaluronique a été réalisée dans le cadre de cette recherche. L'acide hyaluronique fonctionnalisé à l'hydrazide a été créé dans des conditions de réaction modérées (Pouyani et *al.*,1997).

Ces études mettent en évidence la diversité des approches de dérivation et de modification de l'acide hyaluronique pour des applications thérapeutiques spécifiques. (Nguyen et *al.*,1997).

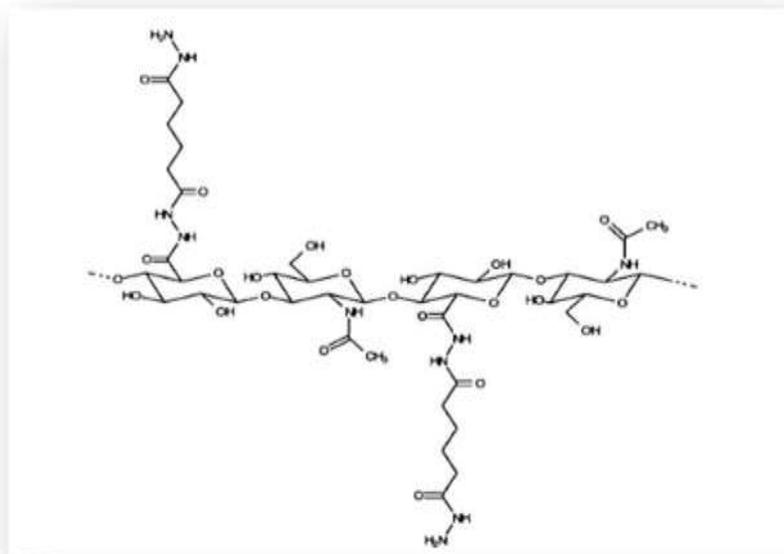


Figure12: L'unité disaccharidique de l'AH fonctionnalisé avec des hydrazides. (Vercruyse et *al.*,1997 ; Kawaguchi et *al.*,1992).

II.10. Production et obtention de AH:

En effet, le marché mondial des produits à base d'acide hyaluronique (AH) connaît une croissance significative. En 2018, il était estimé à environ 8,3 milliards de dollars, et il devrait dépasser les 15 milliards de dollars d'ici 2026 (Gunasekaran et *al.*, 2020).

Le prix du AH et de ses dérivés varie considérablement, allant de 2 000 à 60 000 dollars américains par kilogramme, en fonction de l'application. Cette variation de prix s'explique

principalement par les exigences de haute pureté, notamment pour les applications médicales, ainsi que par le poids moléculaire requis pour ces applications (Gunasekaran et *al.*, 2020).

La production de AH est en forte croissance, en particulier en Chine, où les ventes devraient atteindre 613 tonnes d'ici la fin de 2022. Cependant, les rendements de AH sont encore relativement faibles. Au début des années 2000, les estimations indiquaient que la production de AH pour les applications ophtalmologiques, cosmétiques, alimentaires et médicales de qualité inférieure était inférieure à 1 tonne par an (Ferreira et *al.*, 2021).

Face à cette demande commerciale croissante, il est essentiel d'optimiser les processus de production de AH afin d'obtenir des produits répondant à des normes de qualité élevées, tout en restant économiquement viables. La source d'extraction et le processus de purification influencent conjointement les caractéristiques de pureté, de poids moléculaire, de rendement et de coût de production du AH. Il s'agit donc d'un défi majeur dans le domaine de la recherche appliquée utilisant de l'acide hyaluronique, en cherchant à obtenir des produits de haute qualité et à haut rendement de manière rentable (Fallacara et *al.*, 2018).

Ces considérations mettent en évidence l'importance des efforts de recherche et de développement visant à améliorer les procédés de production de AH, tant du point de vue de la qualité que de la rentabilité, afin de répondre aux besoins croissants du marché et de permettre une utilisation plus étendue de cette molécule dans divers domaines d'applications. (Fallacara et *al.*, 2018).

II.10.1. Source animale:

Au cours des années 1930, l'acide hyaluronique (AH) a été isolé à partir de divers tissus animaux. Cependant, la première fois où il a été obtenu avec un haut degré d'efficacité et un poids moléculaire élevé était dans le cadre d'un projet de recherche de purification mené par Endre Balazs. Les sources utilisées pour l'extraction comprenaient principalement les cordons ombilicaux et les peignes de coq. L'AH ainsi obtenu est devenu l'un des produits les plus utilisés en chirurgie ophtalmique (Lubomír et *al.*, 1998).

L'extraction de l'AH à partir de sources animales, comme les peignes de coq et l'humeur vitrée de bovin, repose sur l'utilisation de solvants. La méthode d'extraction traditionnelle impliquait l'utilisation de mélanges de chloroforme et d'eau, mais ceux-ci ont été remplacés par

des mélanges plus respectueux de l'environnement à base d'eau, d'éthanol ou d'acétone. Après l'extraction, les solutions contenant de l'AH subissent des traitements supplémentaires.

Ces traitements comprennent l'élimination des bactéries et la séparation des chaînes protéiques liées à la structure de l'AH. Pour éliminer les bactéries, des agents bactéricides sont utilisés, tandis que pour la séparation des chaînes protéiques, des enzymes protéolytiques sont utilisées (Cavalcanti et al.,2020).

Il est important de noter que l'utilisation de l'AH d'origine animale soulève des préoccupations en termes d'éthique et de durabilité. De nos jours, il existe également des méthodes de production d'AH par fermentation bactérienne, qui sont considérées comme plus durables et évitent les problèmes liés à l'utilisation de sources animales (Cavalcanti et al.,2020).

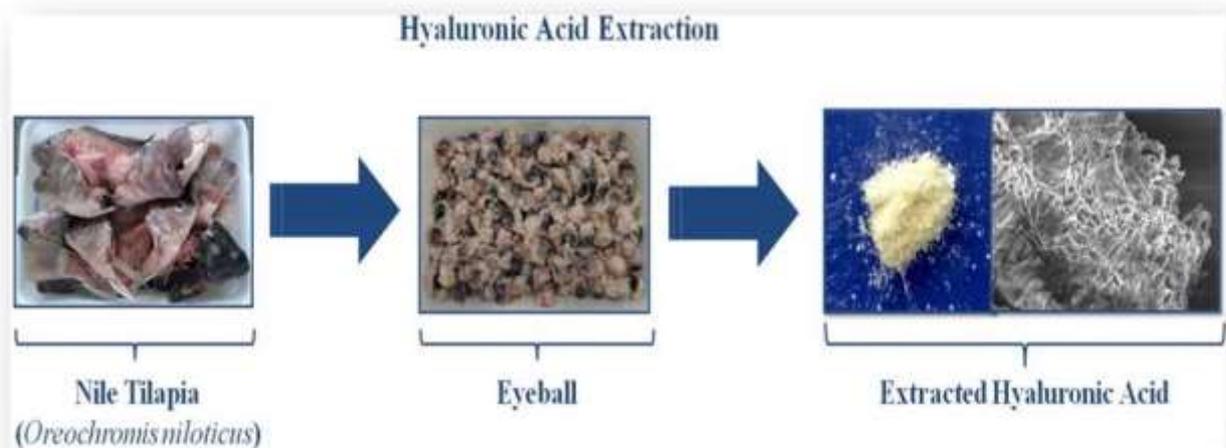


Figure13: Extraction de l'acide Hyaluronique de loeil de Nile Tilapia (*Oreochromisniloticus*) (Lyndervan et al.,2023).

Tableau 2 : Méthodes d'extraction et de purification pour obtenir de l'AH à partir de sources terrestres et marines (Ruschoni et al.,2022).

Source	Environment	Méthode d'extraction	Méthode de séparation/purification	Concentration	Reference

Membrane de coquille d'œuf	Terrestre	Extraction enzymatique	Centrifugation	Trypsin: 44.82 mg HA/g Membrane de coquille Papain: 39.02 mg HA/g Membrane de coquille	(Ûrgeova etVulganova, 2016)
Membrane de coquille d'œuf	Terrestre	Isopropanolandacétate de sodium	Purification du gel de silice et du charbon actif	5.3 mg AH/g coquille d'œuf	(Khanmohammadi et al., 2014)
Mollusque bivalve	Marine	Acétone et extraction enzymatique	Chromatographie par échange d'ions	4.2 mg AH/g d w de tissu	(Kanchana et al., 2013)
CoqPeigne	Terrestre	Organic solvent and sodium acetate	Centrifugation	n/d (non-déecté)	(Kulkarni et al., 2018)
Boules oculaires de requin	Marine	Processus alcalin	Ultrafiltration, diafiltration et électrodéposition de protéines	0.3 g AH/L de l'humeur vitrée	(Murado et al., 2012)
Stingray Foie	Marine	Extraction enzymatique (Papaine)	Chromatographie par échange d'anions	6.1 mg AH/g poids sec du tissu	(Sadhasivam et al., 2013)

Espadon Globes Oculaires	Marine	Processus alcalin	Ultrafiltration, diafiltration and	0.055 g AH/L de l'humeur vitrée	(Murado et al., 2012)
--------------------------	--------	-------------------	------------------------------------	---------------------------------	-----------------------

			protein electrodeposition		
--	--	--	------------------------------	--	--

II.10.2. Source microbienne:

Certaines techniques de production microbienne ont été développées dans le but d'obtenir de l'acide hyaluronique (AH) de manière plus efficace. Ces recherches ont commencé à émerger dans les années 1980 et ont connu une évolution rapide au cours des dernières décennies (Yao et *al.*, 2021),

La production d'AH par fermentation microbienne présente plusieurs avantages par rapport à l'utilisation de sources animales. Tout d'abord, elle permet d'éviter le risque d'infection virale inter-espèces associé à l'utilisation de tissus animaux. De plus, la purification de l'AH produit par fermentation microbienne est généralement plus efficace. Les coûts de production sont également réduits et les rendements sont plus élevés par rapport aux sources animales (Amado et *al.*, 2016).

Ces avantages ont contribué à l'augmentation de la production d'AH par fermentation microbienne. Les micro-organismes utilisés dans ces processus de fermentation comprennent des bactéries telles que *Streptococcus*, *Bacillus* et *Escherichia coli*, ainsi que des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Amado et *al.*, 2016).

Il est important de noter que la production d'AH par fermentation microbienne nécessite des conditions de culture et des techniques spécifiques pour optimiser le rendement et la qualité du produit final. Les paramètres tels que la composition du milieu de culture, la température, le pH et la durée de fermentation sont soigneusement contrôlés pour obtenir des résultats optimaux (Amado et *al.*, 2016).

Les recherches dans le domaine de la production d'AH par fermentation microbienne se poursuivent afin d'améliorer les rendements, d'optimiser les procédés de purification et de développer de nouvelles souches de micro-organismes producteurs d'AH. Cela contribue à répondre à la demande croissante de ce biopolymère aux multiples applications (Amado et *al.*, 2016).

Effectivement, plusieurs techniques de production microbienne ont été développées dans le but d'obtenir de l'acide hyaluronique (AH) avec un poids moléculaire élevé. L'une de ces

techniques consiste à isoler la capsule bactérienne, qui est composée de polymères d'AH. Des sources microbiennes appropriées sont utilisées pour obtenir des rendements élevés en AH avec une taille de polymère souhaitée (Yasser et *al.*,2018).

La production microbienne d'AH peut être influencée de manière significative par les conditions de culture, telles que la température, le pH, le taux d'aération, la vitesse d'agitation, l'oxygène dissous, la contrainte de cisaillement et le type de bioréacteur. Par conséquent, des études ont été menées pour déterminer les paramètres optimaux de la production microbienne d'AH (Gedikli et *al.*,2018).

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont les microorganismes les plus couramment utilisés pour la production d'acide hyaluronique. En particulier, les groupes sérologiques A (*Streptococcus pyogenes*) et C (*Streptococcus equinus*) sont largement utilisés (Brown et Pummill, 2008; Chien et Lee, 2007). Cependant, il est également possible de produire de l'AH à partir de cultures de microorganismes recombinants tels que *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Lactococcus lactis* (Weigel et De Angelis, 2005).

Une fois la fermentation terminée, l'acide hyaluronique brut est obtenu après différentes étapes de traitement telles que la dilution, la filtration et la précipitation éthanolique. Les procédés de production microbienne présentent plusieurs avantages par rapport aux méthodes d'extraction à partir de tissus animaux. Ils offrent un rendement de production plus élevé, une taille d'AH plus importante et une meilleure qualité du polymère produit. De plus, les coûts de production sont réduits en raison de la facilité de culture des microorganismes et de l'obtention d'un produit plus pur avec une faible liaison aux protéines (Armstrong et *al.*, 1997; Fong-Chong et *al.*, 2004; Rangaswamy et *al.*, 2008). Cependant, la viscosité élevée du milieu de culture limite le transfert d'oxygène, ce qui peut affecter la production d'AH par fermentation (Fong-Chong et *al.*, 2004).

Une autre considération importante de la production d'AH par fermentation microbienne est la réduction du risque de transmission virale inter-espèces. Cependant, il existe des risques potentiels liés à cette technique, tels que la présence d'endotoxines bactériennes et la contamination du milieu de culture (Diane Rigo et *al.*,2023).

Tableau 1: Résumé des différents paramètres économiques pour la production d'AH à l'aide d'enzymes sauvages et recombinantes (Ruschoni et *al.*,2022)

Scenarios/economic parameters	A	B	S1	S2	S3	S4	SE1	BS1	BS2	
Reference	34a		34b				17			
Technologie	<i>Streptococci fermentation</i>		<i>Streptococci fermentation</i>				<i>Streptococci fermentation</i>	<i>B. subtilis A164Δ5</i>	<i>B. subtilis 3NA</i>	
Investissement total en capital (millions de dollars américains)	41.8	86.844	53.5	44.3	107	98.6	106.5	82.7	223.3	
Coût de production unitaire (\$ US/kg)	931	1665	1115	946	1691	1449	113	67	43	
Retour sur investissement (ROI en %)	46.12	50.64	32.6	43.5	42.5	53.1	43.6	66.4	78.3	
Temps de récupération (années)	2.12	1.97	3.07	2.30	2.35	1.88				
Valeur actuelle nette (VAN) (millions de dollars américains)	118.0	281.6	92.4	115.3	276.5	308.7	244.5	124.6	285.3	
Produit à usage topique (kg/an)	20.000	17.944	20.000	20.000	19.067	19.067	1.222.357	622.912	1.426.255	

Produit à usage injectable (kg/an)	0	2.056	0	0	871	871			
------------------------------------	---	-------	---	---	-----	-----	--	--	--

Pourcentage d'AH détourné vers une utilisation injectable	10.28%	4.36%	
---	--------	-------	--

II.10.3. Processus en aval pour la récupération de l'AH:

Effectivement, la purification et les processus en aval sont essentiels pour obtenir de l'acide hyaluronique (AH) de poids moléculaire élevé et de grande pureté. Différentes méthodes de purification ont été utilisées, notamment la précipitation artificielle utilisant des solvants organiques tels que l'isopropanol. La précipitation de l'AH est un processus complexe similaire à la précipitation des protéines en présence de solvants organiques, où la réduction de la constante diélectrique favorise les interactions intermoléculaires de la macromolécule, entraînant la précipitation de l'AH (Bicudo et *al.*, 2012; Cowman et *al.*, 2005).

Au niveau du laboratoire, les protocoles de purification impliquent généralement l'utilisation d'un détergent pour libérer l'AH capsulaire, suivi de la précipitation de l'AH à l'aide d'éthanol froid (Figure 14et 15).

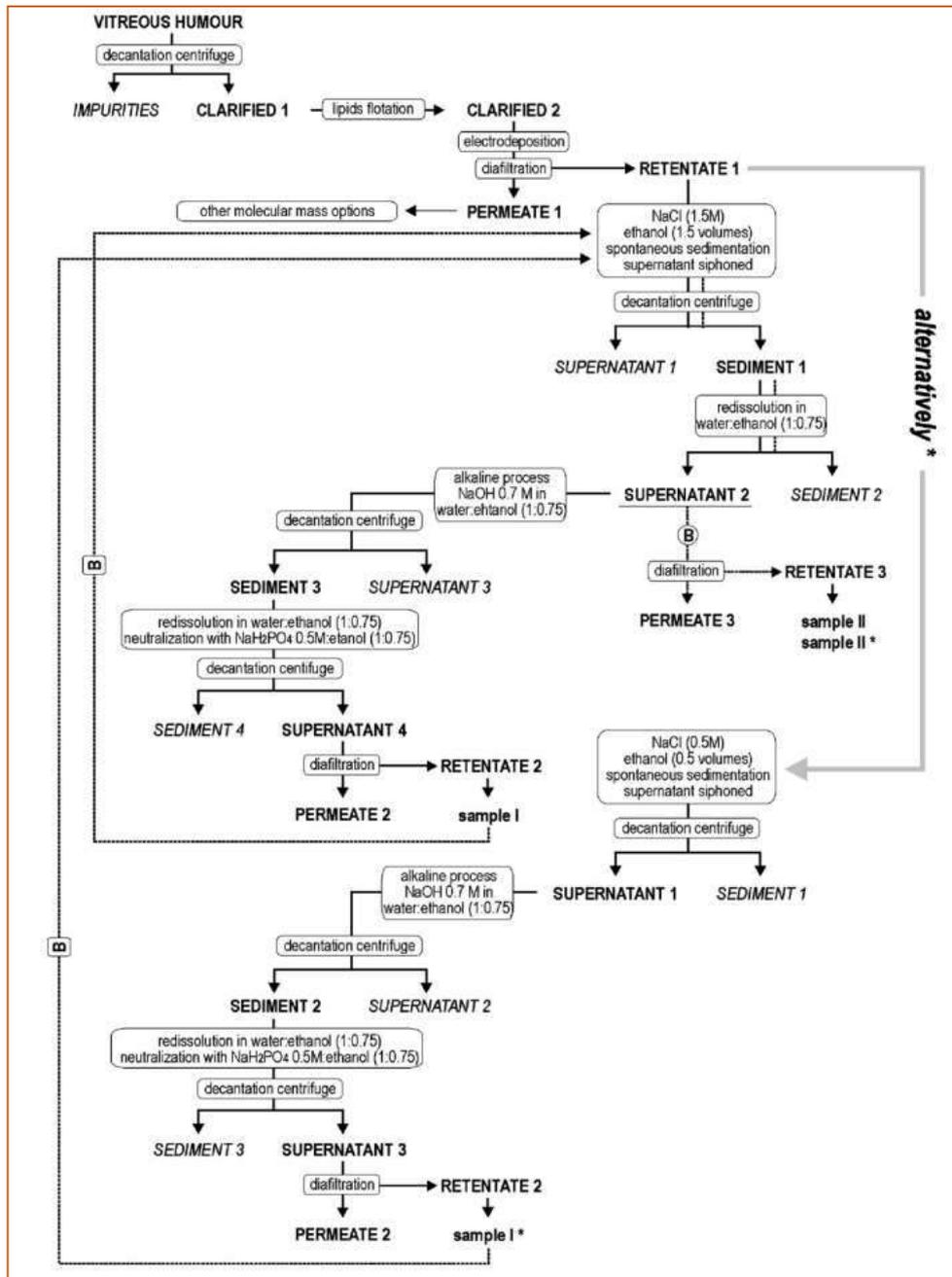


Figure14: Organigramme des différentes opérations développées dans la préparation de l’AH hautement purifiant à partir de l’humeur vitrée du globe oculaire de poisson. Les lignes discontinues (B) montrent des répétitions possibles dans les étapes afin d’augmenter (Murado et al.,2012).

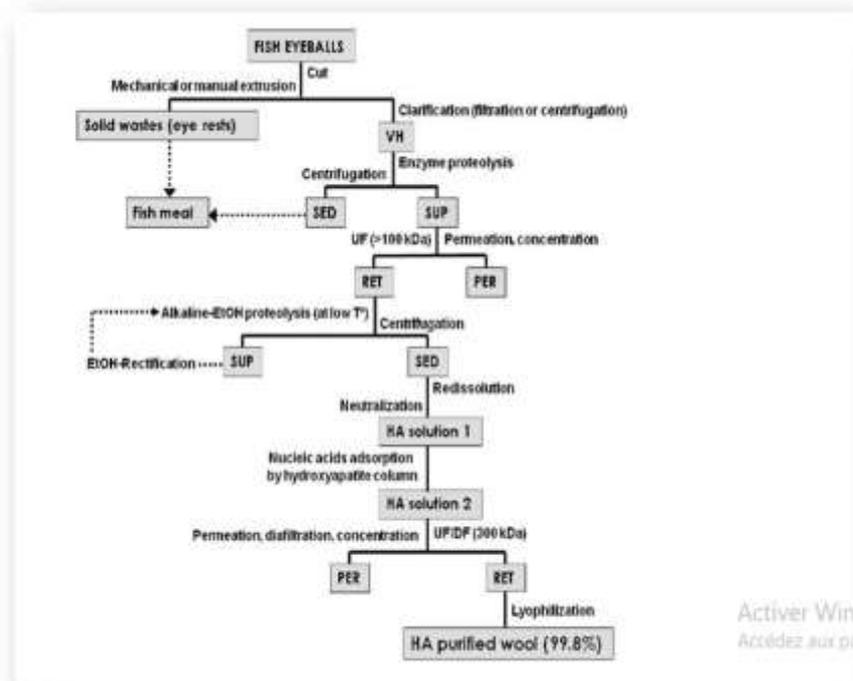


Figure15: Organigramme des méthodes de purification pour extraire l'acide hyaluronique (HA) du vitré humeur (VH) du globe oculaire de poisson. SED : sédiment, SUP : surnageant, PER : perméat et RET : rétentat (José Antonio et al.,2013).

La chromatographie par filtration sur gel est également utilisée pour séparer l'AH de différents poids moléculaires (Cheng et al, 2016; Jeong et al, 2014). D'autres procédures utilisent le chlorure de cétypyridinium (CPC) pour former un complexe avec l'AH, qui est ensuite précipité par centrifugation et traité avec de l'éthanol froid (Attia et al.,2018; Liu et al., 2019).

L'évaluation du poids moléculaire de l'AH produit est généralement réalisée par chromatographie de filtration sur gel en utilisant des standards d'AH de poids moléculaire connu. À l'échelle industrielle, la fermentation par lots est suivie d'étapes de purification telles que la centrifugation, la diafiltration, le traitement au charbon actif et la précipitation à l'aide d'isopropanol (Cheng et al.,2014).

Une approche alternative suggère l'utilisation de la fermentation fed-batch combinée à des méthodes de récupération/purification telles que l'ultrafiltration-diafiltration ou la filtration à flux tangentiel (FFT). Ces étapes de traitement en aval permettent d'éliminer les impuretés telles que les sels, les sucres et les peptides, ainsi que les molécules d'AH de faible poids moléculaire qui pourraient avoir des propriétés pro-inflammatoires indésirables. L'utilisation de

membranes de filtration appropriées permet de concentrer le produit et de réduire les volumes de traitement pour les étapes ultérieures de purification (Certminati et *al*, 2021; Rangaswamy et *al*, 2008). Cette méthode de purification permet d'obtenir de l'AH de haute qualité et de haut poids moléculaire pour différentes applications dans les secteurs pharmaceutique, médi-cal, des biomatériaux et de la cosmétique (Rangaswamy et *al.*, 2008).

II.11. Les applications de l'acide hyaluronique :

Effectivement, l'acide hyaluronique a trouvé de nombreuses applications dans différents do-maines de la médecine. Voici quelques-unes de ses utilisations dans les domaines de la chirurgie et de l'ophtalmologie:

II.11.1. en chirurgie:

L'acide hyaluronique est utilisé en chirurgie pour ses propriétés viscoélastiques, qui favorisent les processus de cicatrisation et de régénération après les interventions chirurgicales. Il peut être utilisé pour la ré-épithélisation de la conjonctive et pour réduire la pression intraoculaire (Price et *al.*,2007).

Dans le cas de la chirurgie de la cataracte, les gels d'acide hyaluronique sont utilisés pour maintenir l'espace opératoire, c'est-à-dire la profondeur de la chambre antérieure de l'œil, et pour protéger l'épithélium de la cornée et les autres tissus des dommages physiques. L'acide hyaluronique favorise la cicatrisation de la cornée en stimulant la croissance des cellules de l'épithélium cornéen (Price et *al.*,2007).

II.11.2. Œil (Ophtalmologie):

En ophtalmologie, l'acide hyaluronique est couramment utilisé en complément de la mise en place d'un dispositif intraoculaire artificiel lors de certaines interventions chirurgicales. Il est également utilisé pour éviter le dessèchement de la cornée pendant certaines interventions et pour soigner le syndrome de l'œil sec. L'acide hyaluronique peut également être utilisé pour administrer localement des antibiotiques dans l'œil, car le gel retient le médicament et prolonge sa libération (Rah, 2011).

De plus, l'administration d'acide hyaluronique par voie intravitréenne est utilisée pour traiter la perforation traumatique de l'œil ou après des interventions telles que la trabéculéctomie ou la phacoémulsification (Price et *al.*, 2007).

En résumé, l'acide hyaluronique a des applications variées en chirurgie et en ophtalmologie, notamment dans la cicatrisation, la réparation tissulaire, la protection des tissus oculaires et la régulation de la pression intraoculaire (Price et *al.*, 2007).

II.11.3. Chirurgie esthétique:

L'acide hyaluronique est largement utilisé en chirurgie esthétique, principalement dans le domaine du rajeunissement facial et du comblement des rides. Voici quelques informations concernant son utilisation dans ce contexte (Fruminet, 2010).

II.11.3.1. Implants mammaires:

L'utilisation de l'acide hyaluronique dans les implants mammaires est rare en raison de son coût élevé pour produire les grandes quantités d'acide hyaluronique nécessaires à cette application médicale (Fruminet, 2010).

II.11.3.2. Injection dermique:

L'acide hyaluronique est largement utilisé pour le comblement des rides en chirurgie esthétique. Il existe une variété de formulations disponibles sur le marché pour répondre à la demande croissante (Mathieu ,2011).

Comparé aux injections de toxine botulique et de collagène, les gels injectables d'acide hyaluronique se sont révélés plus efficaces pour traiter les petites égratignures. La combinaison de l'acide hyaluronique avec la toxine botulique s'est avérée plus efficace que l'utilisation de l'acide hyaluronique seul, bien que la raison exacte de cette efficacité accrue ne soit pas encore totalement connue (Mathieu ,2011).

L'acide hyaluronique est injecté sous forme de gel transparent dans la peau pour reconstruire les volumes du visage, combler les rides profondes et les sillons. Étant donné que l'acide hyaluronique est résorbable, son effet est temporaire. Les produits biodégradables à base d'acide hyaluronique sont actifs pendant 8 à 12 mois, et des séances d'entretien deux fois par an peuvent être nécessaires pour maintenir l'effet des injections à plus long terme. Les injections à base de gel sont réalisées dans le derme ou le tissu cutané en quelques minutes. Le processus est généralement peu douloureux en raison de l'utilisation d'aiguilles extrêmement fines. Dans certaines zones du visage, notamment autour de la bouche où les tissus sont plus sensibles, l'anesthésie générale à l'aide d'une pommade anesthésiante contenant de la lidocaïne peut être

appliquée. Les résultats sont généralement immédiats, avec quelques rougeurs temporaires qui s'estompent rapidement. Certains produits d'acide hyaluronique sont mélangés avec de la lidocaïne pour offrir un effet anesthésiant au patient (Mathieu, 2011).

Le coût de ces traitements est variable, allant de 200 à 500 euros, et est déterminé en fonction de la zone à traiter, des nombreux services proposés et du type d'acide hyaluronique utilisé. Il est important de noter que les injections d'acide hyaluronique à des fins esthétiques ne sont pas couvertes par la Sécurité Sociale (Mathieu,2011).

Il est recommandé de consulter un professionnel de la santé spécialisé en chirurgie esthétique pour discuter des options, des risques et des avantages spécifiques à chaque patient (Mathieu,2011).

II.11.3.3. Autres applications en ingénierie tissulaire:

L'ingénierie tissulaire est un domaine de recherche qui vise à régénérer les tissus et les organes. Trois éléments principaux sont nécessaires pour développer un tissu artificiel : les cellules, les matrices de support et les facteurs de croissance. Le développement de polymères biodégradables permet la création de matrices temporaires, ce qui contribue grandement au succès des greffes cellulaires (Liu et *al.*,2009).

II.11.3.4. Délivrance de cellules : exemple du transfert de kératinocytes pour la cicatrisation des plaies:

Le Laserskin est une feuille d'acide hyaluronique hautement estérifiée et peu soluble, qui permet le transfert des kératinocytes d'une culture cellulaire vers la plaie et favorise leur prolifération. Ce système, par exemple, peut être utilisé pour cautériser les ulcères diabétiques. Des études ont montré que l'utilisation de ce feuillet avec les kératinocytes seuls ou en coculture avec des fibroblastes conduit à de meilleurs taux de cicatrisation (Price et *al.*, 2007).

II.11.3.5. Régénération dermique:

Plusieurs techniques sont disponibles pour la reconstruction du derme. Les lambeaux de derme synthétique, les supports dermiques en collagène et en acide hyaluronique sont souvent utilisés dans ce contexte (Price et *al.*, 2007).

II.11.3.6. Réparation cardiaque:

Les hydrogels d'acide hyaluronique sont également étudiés pour leur utilisation dans la réparation cardiaque. Après un infarctus du myocarde, l'augmentation des molécules proinflammatoires et le pompage de liquide à travers le cœur peuvent entraîner une augmentation de la taille du ventricule gauche et une altération de la contraction du muscle cardiaque. L'injection d'un biomatériau acellulaire, tel qu'un hydrogel d'acide hyaluronique, peut atténuer les différents stress subis par l'endocarde et contribuer à la réparation (Burdick et Prestwich, 2011).

II.11. 3.7. Ingénierie valvulaire:

Les approches d'ingénierie tissulaire sont particulièrement intéressantes dans le domaine de la chirurgie cardiaque pour fournir des substituts biologiques aux valves cardiaques endommagées. Les hydrogels d'acide hyaluronique photoréticulés ont été étudiés pour cette utilisation, car l'acide hyaluronique est naturellement présent dans les valves cardiaques. Les cellules valvulaires interstitielles (CVI) ont montré une bonne adhésion et prolifération sur les hydrogels à base d'acide hyaluronique, et elles continuent de fonctionner et de produire des molécules matricielles importantes une fois enfermées (Burdick et Prestwich, 2011).

II.11.3.8. Microsystèmes:

Les hydrogels d'acide hyaluronique photopolymérisés peuvent également être utilisés dans le développement de microsystèmes, en combinaison avec l'ingénierie tissulaire et la culture cellulaire. Ces microsystèmes sont utiles pour les études biologiques fondamentales, le diagnostic et le criblage des tissus profonds. Les hydrogels d'acide hyaluronique permettent le contrôle de la photopolymérisation pour générer des micropuits ou des microgels, ce qui facilite l'en-capsulation cellulaire ou la culture cellulaire. De plus, ces hydrogels peuvent être utilisés dans des microbioréacteurs pour soutenir la culture tridimensionnelle en suspension de cellules avec une perfusion contrôlée du milieu de culture (Burdick et Prestwich, 2011 ; Seidlits et *al.*,2011).

II.11.3.9. En cosmétologie:

L'acide hyaluronique a trouvé des applications dans l'industrie cosmétique en raison de sa capacité à retenir l'humidité naturelle de la peau. Les avancées en génie génétique et en biotechnologie ont rendu les procédés de fermentation de l'AH commercialement viables, ce qui a favorisé son utilisation dans les cosmétiques (Stern et Maibach, 2008).

Dans de nombreux produits cosmétiques, la concentration d'AH varie généralement de 0,025 % à 0,050 %. Cette concentration semble suffisante pour conférer aux produits une texture lisse et visqueuse. Lorsqu'ils sont appliqués localement, ces produits créent une couche qui fournit une hydratation soutenue à la peau (Stern et Maibach, 2008).

L'AH est souvent utilisé dans les produits de soin de la peau tels que les crèmes hydratantes, les sérums et les masques. Il aide à retenir l'humidité, à améliorer l'élasticité de la peau et à réduire l'apparence des rides et ridules (Stern et Maibach, 2008).

Il convient de noter que les cosmétiques à base d'AH sont destinés à des fins esthétiques et ne traitent pas les problèmes médicaux sous-jacents de la peau. Pour des problèmes de peau spécifiques ou des affections dermatologiques, il est recommandé de consulter un dermatologue ou un professionnel de la santé spécialisé (Stern et Maibach, 2008).

II.11.3.10. Dans le traitement du cancer:

Le cancer est caractérisé par une croissance et une prolifération cellulaires incontrôlées, parfois suivies de métastases. Une masse de cellules en croissance incontrôlée est appelée tumeur ou néoplasme, qui peut former une masse localisée ou se disperser dans d'autres parties du corps (métastases) (Rosenberg et *al.*, 2015).

Il est important de noter que l'acide hyaluronique n'est pas utilisé comme traitement principal du cancer. Son utilisation dans le domaine de la cancérologie est limitée et se concentre plutôt sur des domaines tels que la recherche sur les microenvironnements tumoraux et le développement de vecteurs de délivrance de médicaments ciblés (Mao et *al.*, 2019).

Le traitement du cancer nécessite une approche médicale spécialisée et est souvent basé sur des protocoles de chimiothérapie, de radiothérapie, de chirurgie et d'autres thérapies spécifiques au type et au stade du cancer. Il est essentiel de consulter un oncologue ou un

spécialiste du cancer pour obtenir des informations précises et adaptées à chaque situation (Rosenberg et *al.*, 2015).

II.11.3.11. Liposomes à base d'AH pour le traitement du cancer

Les liposomes à base d'acide hyaluronique (AH) ont été développés pour le traitement du cancer en tant que systèmes d'administration de médicaments. Les liposomes sont des nanoparticules constituées d'une bicouche phospholipidique amphiphile avec un diamètre de 50 à 100 nm. Ils permettent l'encapsulation et la délivrance de médicaments hydrophobes ou hydro-philés dans des environnements aqueux (Mao et *al.*, 2019).

Ces systèmes d'administration de médicaments basés sur des liposomes offrent plusieurs avantages pour le traitement du cancer. Le composant hydrophobe des liposomes favorise l'accumulation de médicaments hydrophobes, tandis que la partie hydrophile facilite le transport de médicaments hydrophiles. De plus, les liposomes ont une durée de circulation sanguine prolongée, ce qui permet une délivrance plus ciblée et efficace des médicaments (Lee et *al.*, 2020).

Dans le contexte spécifique du traitement du cancer de la prostate, (Peer et Margalit 2004) ont développé des liposomes contenant de l'acide hyaluronique pour encapsuler la mitomycine C, un médicament utilisé dans le traitement de cette forme de cancer. De même, (Bajaj et *al.*,2012) ont utilisé des liposomes à base d'AH pour encapsuler la mitomycine C dans le traitement du cancer du poumon (Bajaj et *al.*,2012).

Ces approches permettent une délivrance plus ciblée des médicaments anticancéreux en exploitant les propriétés de l'acide hyaluronique pour améliorer l'efficacité et la spécificité du traitement. Il convient de noter que ces techniques sont encore à un stade de recherche et de développement et ne sont pas nécessairement disponibles en tant que traitements cliniques établis (Bajaj et *al.*,2012).

Chapitre II
Matériels et méthodes

II. Matériel et Méthodes

L'étude a été menée au laboratoire pédagogique et au centre de recherche et d'analyses physicochimiques (CRAPC) de l'Université d'Ouargla, dans le but d'extraire et de caractériser l'acide hyaluronique de l'humeur vitrée de dromadaire. Les échantillons d'œil de chameau ont été prélevés dans un abattoir situé au marché populaire Souk Elhjer, dans la wilaya d'Ouargla. Après avoir vérifié les conditions d'abattage et la propreté de l'abattoir, les échantillons ont été transportés en glacière à une température de 1°C.

II.1. Objectif: L'objectif de ce travail est d'extraire l'acide hyaluronique à partir de l'humeur vitrée de l'œil du dromadaire. Une fois cette poudre est récupérée, elle sera utilisée à des fins cosmétiques et médicales.

II.2. Le matériel et les produits utilisés:

Le matériel et les produits utilisés dans la réalisation de ce travail sont présents dans le tableau suivant

Tableau 2: Matériels et produits utilisées

Verrerie de paillasse	Appareillages	Produits
Bécher spatule, barreaux magnétique, flacon	Balance Agitateur magnétique PH mètre Centrifugeuse Le lyophilisateur RMN	L'eau distillée Hydroxyde de sodium (NaOH) Acide acétique CH ₃ COOH pepsine Ethanol C ₂ H ₆ O Acétone Potassium dihydrogène phosphate (KH ₂ PO ₄) Sodium dihydrogenephosphate NaH ₂ PO ₄

II.3. Préparation d'échantillons:

II.3.1. Nettoyage et lavage d'Œil:

Les yeux de camélins sont soigneusement triés et lavés à l'eau du robinet afin d'éliminer la poussière, les polluants et les impuretés. Pour se débarrasser de la graisse présente autour de l'œil, nous avons ajouté de l'acétone lors du lavage. Les échantillons sont ensuite transférés immédiatement au laboratoire



Figure16: Préparation d'échantillons et le nettoyage(Photo personnelle).

II.3.2. Dissection d'Œil

Lors de l'analyse des échantillons d'œil, nous avons utilisé un couteau pour disséquer l'œil. Ensuite, à l'aide d'une pince et d'un scalpel, nous avons procédé à l'extraction des composants de l'œil. Nous avons identifié les différents composants et nous sommes particulièrement intéressés à l'humeur vitrée pour son extraction et son analyse ultérieure. Il est important de manipuler les échantillons avec précaution et de suivre les protocoles appropriés pour assurer la qualité des analyses.



Figure17: Les étapes de dissection d'Œil et extraction de l'humeur vitrée (Photo personnelle).

II.4. Préparation des produits

II.4.1. Préparation de la solution saline tamponnée:

- Dans un Erlenmeyer, le sel est dissout dans 100 ml d'eau distillée, puis ajoutez du tampon phosphate pour ajuster le pH à environ 7,2. On doit s'assurer de bien mélanger les composants pour obtenir une solution homogène.

II.4.2. Préparation de la solution enzymatique:

- 1 g de pepsine est dissoute dans 50 ml de la solution saline sous agitation pendant 30 minutes. On doit s'assurer que la pepsine est complètement dissoute dans l'eau.

II.4.3. Préparation de la solution d'éthanol à 70% :

- Dans un bécher de 50 ml, 7 ml d'éthanol est additionné à 3 ml d'eau distillée pour obtenir une solution d'éthanol à 70%.

II.5. Le protocole d'extraction d'acide Hyaluronique

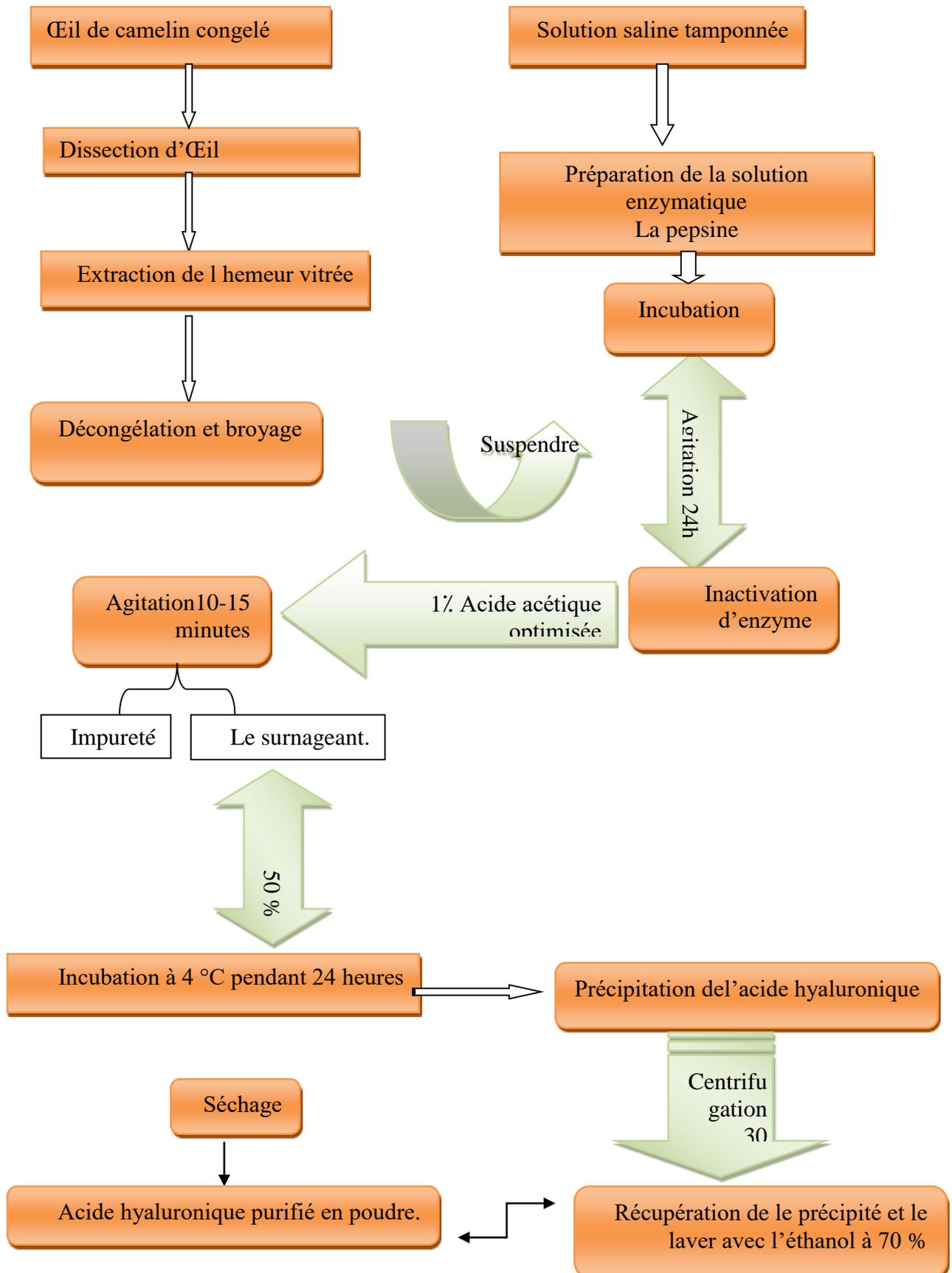


Figure18: Diagramme de l'extraction d'acide Hyaluronique de l'humeur vitrée camelin.

Étapes 1 : Dégraissage de l'humeur vitrée

- L'humeur vitrée est décongelé dans un endroit confortable, en respectant les conditions de température et d'hygiène.

Étapes 2 :

- l'humeur vitrée décongelée est incubé dans une solution enzymatique à température ambiante pendant plusieurs heures avec une agitation douce. Cette étape permet une digestion enzymatique de l'échantillon d'humeur vitrée.

Étapes 3: Inactivation de l'enzyme

- Une solution d'acide acétique optimisée à 1% est ajoutée à la suspension pour inactiver l'enzyme. La concentration d'acide acétique doit être déterminée expérimentalement pour assurer une inactivation efficace de l'enzyme.

Étapes 4 : Clarification de la solution

- La solution est centrifugée à basse vitesse pendant 15 minutes afin d'éliminer les particules insolubles. Le surnageant est récupéré par la suite.

Étapes 5: Précipitation de l'acide hyaluronique

- L'éthanol absolu est ajouté à la solution jusqu'à ce que la concentration d'éthanol atteigne 50% (v/v). Cette étape permet d'éliminer les impuretés présentes dans la solution. Cette étape est répétée plusieurs fois.

Étapes 6 : Récupération de l'acide hyaluronique

- La solution est centrifugée par la suite à 10 000 rotations par minute pendant 30 minutes à une température de 4°C.
- Le précipité, qui contient l'acide hyaluronique est récupéré et laver avec une solution d'éthanol à 70% (v/v) pour éliminer les impuretés. Cette étape est répétée plusieurs fois.

Étapes 7 : Séchage par lyophilisation

- L'acide hyaluronique est dissous dans de l'eau distillée, puis placé dans un récipient sous vide pour éliminer l'eau. Cette étape permet d'obtenir une poudre d'acide hyaluronique purifiée de couleur blanche.

II.6. Calcul du rendement d'extraction :

Pour obtenir le rendement en pourcentage, la masse de l'acide hyaluronique extrait est divisée par la masse du résidu, puis multipliée par 100.

Donc le rendement d'extraction de l'acide hyaluronique (HA) à partir de l'humeur vitrée cameline peut être calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = (m_{\text{HA}} / m_{\text{R}}) \times 100$$

où :

- m_{HA} représente la masse de l'acide hyaluronique extrait
- m_{R} représente la masse du résidu (l'humeur vitrée)

Il est important de noter que pour effectuer ce calcul, nous avons mesuré précisément les masses de l'acide hyaluronique et du résidu après l'extraction.

II.7. Caractérisation physicochimique de l'extrait obtenu :

II.7.1. L'analyse spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et qui nécessite peu d'échantillon. Certains groupements, considérés comme marqueurs, peuvent révéler la présence de certaines catégories de polysaccharides ou d'autres molécules associées (composés phénoliques, protéines). Les profils des spectres IR ainsi que les intensités relatives des bandes d'absorption obtenues lors de l'analyse des polysaccharides de même structure sont similaires.

Principe :

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou **FTIR** : Fourier Transformed Infrared Spectroscopy) se base sur l'interaction qu'il existe entre un rayonnement de type infrarouge (IR) et la molécule à analyser. La spectroscopie infrarouge permet donc de déterminer l'empreinte digitale chimique des polysaccharides. Un spectre IR se caractérise par le tracé de

l'absorbance d'un photon en fonction de son nombre d'onde ($1/\nu$). Le nombre d'onde qui est l'unité la plus couramment utilisée en spectrométrie IR est directement proportionnel à la fréquence et donc à l'énergie du rayonnement absorbé par la molécule analysée. Ainsi, le principe de la spectroscopie IR consiste à sonder la molécule au moyen d'un rayonnement IR situé dans la gamme 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} et à analyser l'absorption du rayonnement émis par la molécule vibrant sous l'action du IR. Une molécule, selon ses degrés de liberté et de l'onde IR excitatrice peut absorber une quantité d'énergie pour la transformer en mouvement. Il existe donc, pour une molécule donnée, plusieurs modes de vibrations correspondant à des fréquences caractéristiques données. Ces vibrations sont classées selon deux catégories : Les vibrations dites de déformations (bending) et les vibrations dites d'élongation (Stretching).

Mode opératoire :

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de type VERTEX 70 FT-IR. L'extrait brut obtenu est déposé sur un ATR A225 diamant. Les spectres IR ont été enregistrés à température ambiante avec une gamme de nombre d'onde allant de $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Les spectres ont été analysés avec le logiciel OPUS 7.2.

II.7.2. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN):

I.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Principe :

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire permet de déterminer les structures moléculaires en se basant sur la rotation des noyaux atomiques appelée spin nucléaire (I). Tout comme les électrons qui ont un spin $I = +\frac{1}{2}$ ou $I = -\frac{1}{2}$, certains noyaux atomiques possèdent également des spins chargés capables de créer un champ magnétique appelé moment magnétique ce qui permet de les étudier par RMN. Les noyaux avec des nombres pairs de neutrons et de protons n'ont aucun spin tandis que ceux avec des nombres impairs de neutrons et de protons ont des spins entiers. Le ^1H (1 proton, 0 neutron) et le ^{13}C (6 protons et 7 neutrons) contiennent des spins demi-entiers et sont donc utilisés en RMN.

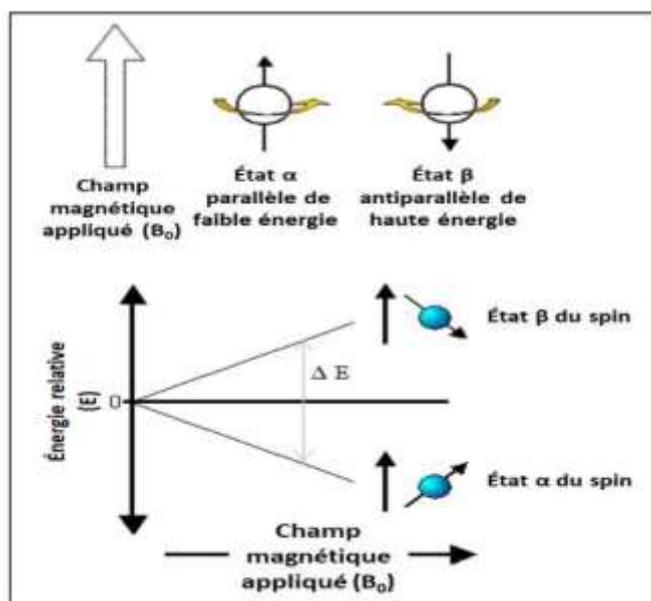


Figure19: Orientation des spins nucléaires suite à l'application d'un champ magnétique B₀ .

En absence de champ magnétique externe ou appliqué (B₀), les spins nucléaires sont orientés au hasard. Par contre, en appliquant un champ magnétique, les spins s'orientent par rapport au champ appliqué et possèdent deux états différents : un état de basse énergie parallèle à la force appliquée (état α) et un état antiparallèle d'énergie plus élevée (état β). La différence d'énergie (ΔE) entre les deux états α et β du spin varie proportionnellement à l'intensité du champ magnétique appliqué (Figure 19). La valeur de ΔE est à peu près de 0,02 cal/mol et se trouve dans la région de radiofréquence. L'énergie émise dans cette région produit un signal RMN.

Appareillage :

Les spectres ¹³C ont été obtenus à l'aide d'un appareil RMN Agilent Technologies Spectromètre 600 MHz. Les échantillons ont été solubilisés dans l'eau du deutérium (D₂O) à des concentrations convenables et introduits dans un tube de 5 mm. Tous les déplacements chimiques ont été donnés en parties par million (ppm).

Tous les spectres obtenus ont été traités par le logiciel Top Spin version 4.3.0 en prenant le pic du solvant deutéré comme référence pour calibrer les déplacements chimiques des différents pics du spectre.

Chapitre III
Résultats et discussion

III. Résultats et discussions :

III.2. Le rendement de l'extraction :

La moyenne de la masse moléculaire de l'humeur vitrée est : **0,0921 g**

La moyenne de la masse moléculaire de l'acide Hyaluronique est : **0,0063 g**

Alors le rendement (%) = $(m_{HA}/m_R) \times 100$

$$(0,0063 \text{ g}/0,0921 \text{ g}) \times 100 = 6,8\%$$

Le rendement d'extraction de l'acide hyaluronique à partir de sources animales peut varier selon la source et les conditions d'extraction, y compris le type de solvant organique, enzyme et sel, pH et le temps d'action de l'enzyme. Dans ce travail, le rendement obtenu pour l'extraction de ce biopolymère à partir l'humeur vitrée camelin (*Camelus dromedarius*) par le processus enzymatique était de 0,068mg d'AH/g humeur vitreuse.

III. 3. Spectre Infrarouge .

Un spectre IR représente l'absorption de l'énergie infrarouge par les liaisons chimiques de la molécule. Les bandes d'absorption sont généralement exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}) sur l'axe des x du spectre.

L'interprétation du spectre infrarouge (IR) de l'extrait brut obtenu (figure20) nous a permis d'identifier les groupes fonctionnels présents dans la molécule en fonction des fréquences d'absorption des liaisons chimiques.

- Bande d'Absorption O-H : L'acide hyaluronique contient des groupes hydroxyle (-OH) dans sa structure. Recherchez une large bande d'absorption entre 3200 et 3600 cm^{-1} , qui est caractéristique des vibrations des groupes -OH.
- Bande d'Absorption C-H : Les groupes méthyle (-CH₃) et méthylène (-CH₂-) de l'acide hyaluronique contribuent à des bandes d'absorption dans la région des 2800-3000 cm^{-1} . Les vibrations C-H sont généralement présentes dans cette région.
- Bande d'Absorption C=O : L'acide hyaluronique contient des groupes carbonyles (C=O) associés aux groupes acétamido et aux groupes carboxylates. Recherchez des bandes d'absorption autour de 1700-1750 cm^{-1} , caractéristiques des vibrations C=O.

- Bande d'Absorption C-O : Les groupes oxygénés, tels que les liaisons C-O-C dans la structure glycosidique de l'acide hyaluronique, donnent généralement lieu à des bandes d'absorption dans la plage de 1000-1300 cm^{-1} . Les vibrations C-O-C sont typiquement observées dans cette région.
- Bande d'Absorption C-C : Les liaisons carbone-carbone (C-C) dans la chaîne polysaccharidique de l'acide hyaluronique peuvent donner lieu à des bandes d'absorption dans la région de 1000-1200 cm^{-1} .
- Bande d'Absorption C-O-H : Les vibrations associées aux groupes hydroxyle (-OH) en liaison avec des atomes de carbone (C-O-H) sont généralement observées dans la région des 1300-1400 cm^{-1} .

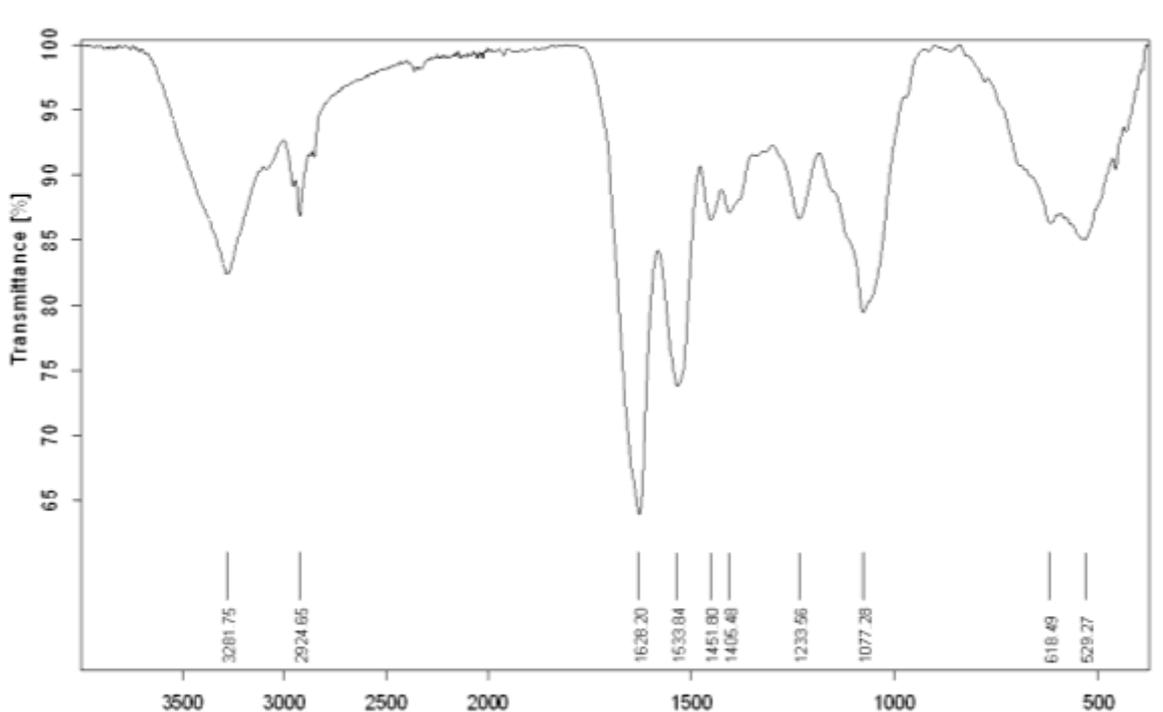


Figure 20: Spectre IR (ATR) de l'extrait brut de l'acide hyaluronique.

En résumé, l'interprétation d'un spectre IR de l'acide hyaluronique nous permet l'identification des bandes d'absorption caractéristiques des différents groupes fonctionnels présents dans la molécule. Cela nous a permis d'avoir une idée sur la composition chimique de notre extrait brut qui correspond à une structure ressemblante de l'acide hyaluronique et d'obtenir des informations sur sa structure.

III.4. Spectroscopie RMN

La RMN du proton (^1H) ou du carbone (^{13}C) sont les techniques RMN les plus fréquentes pour l'analyse des polysaccharides.

L'acide hyaluronique est une molécule polysaccharidique composée de répétitions d'unités disaccharidiques, généralement constituées d'une unité de glucoseamine et d'une unité d'acide glucuronique. Voici quelques exemples de types de carbones que vous pourriez rencontrer dans le spectre RMN ^{13}C de l'acide hyaluronique :

(La Figure21) représente les spectres RMN- ^{13}C de l'acide hyaluronique, L'axe des ordonné o représente l'intensité du signal RMN en unités arbitraire, l'axe des abscisses représente une grandeur lié à la fréquence de résonance des protons : le déplacement chimique, en partie par million (ppm).

Ces déplacements chimiques sont des valeurs générales et peuvent varier légèrement en fonction des conditions de l'expérience. Pour une interprétation précise, il est essentiel de disposer de données de référence spécifiques pour l'acide hyaluronique et de tenir compte des conditions de l'expérience.

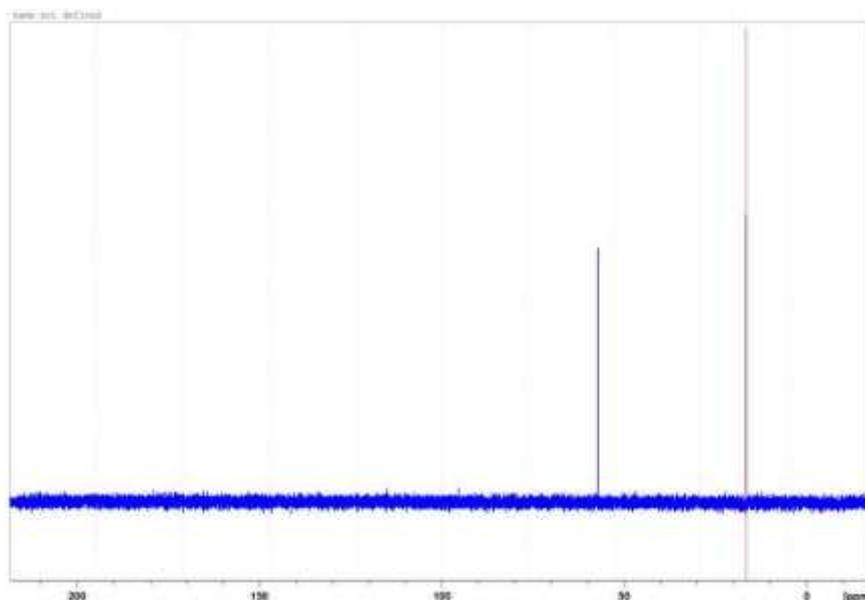


Figure21: Spectres RMN- ^{13}C de l'acide hyaluronique

1. **Carbones de la Glucosamine** : Les carbones présents dans la glucosamine de l'acide hyaluronique pourraient produire des pics distincts. Les carbones en position de méthyle (CH₃) de la glucosamine donneraient un pic simple, généralement à des déplacements chimiques de l'ordre de 20-40 ppm. Les carbones en position de méthylène (CH₂) donneraient des pics de type quartet ou multiplets.
2. **Carbones de l'Acide Glucuronique** : Les carbones de l'acide glucuronique, y compris les carbones en position de carboxylate, auraient des déplacements chimiques caractéristiques dans la plage des 160-180 ppm.
3. **Carbones des Groupes Acétamido** : Si l'acide hyaluronique contient des groupes acétamido (CH₃CONH-), les carbones correspondants auraient des déplacements chimiques distincts, généralement autour de 170-180 ppm.
4. **Carbones de Liaison Glycosidique** : Les carbones impliqués dans la liaison glycosidique entre les unités de glucoseamine et d'acide glucuronique produiraient des pics spécifiques.
5. **Carbones Anomériques** : Les carbones anomériques, c'est-à-dire les carbones liés à l'oxygène de la liaison glycosidique, auraient des déplacements chimiques caractéristiques, généralement autour de 95-105 ppm.
6. **Carbones de la Chaîne Polysaccharidique** : Les carbones de la chaîne polysaccharidique de l'acide hyaluronique généreraient également des pics dans la région correspondante à leur environnement chimique spécifique.

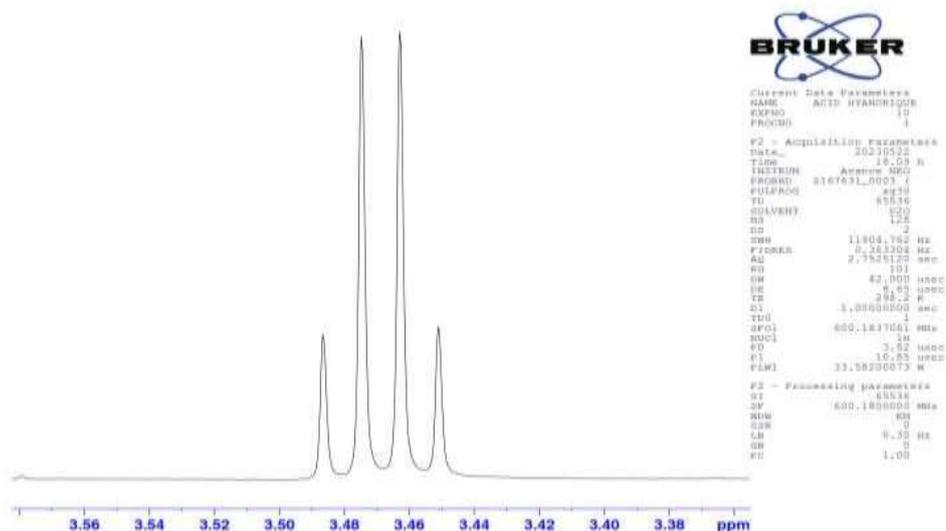


Figure 22: Spectres RMN-1 H de l'acide hyaluronique.

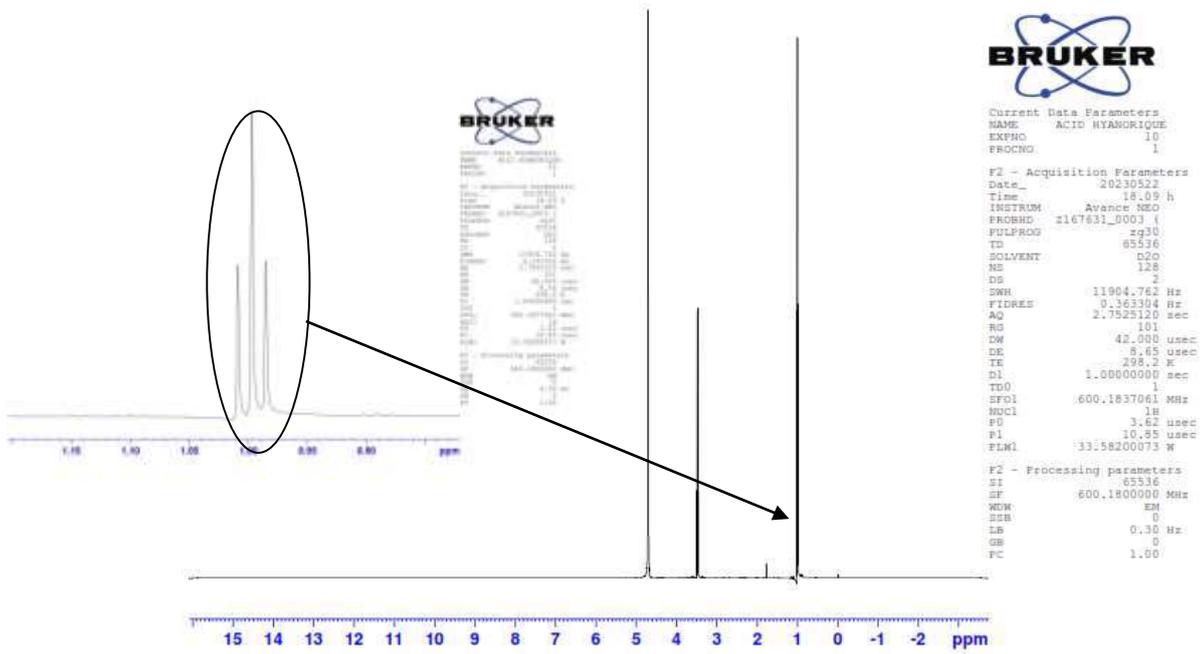


Figure23: Spectres RMN-1 H de l'acide hyaluronique.

Conclusion :

Conclusion :

Ce travail nous a permis d'identifier la présence d'acide hyaluronique dans l'extrait de l'œil de dromadaire, une substance très recherchée dans les domaines médicaux et cosmétiques en raison de ses propriétés hydratantes et de son rôle dans la santé des tissus conjonctifs. Cela pourrait ouvrir de nouvelles perspectives passionnantes pour l'utilisation de ressources inhabituelles, telles que les déchets de l'abattage des dromadaires, dans la production d'acide hyaluronique.

Les analyses spectroscopiques que nous avons effectuées semblent avoir fourni des indications prometteuses sur la présence de l'acide hyaluronique. Cependant, nous tenons à souligner, qu'il est essentiel de confirmer ces résultats par des moyens supplémentaires, notamment par des études rhéologiques (qui mesurent le comportement du fluide) et chromatographiques (qui séparent et quantifient les composants d'un mélange).

Voici quelques points à considérer dans nos travaux futurs :

1. Les études rhéologiques aideront à comprendre les caractéristiques du comportement de l'acide hyaluronique extrait de l'œil du dromadaire. Cela peut inclure la viscosité, l'élasticité, la fluidité, etc. Ces informations sont essentielles pour évaluer l'adéquation de cet acide hyaluronique à des applications spécifiques.
2. **Analyse Chromatographique** : Les analyses chromatographiques, telles que la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), peuvent être utilisées pour séparer et quantifier les différents composants de l'échantillon. Cela permettra de confirmer la pureté de l'acide hyaluronique extrait.
3. **Détermination du Poids Moléculaire** : La détermination du poids moléculaire de l'acide hyaluronique est importante car elle peut avoir un impact significatif sur ses propriétés et son utilisation. Vous pouvez utiliser des techniques telles que la spectrométrie de masse ou la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) pour cela.
4. **Études Plus Approfondies** : d'autres recherches pour mieux comprendre les conditions d'extraction optimales, la stabilité de l'acide hyaluronique extrait, et explorez les différentes applications potentielles, notamment médicales et cosmétiques.
5. **Études de Durabilité** : Dans le contexte de l'utilisation de sous produits de l'abattage des dromadaires, il peut être intéressant de mener des études de durabilité pour évaluer l'impact environnemental de cette nouvelle source d'acide hyaluronique.

En fin de compte, ce travail est prometteur et pourra avoir des implications significatives dans le domaine médical et cosmétique, tout en contribuant à une utilisation plus durable des ressources animales. Continuez à explorer ces possibilités passionnantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- 1) Abdallah, M.M.; Fernández, N.; Matias, A.A.; Bronze, M.doR. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. *CarbohydrPolym* 2020, 243, 116441
- 2) Abuagla IA, HA Ali and ZH Ibrahim, 2016. An anatomical study on the eye of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Inter J Vet Sci*, 5(3): 137
- 3) Almond A, Brass A, Sheehan JK: Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data. *Glycobiology* 1998, 8(10):973-980.
- 4) Almond A, Brass A, Sheehan JK: Oligosaccharides as Model Systems for Understanding Water-Biopolymer Interaction: Hydrated Dynamics of a Hyaluronan Decamer. *Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104(23):5634-5640.
- 5) Almond A, Sheehan JK, Brass A: Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology* 1997, 7(5):597-604.
- 6) Amado, I.R.; Vázquez, J.A.; Pastrana, L.; Teixeira, J.A. Cheese whey: A cost-effective alternative for, hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chem* 2016, 198, 54–61
- 7) Asari A, Mayauchi S (2000)Medical Application of hyamoronan Glycoforum Hyaloronan Today vol 4 A1
- 8) Atkins EDT, Sheehan JK: Structure for hyaluronic acid. *Nature (London), New Biology* 1972, 235(60):253-254
- 9) Attia YA, Kobeasy MI, Samer M. Evaluation of magnetic nanoparticles influence on hyaluronic acid production from *Streptococcus equi*. *Carbohydr. Polym.* 2018;192:135–142.
- 10) Bajaj G, Kim MR, Mohammed SI, Yeo YJJoCR. Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors.J. *Controlled Release*. 2012;158(3):386-392.
- 11) Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW: Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochemical Journal* 1986, .Balazs EA: Ultrapure hyaluronic acid and its use. In. *United States Patent* 4782046 (Biotrics, Inc., USA).1979: 9 pp 235(3):903.
- 12) Balazs, E. A.; Laurent, T. C. J. Rheology of Sodium Hyaluronate under PhysiologicalConditions .1951, 6, 665.

- 13) Baniak N, Campos-Baniak G, Mulla A, Kalra J. Vitreous humor: A short review on post-mortem applications. *Clin Exp Pathol* 2014;4:199.
- 14) Beauthier, J.P.: "Traite ' de me 'de- cine le 'gale", 2008, article "Quelques aspects biochimiques de l'e 'volution post mortem", : 715 - 725p
- 15) Bettelheim FA: Crystalline sodium hyaluronate. *Nature* 1958, 182(4645):1301-1302..
- 16) Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: A review. *Forensic Toxicol* 2016;34:12-40.
- 17) Bévalot, F. (2014). Intérêts et limites de la bile et de l'humeur vitrée comme matrices alternatives en toxicologie médico-légale (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- 18) Bicudo RCS, Santana MHA. Effects of organic solvents on hyaluronic acid nanoparticles obtained by precipitation and chemical crosslinking. *J Nanosci Nanotech.* 2012;12(3):2849–2857
- 19) Bradley OC, 1959. Topographical anatomy of the dog 6th Ed Oliver & Boyd, Edinburgh.
- 20) Burdick J.A., Prestwich G.D. (2011). Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Mater.*, 23, 41-56
- 21) Campo, Giuseppe M., Angela Avenoso, Salvatore, Angela D'Ascola, Giancarlo Nastasi, et Alberto Calatroni. «Small Hyaluronan Oligosaccharides Induce Inflammation by Engaging Both Toll-like-4 and CD44 Receptors in Human Chondrocytes». *BiochemiPharmac.* 2010aou 80, (4): 480 90.
- 22) Cheng F, Gong Q, Yu H, et al. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol J.* 2016;11(4):574–584.
- 23) Chien, L.J.; Lee, C.K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *ApplMicrobiol Biotechnol* 2007, 77, 339–346,
- 24) Cleland, R. L. Ionic polysaccharides. II. Comparison of polyelectrolyte behavior of hyaluronate with that of carboxymethyl cellulose 1968, 6, 1519.
- 25) Coe JI (1984) Hypothermia: autopsy findings and vitreous glucose. *J Forensic Sci* 29: 389-395.
- 26) Coe JI. Postmortem chemistry update. Emphasis on forensic application. *Am J Forensic Med Pathol* 1993;14:91-117.

- 27) Constantinescu GM. Guide to Regional Ruminant Anatomy Based on the Dissection of the Goat. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 2001.
- 28) Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbo Res.* 2005;340(5):791–809
- 29) Diane Rigo 1, Leonardo M. da Silva 1 , Bruno Fischer 1 , Rosicler Colet 1 , Rogério M. Dallago 1 , Jamile Zeni 1, Volume 13, Issue 3, 2023, 211
- 30) Dicker, Kevin T., Lisa A. Gurski, Swati Pradhan-Bhatt, Robert L. Witt, Mary C. Farach-Carson, et Xinqiao Jia. « Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions ». *Acta Biomater.* 2014 avr ; 10, (4) : 1558–70.
- 31) Dyce KM, WO Sack and CTG Wensing, 1971. Essentials of bovine anatomy. Academic Press, Amsterdam. hal-01764996
- 32) El Maghraoui (2009). Les acides hyaluroniques en question Service de Rhumatologie, Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V.
- 33) Elwood, D. C.; Riccarton, C. Eur. Patent 296,740, 1988.
- 34) Fallacara, A.; Baldini, E.; Manfredini, S.; Vertuani, S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers* 2018, 10,
- 35) Ferreira, R.G.; Azzoni, A.R.; Santana, M.H.A.; Petrides, D. Techno-economic analysis of a hyaluronic acid production process utilizing streptococcal fermentation. *Processes* 2021, 9, 1
- 36) Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M. *Macromolecules* 1993, 26, 6945.
- 37) Fruminet J. (2010). Rapport de stage
- 38) G. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 686.
- 39) Gagajewski A, Murakami MM, Kloss J, Edstrom M, Hillyer M, et al. (2004) Measurement of chemical analytes in vitreous humor: stability and precision studies. *J Forensic Sci* 49: 371-374.
- 40) Gedikli, S.; Güngör, G.; Toptaş, Y.; Sezgin, D.E.; Demirbilek, M.; Yazıhan, N.; Çelik, P.A.; Denkbaş, E.B.
- 41) Gunasekaran, V.; Gowdhaman, D.; Ponnusami, V. Role of membrane proteins in bacterial synthesis of hyaluronic acid and their potential in industrial production. *Int J Biol Macromol* 2020, 164, 1916–1926,

- 42) Harada A: Construction of supramolecular structures from cyclodextrins and polymers. *Carbohydrate Polymers* 1997, 34(3):183-188
- 43) Harada A: Supramolecular assemblies through macromolecular recognition by cyclodextrins. *Supramolecular Science* 1996, 3(1-3):19-23.. Harada A: Preparation and structures of supramolecules between cyclodextrins and polymers. *Coordination Chemistry Reviews* 1996, 148:115-133.
- 44) Hashidzume A, Tomatsu I, Harada A: Interaction of cyclodextrins with side chains of water soluble polymers: A simple model for biological molecular recognition and its utilization for stimuli-responsive systems. *Polymer* 2006, 47(17):6011-6027
- 45) Hayashi, K.; Tsutsumi, K.; Norisuye, T.; Teramaoto, A. *Polym. J.* 1996, 28, 922
- 46) Hubbell, J.A.; Pathak, C.P.; Sawhney, A.S.; Desai, N.P.; Hill, J.L. Photopolymerizable Biodegradable Hydrogels as Tissue Contacting Material and Controlled-Release Carriers. U.S. Patent WO1993017669, 16 September 1993.
- 47) Jashnani KD, Kale SA, Rupani AB. Vitreous humor: Biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci* 2010;55:15
- 48) Jose Antonio vazques ,Isabel Rodriguez ,Rodriguez Amado ,Maria Ignacia ,Montemayor ,Javier Fraguas ,Maria del Pilar Gonzalez,Miguel Anxo Murado ,Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review 11 March 2013
- 49) Ke C., Qiao D., Gan D., Sun Y., Ye H., Zeng X. (2008). Antioxydant activity in vitro and in vivo of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* ssp *zooepidemicus*. *Carbohydrate Polymers* 75, 677- 682
- 50) Kjoniksen A-L, Galant C, Knudsen KD, Nguyen GTM, Nystroem B: Effects of b-Cyclodextrin Addition and Temperature on the Modulation of Hydrophobic Interactions in Aqueous Solutions of an Associative Alginate. *Biomacromolecules* 2005, 6(6):3129-3136.
- 51) Kvam, B.J., Atzori, M., Toffanin, R., Paoletti, S., Biviano, F. ¹H- and ¹³C-NMR studies of solutions of hyaluronic acid esters and salts in methyl sulfoxide: comparison of hydrogen-bond patterns and conformational behaviour. *Carbohydrate. Res.* 1992; 230: 1-13.

- 52) Lataillade ,J,J,Albanesse,P,Uzan,G.Implications de la acide Hyalorunique dans langiogenese normale et pathologique application a lingenierie cellulaire Avril 2010,pages S15_ S22
- 53) Laura Lалуque. Acide hyaluronique une molécule primitive: intérêts et emplois en pharmacie d'officine. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. ffdumas-03095496f
- 54) Laurent T.C., Balazs E.A. (1970). Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Structure of hyaluronic acid
- 55) Laurent, T. C. Ark. Kemi 1957, 11, 497.
- 56) Laurent, T. C.; Gergely, J. J. Biol. Chem. 1955, 212, 325.
- 57) Laurent,T. C.; Ryan, M.; Pietruszkiewicz A. Biochim. Biophys. Acta 1960, 42, 476.
- 58) Le Goff MM, Bishop PN (2008) Adult vitreous structure and postnatal changes. Eye 22:1214-22
- 59) Lee SY, Kang MS, Jeong WY, Han DW, Kim KS.Hyaluronic acid-based theranostic nanomedicines for targeted cancer therapy. Cancers 2020 Apr 10;12(4):940.
- 60) Liu K, Catchmark JM. Bacterial cellulose/hyaluronic acid nanocomposites production through co-culturing *Gluconacetobacterhansenii* and *Lactococcus lactis* in a two-vessel circulating system. *Bioresour Technol.* 2019;290:121715.
- 61) Liu K, Catchmark JM. Bacterial cellulose/hyaluronic acid nanocomposites production through co-culturing *Gluconacetobacterhansenii* and *Lactococcus lactis* in a two-vessel circulating system. *Bioresour Technol.* 2019;290:121715.
- 62) Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. (2009). Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*.
- 63) Lubomír Lapčák, Jr. Lubomír Lapčák Stefaan De Smedt,| and Joseph D Peter Chabrec̣ek Received April 28, 1997

- 64) Lyndervan Oliveira Alcântara , Juliana Rabelo de Sousa , FábíiaKarine Andrade , Edson Holanda Teixeira , Miguel Ângelo Cerqueira , André Luis Coelho da Silva , Men de sá Moreira Souza Filho , BartolomeuWarlene Silva de Souza V 226, 31 January 2023, 172-183
- 65) Montélimar, J.-P. M. (2006, 12 2-3). Tout (ou presque)sur l'acide hyaluronique. p. 166-167.
- 66) M.A. Murado a, M.I. Montemayor a, M.L. Cabo b, J.A. Vázquez a, M.P. González a Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball
- 67) M.Veiseh,E .Turley Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer 2011.10.1039
- 68) Madea B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? Forensic Sci Int 2005;151:139-49.
- 69) Maheu E. Acides hyaluroniques dans la gonarthrose, les autres localisations arthrosiques et en extra-articulaire. Revue du rhumatisme monographies (2020)
- 70) Mao H-L, Qian F, Li S, Shen J-W, Ye C-K, Hua L, et al. delivery of doxorubicin from hyaluronic acid-modified glutathione-responsive ferrocene micelles for combination cancer therapy. Mol. Pharmaceutics. 2019 Jan 9;16(3):987-994.
- 71) Mathieu Poinot. L'acide hyaluronique : Production microbiologique et applications. Sciences pharmaceutiques. 2011.
- 72) May NDS, 1954. The anatomy of the sheep: a dissection manual. 3rdEdition. University of Queensland.
- 73) Miyoshi T, Kitagawa H, Chiba S, Hashimoto M, Saegusa H: Hyaluronic acid manufacture with Streptococcus equi. In. Application: JP: (Denki Kagaku Kogyo K. K., Japan). 1988: 5 pp
- 74) Noble P.W. (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. Matrix Biology 21, 25-29
- 75) Odijk, T. J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed. 1977, 15, 477.

- 76) Ogston, A. G.; Stainer, J. E. *Biochem. J.* 1950. On the state of hyaluronic acid in synovial fluid. *Biochem. J.* 46, 364-37
- 77) Ogston, A. G.; Stainer, J. E. *Biochem. J.* 1952, . Further observations on the preparation and composition of the hyaluronic acid complex of ox synovial fluid. *Biochem. J.* 52, 149-156.
- 78) Osuna E, Vivero G, Conejero J, Abenza JM, Martínez P, et al. (2005) Postmortem vitreous humor beta-hydroxybutyrate: its utility for the postmortem interpretation of diabetes mellitus. *Forensic Sci Int* 153: 189-195.
- 79) P. Richette. Viscosupplémentation au genou. *Revue de rhumatisme monographies* volume 83, numéro 3, pages 158-16, juin 2016.
- 80) Peer D, Margalit R. Loading mitomycin C inside longcirculating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models. *Int J Cancer.* 2004;108:780–789.
- 81) Pelander A, Ristimaa J, Ojanperä I. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2010; 34(6): 312–318
- 82) Pozuelo J, Mendicuti F, Mattice WL: Inclusion Complexes of Chain Molecules with Cycloamyloses. 2. Molecular Dynamics Simulations of Polyrotaxanes Formed by Poly(ethylene glycol) and α -Cyclodextrins. *Macromolecules* 1997, 30(12):3685-3690
- 83) Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A. (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of plastic, reconstitutive and aesthetic surgery* 60, 1110-1119
- 84) Rah M.J. (2011). A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry* 82, 38-43
- 85) Rangaswamy V, Jain D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* *Biotechnol Lett.* 2008;30(3):493–496.

- 86) Rastrelli, A.; Beccaro, M.; Biviano, F.; Calderini, G.; Pastorello, A. In *Clinical Implant Materials*; Heimke, G., Soltesz, U., Lee, A. J. C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1990; p 199.
- 87) Rhee, W. M.; Berg, R. A. U.S. Patent 5,470,911, 1995.
- 88) Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):62-8.
- 89) Rousselle, P.; Montmasson, M.; Garnier, C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biol*. 2019, 75–76, 12–26.
- 90) Ruschoni Ucm, Mera Aem , Zamudio Lhb , Vinod Kumar , Mohammad J ,Taherzadeh ,Vijay Kumar Garalapati , and Anuj Kumar Chande Comprehensive review on biotechnological production of hyaluronic acid startus market and applications 2022 :13 (4),9945_ 9661
- 91) Scott JE: Secondary structures in hyalorunan solutions chemical and biological implications *The Biologie of Hyaloronan Ciba Foundation Symposium*, No.143, 6-14, 1989
- 92) Seidlits S.K., Drinnan C.T., Petersen R.R., Shear J.B., Suggs L.J., Schmidt C.E. (2011)Fibronectin–hyaluronic acid composite hydrogels for three-dimensional endothelial cell culture . *Acta Biomaterialia* 7, 2401-24
- 93) Sonoda KH, Sakamoto T, Qiao H, Hisatomi T, Oshima T, Tsutsumi-Miyahara C, et al. (2005) The analysis of systemic tolerance elicited by antigen inoculation into the vitreous cavity: vitreous cavityassociated immune deviation. *Immunology* 116:390-9
- 94) Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DA, et al. (1998) Advanced glycation end products in vitreous: Structural and functional implications for diabetic vitreopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2517-2523.

temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte.

- 95) Tokita Y., Okamoto A. (1995). *Polymer Degradation and Stability* 48, 269-273 Vercruysse, K.P.; Marecak, D.M.; Marecek, J.; Prestwich, G. *Bioconjugate Chem.* 1997, 8, 686.
- 96) Vercruysse KP, Marecak DM, Marecek JF, Prestwich GD. *Bioconjugate Chemistry.* 1997;8:686–694.
- 97) West, J. L. U.S. Patent 5,567,435, 1996.
- 98) Whikehart DR. *Biochemistry of the Eye*, 2nd Ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 2004.
- 99) Winter WT, Smith PJ, Arnott S: *Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-*
- 100) Yao ZY, Qin J, Gong JS, et al. Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology. *CarbohydrPolym.* 2021;264:118015.
- 101) Yao ZY, Qin J, Gong JS, et al. Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology. *CarbohydrPolym.* 2021;264:118015.
- 102) Yasser, A.A.; Mohamed, I.; Kobeasy, M.S. Evaluation of magnetic nanoparticles influence on hyaluronic, acid production from *Streptococcus equi*. *CarbohydrPolym* 2018,
- 103) Yui, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. J. Inflammation Responsive Degradation of Cross-Linked Hyaluronic-Acid Gels. *Journal of Controlled Release* 1993, 26
- 104) Zhang H., Hogen-Esch T.E., Boschet F., Margaillan A., Boschet F., Margaillan A. Complex formation of cyclodextrin- and perfluorocarbon- modified water-soluble polymers. *Langmuir.* 1998;14:4972–4977.
- 105) Zilg B, Alkass K, Berg S, Druid H (2009) Postmortem identification of hyperglycemia. *Forensic Sci Int* 185: 89-95

Annexes :

Annexe N°1 : liste des produits



Figure 24 : D2O(Solvant)avant



Figure 25 : La pepsine

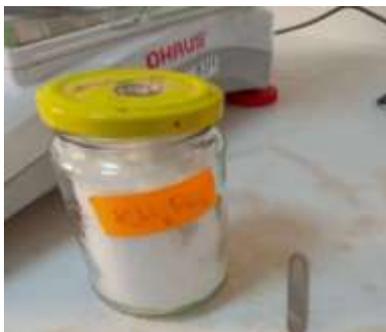


Figure 26 : Potassium dihydrogène phosphate



Figure 27: Le chlorure de sodium



Figure 28 : Sodium dihydrogenephosphate NaH_2PO_4

Annexe N° 2 liste des appareils:



Figure 29 : Balance



Figure 30 : Agitateur magnétique chauffant



Figure 29 : Centrifugeuse de laboratoire électrique 800



Figure 30 : Embouts (100) Melangeurs Bleu



Figure 31 : Centrifugeuse Rotofix32a Hettich



Figure 32: Lyophilisateur

Annexe N°3 listes des solutions préparées:



Figure 33: Solution enzymatique salin



Figure 34 : Solution



Figure 35: Précipitation d'acide Hyalorique



Figure36 :AH purifiée pur (couleur blanche)

Résumé

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane naturel qui est non immunogène et non adhésif et joue un rôle clé dans de nombreux processus de cicatrisation de la peau car il provoque naturellement l'angiogenèse lorsqu'il se décompose en petits fragments. L'acide hyaluronique favorise l'inflammation précoce, nécessaire au démarrage de la plaie. Cicatrisation, mais contrôle ensuite les dernières étapes du processus, permettant la stabilisation de la matrice et la réduction à long terme de l'inflammation. L'acide hyaluronique est largement distribué dans les cellules et les tissus des mammifères, mais on le trouve principalement dans le liquide synovial, l'humeur oculaire et les tissus conjonctifs lâches comme le derme, le cordon ombilical et les vaisseaux sanguins artériels. De plus, on peut le trouver dans la capsule de certaines bactéries. L'objectif de cette travail était d'extraire et de caractériser l'acide Hyalorunique de corps vitrée de dromadaire on utilisés la voie enzymatique pour la l'extraction est pour obtenu un produit purifié a la fin la caractérisation par la résonance RMN et le spectroscopies IR ont confirmés que l'acide Hyalorunique est obtenu ; est le rendement d'extraction était comparées par les autres sources animales il s'est avéré être bon. Ainsi le HA extrait de cette source constitue un produit à potentiel biotechnologique, qui a une qualité adéquat pour de larges applications biomédicales.

Mots Clefs : Acide Hyalorunique, Humeur vitrée, extraction, caractérisation

Abstract

Hyaluronic acid is a naturally occurring glycosaminoglycan that is non-immunogenic and non-adhesive and plays a key role in many skin healing processes as it naturally causes angiogenesis when it breaks down into small fragments. Hyaluronic acid promotes early inflammation, necessary for the start of the wound. Wound healing, but then controls the later stages of the process, allowing matrix stabilization and long-term reduction of inflammation. Hyaluronic acid is widely distributed in cells and tissues of mammals, but it is mainly found in synovial fluid, ocular humor and loose connective tissues like dermis, umbilical cord and arterial blood vessels. Additionally, it can be found in the capsule of some bacteria. The objective of this work was to extract and characterize Hyaluronic acid from the vitreous body of dromedaries, using the enzymatic route for the extraction and obtaining a purified product. At the end, the characterization by NMR resonance and infrared spectroscopy are confirmed that hyaluronic acid is obtained; is the extraction yield was compared by other animal sources it turned out to be good. Thus the HA extracted from this source constitutes a product with biotechnological potential, which has an adequate quality for wide biomedical applications.

Keywords: Hyaluronic Acid, Vitreous Humeur, extraction, characterizatio

ملخص

حمض الهيالورونيك هو عبارة عن جليكوزامينوجليكان موجود بشكل طبيعي وهو غير منشط وغير لاصق ويلعب دورًا رئيسيًا في العديد من عمليات شفاء الجلد لأنه يتسبب بشكل طبيعي في تكون الأوعية الدموية عند تقسيمها إلى أجزاء صغيرة. حمض الهيالورونيك يعزز الالتهاب المبكر ، وهو ضروري لبدء الجرح. التئام الجروح ، ولكن بعد ذلك يتحكم في المراحل اللاحقة من العملية ، مما يسمح بتثبيت المصفوفة وتقليل الالتهاب على المدى الطويل. يتم توزيع حمض الهيالورونيك على نطاق واسع في خلايا وأنسجة الثدييات ، ولكنه يوجد بشكل أساسي في السائل الزليلي ، وخط العين والأنسجة الضامة الرخوة مثل الأدمة والحبل السري والأوعية الدموية الشريانية. بالإضافة إلى ذلك ، يمكن العثور عليها في كبسولة بعض البكتيريا. كان الهدف من هذا العمل هو استخراج وتمييز حمض الهيالورونيك من الجسم الزجاجي للجمال باستخدام المسار الأنزيمي لاستخراج المنتج المنقى والحصول عليه ، وفي النهاية تم تأكيد التوصيف بواسطة الرنين المغناطيسي النووي والتحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء أنه يتم الحصول على حمض الهيالورونيك ؛ هو أن حاصل الاستخلاص تمت مقارنته بمصادر حيوانية أخرى فقد اتضح أنه جيد. وبالتالي فإن HA المستخرج من هذا المصدر يشكل منتجًا بإمكانيات التكنولوجيا الحيوية ، والذي يتمتع بجودة مناسبة للتطبيقات الطبية الحيوية الواسعة.

الكلمات المفتاحية: حمض الهيالورونيك ، الهيم الزجاجي ، الاستخلاص ، التوصيف